



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche

DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA, ONCOLOGIA CHIRURGICA

XX ciclo

**Ridirezionamento dell'immunità anti-tumorale
in terapia cellulare adottiva:
trasferimento genico del T-Cell Receptor
mediato da vettori lentivirali**

Coordinatore: *Ch.mo Prof. Paola Zanovello*
Supervisore: *Dott. Antonio Rosato*

Dottoranda: *Dott.ssa Sara Bobisse*

31 gennaio 2008

INDICE

RIASSUNTO	6
SUMMARY	7
INTRODUZIONE	8
1. IMMUNOEDITING DEL TUMORE: DALL'IMMUNOSORVEGLIANZA ALL'IMMUNOEVASIONE	8
2. LA VACCINAZIONE ANTI-TUMORALE IN CLINICA	10
3. ACT	13
4. OTTIMIZZAZIONE DELLE FUNZIONI CELLULARI T PER PROTOCOLLI ACT	15
4.1 Regime di preconditionamento	16
4.2 Persistenza in vivo dei linfociti T	19
4.3 Stadio differenziativo dei linfociti	20
4.4 Sistemi di coltura	24
5. INGEGNERIZZAZIONE DELLE CELLULE T	25
6. TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR	27
6.1 CAR (<i>chimeric antigen receptor</i>)	30
7. TRASFERIMENTO DI ETERODIMERI TCR $\alpha\beta$	31
7.1 Quale TCR?	31
7.2 Quali cellule T riceventi?	32
7.3 Superamento della tolleranza al self	33
8. TRASFERIMENTO STABILE DEL TCR MEDIANTE VETTORI VIRALI	35
9. TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR E CLINICA	38
10. PROBLEMI IRRISOLTI E RISCHI DEL TRASFERIMENTO ADOTTIVO DI CELLULE T RIDIREZIONATE	39
10.1 Colture in vitro e proprietà delle cellule trasferite	402
10.2 Stabilità dell'espressione del transgene	40
10.3 Ruolo potenziale di cellule T CD4 ⁺ trasdotte	41
10.4 Potenziale induzione di effetti autoimmuni	41
10.5 Meccanismi di sicurezza per l'eliminazione delle cellule T modificate che mostrano autoreattività o espansione clonale	43
10.6 Trasformazione delle cellule T per mutagenesi inserzionale	44
11. PROSPETTIVE DELLA TERAPIA GENICA DEL CANCRO MEDIANTE TRASFERIMENTO DI TCR	45
MODELLO SPERIMENTALE	48
MATERIALI E METODI	51
1. LINEE CELLULARI	51
2. PBMC	53
3. COLTURE CTL	53
4. VETTORI	54
5. GENERAZIONE DI COSTRUTTI LENTIVIRALI	56
6. PRODUZIONE VIRALE	58
7. TETRAMERO	59

8. TRASFERIMENTO GENICO DI MELAN-A TCR $\alpha\beta$ E CLONAGGIO DI CELLULE T JURKAT ESPRIMENTI IL TCR.....	60
9. MISURAZIONE DEL CALCIO NELLA SOSPENSIONE CELLULARE.....	60
10. TRASFERIMENTO GENICO DI MELAN-A TCR $\alpha\beta$ IN LINFOCITI T PRIMARI E CTL CD4 ⁺ ANTI-EBV	61
11. STIMOLAZIONE ANTIGENICA DEI LINFOCITI T TRASDOTTI CON TCR	62
12. ANALISI CITOFLUORIMETRICHE.....	63
13. SAGGIO DI RILASCIO DI ⁵¹ Cr	66
13.1 Curva di Avidità.....	67
13.2 Citotossicità con blocco della molecola CD8.....	67
14. TOPI.....	67
15. WINN ASSAY	68
16. TRASFERIMENTO ADOTTIVO DEI LINFOCITI T TRASDOTTI	68
17. IMAGING OTTICO.....	69
18. ANALISI IMMUNOISTOCIMICA.....	73
19. COMPETIZIONE TRA CATENE.....	73
19.1 Vettori virali.....	73
19.2 FRET.....	74
RISULTATI	75
1. SVILUPPO DI LV PER IL TRASFERIMENTO DI UN TCR DIRETTO CONTRO L'AG MELANOCITARIO MELAN-A ₂₆₋₃₅	75
1.2 Generazione e caratterizzazione di LV-TCR	76
2. VERIFICA DELLA TRADUCIBILITÀ DI PBMC E CTL CD4 ⁺ ANTI-EBV UMANI E OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI DI INFEZIONE.....	78
2.1 PBMC.....	78
2.2 CTL CD4 ⁺ anti-EBV.....	79
3. TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR IN PBMC E CTL CD4 ⁺ ANTI-EBV	81
4. GENERAZIONE DI VETTORI BIDIREZIONALI CODIFICANTI IL TCR	82
5. VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DI TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR MEDIATO DA VETTORI BIDIREZIONALI	83
5.1 Linea Jurkat.....	83
5.2 PBMC.....	84
6. GENERAZIONE DI POPOLAZIONI CELLULARI T TRASDOTTE, PER STUDI DI TRASFERIMENTO ADOTTIVO	85
7. CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE E FENOTIPICA DELLA POPOLAZIONE T TRASDOTTA.....	88
7.1 Caratterizzazione funzionale.....	88
7.2 Caratterizzazione fenotipica	92
8. ANALISI COMPARATIVA FUNZIONALE TRA IL CLONE SELA-A 64 E LA COLTURA TRASDOTTA	93
8.1 Affinità.....	94
8.2 Avidità	94
8.3 Riconoscimento di cellule tumorali esprimenti l'Ag Melan-A.....	95
8.4 Dipendenza funzionale del TCR dalla molecola costimolatoria CD8	96
9. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA TERAPEUTICA IN VIVO	97
9.1 Winn Assay	98
9.2 Somministrazione loco-regionale in ambito terapeutico	99

9.3 Somministrazione sistemica in ambito terapeutico.....	101
10. VALUTAZIONE DELLA MODULAZIONE DELL'Ag MELAN-A MEDIANTE IMMUNOISTOCIMICA	102
11. VALUTAZIONE DELLE CAPACITÀ DI <i>HOMING</i> NEL SITO TUMORALE: OTTIMIZZAZIONE DI UN SISTEMA DI <i>TRACKING</i> CELLULARE	103
12. COMPETIZIONE TRA CATENE	106
12.1 Espressione del TCR anti-Melan-A in differenti linee cellulari trasdotte con il vettore bidirezionale	106
12.2 Conseguenze del trasferimento genico di $TCR\alpha\beta$ e $TCR\alpha\beta:CD3\zeta$ in un modello cellulare doppio TCR	107
12.3 Appaiamento esclusivo tra $TCR\alpha:\zeta$ e $TCR\beta:\zeta$, ma non tra $TCR\alpha$ e $TCR\beta$ in cellule T a doppio TCR.....	110
DISCUSSIONE	112
ABBREVIAZIONI	120
BIBLIOGRAFIA	122

RIASSUNTO

L'enorme interesse della comunità scientifica per lo sviluppo di un approccio di immunoterapia adottiva (ACT) basato sulla modificazione genica di linfociti da sangue periferico, è testimoniato dalle numerose pubblicazioni apparse negli ultimi anni e dalle prime recenti sperimentazioni cliniche. La metodica del *TCR transfer* in ACT risponde alla necessità di produrre, in tempi brevi, grandi quantità di cellule T tumore-specifiche, ottenute in condizioni di assenza di meccanismi soppressivi che presiedono il fisiologico controllo omeostatico. Gli aspetti critici emersi dal primo *trial* clinico concernono il trasferimento di un numero adeguato di cellule tumore-specifiche, la persistenza delle cellule in vivo, il mantenimento di adeguati livelli di espressione del transgene e l'*homing* al sito tumorale. In particolare, vi è la necessità di ottimizzare l'approccio terapeutico fin qui sviluppato, con particolare attenzione all'ingegnerizzazione delle cellule T anti-tumoral. Riteniamo, a questo proposito, che i vettori lentivirali forniscano una valida alternativa al più consolidato impiego di quelli retrovirali, sulla base delle peculiari caratteristiche molecolari, e alla luce dei dati relativi al primo studio di fase I. L'attività di ricerca del mio corso di dottorato si è focalizzata sullo sviluppo di un protocollo per generare linfociti esprimanti un TCR di interesse, mediante trasduzione con vettori lentivirali. A questo scopo, un vettore bidirezionale, recentemente caratterizzato, è stato per la prima volta valutato per la ricostituzione di una funzione cellulare dipendente da più subunità. I dati ottenuti confermano che il vettore lentivirale bidirezionale consente il duplice trasferimento genico e l'espressione *ex vivo* e *in vivo*. La messa a punto di una metodica per la generazione ed espansione delle cellule trasdotte ci ha consentito inoltre di disporre di popolazioni che esprimono il TCR transgenico a livelli elevati e di valutarne la funzionalità *in vitro* contro bersagli specifici. L'attività terapeutica della popolazione ingegnerizzata è stata quindi analizzata in topi Scid inoculati con cellule di melanoma umano SK-23 MEL. Tale modello ha consentito di verificare l'impatto terapeutico di differenti regimi di trasferimento e di compiere studi preliminari di *homing* al sito tumorale. Sebbene i risultati ottenuti nel nostro laboratorio siano incoraggianti, rimangono tuttavia da indagare i meccanismi per cui il tumore riprenda la sua crescita dopo una fase iniziale di regressione. A tal proposito, dati preliminari indicherebbero come una delle potenziali cause la modulazione negativa dell'espressione dell'antigene per cui i linfociti sono specifici, fenomeno legato a proprietà delle linee melanocitarie utilizzate come modello tumorale o alla pressione selettiva indotta sul tumore dal sistema immunitario.

SUMMARY

Genetic modification of T cells with genes encoding a tumor-specific T-cell Receptor (TCR) represents a novel strategy to obtain large quantities of tumor-reactive T lymphocytes to be employed in adoptive cell therapy protocols. As a transfer method, lentiviral vectors might represent an appealing alternative to the most widely used oncoretroviral vectors, because they do not require cell division for nuclear uptake.

We have characterized the TCR of a highly cytotoxic T lymphocyte (CTL) clone recognizing the HLA-A2-restricted Melan-A/MART-1 melanocyte differentiation antigen on both pulsed T2 cells and SK-23 MEL melanoma tumor cells. The α (V α 2.2) e β (V β 14) chains of the TCR were cloned and used to construct a lentiviral vector carrying a bidirectional promoter and capable of a robust and coordinated expression of the two transgenes.

Transduction of Jurkat T leukemia cells showed that more than 60% of cells could be transduced without selection at a low MOI, as assessed by antigen-specific tetramer staining. High expression Jurkat clones disclosed that the new assembled TCR was at high intensity, very stable over time, and fully functional, as demonstrated by intracellular signaling upon TCR triggering. Transduction of activated PBMC produced a highly expressed transgenic TCR in around 5-10% of cells. This initial low, but clearly detectable, fraction of transduced lymphocytes could be quickly expanded (4-6 weeks) upon subsequent antigen-specific *in vitro* restimulation. The resulting population had a 50-70% of transgenic TCR expression and mainly a CD8⁺ phenotype, specifically recognized antigen-expressing melanoma cells (cytokine production and cytotoxic activity), and exerted relevant therapeutic effects *in vitro* upon adoptive transfer in SK-23 MEL-bearing mice.

Our results indicate that LV constitute a valid tool for stable and high-intensity expression of transgenic TCR, and support further studies to address potential feasibility of this approach for clinical application.

INTRODUZIONE

1. IMMUNOEDITING DEL TUMORE: DALL'IMMUNOSORVEGLIANZA ALL'IMMUNOEVASIONE

I progressi nella comprensione della funzione immunitaria cellulare e della biologia del tumore hanno fatto chiaramente emergere che un sistema immunitario competente svolge un ruolo chiave nella prevenzione e nel trattamento del cancro. Eventi genetici ed epigenetici sono responsabili della generazione di un grande numero di nuovi antigeni (Ag) che vengono costantemente prodotti nei tumori mentre si sviluppano e progrediscono. Gli Ag riconosciuti dalle cellule T sono stati raggruppati in categorie sulla base dei geni che li codificano. Gli Ag tumore-specifici (TSA) compaiono *de novo* e sono unicamente espressi nelle cellule tumorali. Gli Ag tumore-associati (TAA), quali Melan-A e gp100, derivano da proteine non mutate, specifiche di particolari linee cellulari ed espresse anche nei tessuti normali, seppure a livelli inferiori rispetto a quelli osservati per le cellule trasformate. Altri Ag tumorali, come NY-ESO-1, derivano dall'espressione aberrante di geni non mutati, i prodotti dei quali sono normalmente espressi solo nei testicoli e nei tessuti fetali (Ag *cancer testis*, CT). Il sistema immunitario può rilevare questi Ag e attuare risposte umorali e cellulari dirette contro le cellule trasformate, inibendo così lo sviluppo della neoplasia. Il concetto di immunosorveglianza del tumore^{1, 2} è oggi supportato dalla scoperta di oltre 1000 Ag tumorali umani (una lista è disponibile al sito web <http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/>) e da molteplici evidenze sperimentali e cliniche. Le più convincenti derivano da studi condotti su topi immunodeficienti³. In particolare, negli animali doppi mutanti, privi di linfociti B e T e deficienti per STAT1, il fattore di trascrizione che media la segnalazione dell'IFN- γ , si è osservata un'incidenza di adenomi e adenocarcinomi superiore rispetto ai topi immunocompetenti di controllo. Nell'uomo, la presenza in molti pazienti con tumore avanzato di leucociti con specifiche proprietà inibitorie sull'impianto e la crescita delle cellule tumorali è nota fin dagli anni 70⁴. Osservazioni più recenti indicano che l'infiltrazione del tumore da parte delle cellule T costituisce un potente marcatore predittivo di sopravvivenza, nel cancro ovarico e coloretale^{5, 6}.

Durante la crescita del tumore, una continua interazione tra cellule tumorali e sistema immunitario ha luogo a livello del sito tumorale e dei linfonodi drenanti il tumore stesso. Nella fase iniziale di una neoplasia, piccole differenze nel repertorio antigenico e la rottura dell'omeostasi

tissutale potrebbero attivare delle risposte immuni innate locali, mediate da macrofagi, cellule T *natural killer* (NKT) e cellule *natural killer* (NK). L'infiammazione locale potrebbe reclutare cellule dendritiche (DC) e promuovere la loro attivazione e migrazione ai linfonodi. Le DC, a loro volta, attivano le cellule T e B, effettori di una risposta immunitaria adottiva anti-tumorale. La sinergia delle risposte innata e adattativa tiene sotto controllo la patologia, in una sorta di equilibrio dinamico. Tutto ciò si verifica fino a che le cellule tumorali non vengono eliminate completamente o, in alternativa, fino a che le stesse cellule tumorali non accumulano un numero di mutazioni sufficiente a permetterne l'evasione del meccanismo di controllo immunitario. Concludendo, la presenza di risposte cellulari e umorali anti-tumorali indica che il sistema immunitario ha rilevato la presenza del tumore; tuttavia, lo sviluppo progressivo della neoplasia dimostra che, in ultimo, il tumore ha eluso le difese immunitarie dell'ospite. L'ipotesi che il sistema immunitario contribuisca a "scolpire" tumori caratterizzati da scarsa immunogenicità e da un buon potenziale di sopravvivenza in microambienti infiammati, fu proposta per la prima volta da GP Dunn, LJ Old e RD Schreiber nel 2002 con il nome di *immunoediting*⁷. Altre importanti osservazioni, derivate dalle sperimentazioni sui topi immunodeficienti sopraccitate, contribuiscono a chiarire questo concetto: tumori isolati da topi immunodeficienti sono incapaci di crescere se trasferiti in topi immunocompetenti; tuttavia, tumori derivati da topi immunocompetenti crescono progressivamente se impiantati in animali normali. Quindi, alcuni tumori esprimono Ag in grado di evocare risposte immunologiche dirette contro il tumore: mentre il tumore si sviluppa in topi immunodeficienti, non cresce in animali immunocompetenti. Varianti tumorali, insorte in seguito alla perdita dell'espressione di tali Ag, possono evadere le risposte immunitarie e attecchire in tutti gli animali, indipendentemente dalle condizioni immunologiche. Ciò suggerisce che l'evoluzione del tumore in ospiti con sistema immune competente è associato alla selezione di cellule scarsamente immunogeniche e/o in grado di sfuggire ai meccanismi effettori immuno-mediati che ne consentirebbero il rigetto.

In un lavoro del 2004, Zippelius dimostrava che cellule T Melan-A-specifiche dotate di elevata avidità e attività anti-tumorale erano preferenzialmente attivate ed espanse *in vivo* e andavano accumulandosi nelle lesioni tumorali⁸. Tuttavia, mentre le cellule T circolanti Melan-A-specifiche attivate disponevano di funzioni effettrici intatte, le stesse cellule risiedenti nelle lesioni tumorali erano funzionalmente tolleranti, e nei tessuti metastatici non linfoidi conservavano funzioni effettrici ridotte, esprimendo livelli rilevabili di perforina potenzialmente in grado di mediare una certa attività citotossica. Le principali funzioni effettrici delle cellule T CD8⁺

sembravano condizionate, oltre che dalle proprietà intrinseche di migrazione, anche dall'ambiente tumorale. Inoltre, le cellule T Melan-A-specifiche non producevano interferone γ (IFN- γ) né a livello dei linfonodi metastatici, né dei tessuti metastatici non linfoidi. Dato il ruolo chiave dell'IFN- γ nel complesso fenomeno dell'immunosorveglianza del cancro, è probabile che fosse proprio l'incapacità a produrre questa citochina a ridurre drasticamente il potenziale protettivo dei linfociti T anti-tumoral. L'assenza di cellule T tumore-specifiche funzionalmente attive nei linfonodi metastatici spiegherebbe in particolare il frequente fallimento nell'eliminazione del tumore da parte del sistema immunitario.

I meccanismi che mediano l'immuno-evasione comprendono alterazioni dei meccanismi effettori immunitari e/o l'acquisizione da parte delle cellule tumorali della resistenza all'attacco immunologico: i) le stesse cellule T Ag-specifiche potrebbero essere funzionalmente deficienti, incapaci di migrare al sito tumorale, essere rese energiche o incapaci di differenziare completamente nell'ambiente tumorale; ii) il tumore stesso potrebbe risultare invisibile al sistema immunitario a causa della modulazione negativa delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), spesso concomitante a quella di vari componenti del sistema di processazione e presentazione antigenica (e.g. LMP, Tap) e alla perdita di espressione degli Ag tumorali, specie quelli maggiormente immunogenici⁹⁻¹¹; iii) inoltre, le cellule tumorali possono acquisire resistenza alla lisi da parte dei linfociti T citotossici (CTL)¹², perdere la capacità di andare incontro a morte per apoptosi¹³, indurre l'apoptosi nei linfociti T mediante la via del recettore di morte Fas¹⁴ o ancora, produrre citochine e fattori inibitori della risposta cellulare T, quali TNF- β (*tumour necrosis factor* β) o interleuchina 10 (IL-10)¹⁵ galectina-1¹⁶ e IDO (indoleamina 2,3-diossigenasi;¹⁷); iv) l'ambiente tumorale potrebbe non fornire un segnale di pericolo adeguato o bloccare lo sviluppo di una risposta innata, impedendo così l'evolversi di una reazione infiammatoria¹⁸; v) infine, meccanismi regolatori immunitari possono impedire la generazione e l'attivazione di cellule T effettrici in grado di riconoscere cellule tumorali autologhe^{19, 20}. In questo caso, il tumore induce tolleranza o soppressione dei linfociti T attraverso l'induzione di cellule mieloidi soppressorie (MSC) o il reclutamento di cellule soppressorie, quali le NKT che producono IL-13, o cellule T regolatorie CD4⁺CD25⁺ (Treg).

2. LA VACCINAZIONE ANTI-TUMORALE IN CLINICA

Il fine ultimo della terapia anti-tumorale è l'eradicazione a lungo termine delle cellule maligne, con minimi o assenti danni ai tessuti sani. Gli approcci convenzionali che utilizzano

chemioterapia e radioterapia sono limitati dalla tossicità e mancanza di specificità. Inoltre, in presenza di cellule tumorali metastatiche circolanti, le terapie localizzate sono piuttosto inefficaci. Dalla descrizione del primo TAA umano riconosciuto da CTL²¹, una maggiore comprensione della natura delle risposte immunitarie tumore-specifiche e dei meccanismi di induzione della tolleranza, ha incoraggiato i ricercatori e i clinici a sviluppare approcci terapeutici anti-tumoral immunomediati.

I criteri oncologici sono guide linea per la valutazione delle risposte cliniche nei pazienti sottoposti a terapie anti-tumoral. L'Organizzazione Mondiale della Sanità definì inizialmente come criteri standard di risposta clinica oggettiva un decremento del 50% nella somma dei prodotti dei diametri perpendicolari di tutte le lesioni, in assenza di un aumento superiore al 25% in ogni lesione o della comparsa di nuove lesioni. Tali criteri oggi aggiornati vengono definiti RECIST (criteri di valutazione della risposta nei tumori solidi, *response evaluation criteria in solid tumours*): un decremento del 30% nella somma dei diametri maggiori delle lesioni bersaglio, in assenza di un aumento superiore al 20% in tutte le lesioni o della comparsa di nuove lesioni indica una risposta clinica oggettiva²².

Ad oggi, due fondamentali strategie di induzione dell'immunità anti-tumorale sono state sperimentate sull'uomo: la vaccinazione terapeutica (immunoterapia attiva) e l'immunizzazione passiva.

Vaccini terapeutici. L'immunoterapia attiva ha come scopo l'attivazione e l'espansione del repertorio immunitario endogeno, al fine di indurre l'immunità dell'ospite verso Ag tumorali. La vaccinazione terapeutica veniva praticata già precedentemente all'identificazione degli Ag tumorali, somministrando Ag non noti, nella forma di cellule tumorali inattivate o di lisati cellulari tumorali. In questo tipo di approccio, le cellule presentanti l'Ag (APC) si caricano degli Ag introdotti con il vaccino e migrano ai tessuti linfoidi per stimolare CTL CD8⁺ e cellule T helper (Th) CD4⁺. Dopo l'identificazione degli Ag, è prevalso l'impiego di DC caricate con la proteina o il peptide rilevante o di DC trasfettate con DNA o RNA. Tuttavia, i vaccini più efficaci da un punto di vista terapeutico, in clinica, sono risultati essere peptidi identificati come epitopi antigenici e riconosciuti dai linfociti infiltranti il tumore (TIL). Altre metodiche di vaccinazione prevedono l'utilizzo di virus ricombinati inattivati o molecole di DNA plasmidico contenenti geni codificanti per Ag tumorali (vaccini genetici). L'approccio dell'immunizzazione attiva ha il grande vantaggio di indurre, in caso di successo terapeutico, lo sviluppo di una memoria immunologica duratura, in grado di proteggere da malattia residua minima e ricorrenza del tumore. I vaccini terapeutici anti-tumoral sono

normalmente impiegati nella fase metastatica della malattia per recuperare il controllo del tumore da parte del sistema immunitario^{23, 24}. In base ai criteri oncologici standard, il tasso di risposte oggettive a vaccini anti-tumoriali somministrati a pazienti con cancro presso il Surgery Branch del National Cancer Institute (NCI) dal 1995 al 2004, o ai pazienti compresi in 35 lavori rappresentativi della maggioranza dei *trial* pubblicati, per un totale di 1306 trattamenti, è stato del 3,3%. I vaccini terapeutici oggetto di valutazione comprendevano: peptidi antigenici soli; peptidi emulsionati in adiuvante incompleto di Freund's o in soluzione salina; proteine *heat-shock*; DC caricate con peptidi o lisati tumorali o cellule dendritiche trasfettate con RNA; vaccini virali di derivazione da fowlpox, vaccinia, avipox o adenovirus; DNA nudo codificante l'Ag tumorale.

Immunizzazione passiva. L'immunizzazione passiva consiste nel trasferimento adottivo di anticorpi (Ab) tumore-specifici, fattori immunomodulatori quali citochine, o cellule immunitarie attivate *ex vivo*. Alcuni Ab agiscono direttamente bloccando la via di traduzione del segnale (ad esempio, Ab diretti contro recettori per fattori di crescita) o indirettamente mediando un processo di citotossicità cellulare Ab-dipendente (ADCC). In alternativa, gli Ab possono essere coniugati a molecole radioattive, farmaci chemioterapici o tossine e agiscono come veicoli per trasportare il composto attivo in maniera altamente specifica. I TAA sono difficilmente bersagliabili da questi Ab, a causa della processazione endogena e alla presentazione in associazione a molecole MHC di I classe (MHC-I). Quindi, la maggior parte degli anticorpi anti-tumoriali sono diretti verso TAA di superficie. Sebbene non siano generalmente associate alla generazione di una memoria immunologica, ad oggi le terapie basate su Ab si sono dimostrate le più efficaci tra le strategie immunoterapeutiche, portando alla completa regressione tumorale in una buona frazione di pazienti trattati²³⁻²⁶.

Parallelamente, l'insufficiente efficacia clinica dei vaccini anti-tumoriali attualmente disponibili e la necessità di stimolare la componente cellulare della risposta immunitaria contro il tumore hanno sostenuto, in anni più recenti, la sperimentazione di protocolli di terapia cellulare adottiva (ACT). L'ACT è un approccio di vaccinazione passiva che consiste nella generazione *ex vivo* di linfociti tumore-specifici altamente avidi, e nella loro somministrazione in elevato numero in pazienti portatori di tumore, con lo scopo di introdurre nuove funzioni o di correggere quelle difettive. Ad oggi, quest'ultimo approccio è risultato in un'incoraggiante risposta clinica oggettiva in circa il 50% dei soggetti trattati e, sebbene la casistica sia ancora limitata, gli studi di trasferimento cellulare confermano che un numero elevato di cellule T Ag-specifiche adeguatamente attivate possono causare la regressione di tumori estesi e vascolarizzati in ospiti

linfodepleti. Tuttavia, a quasi 60 anni dalle prime ricerche in questo ambito²⁷, nessun protocollo di terapia ACT è stato ancora approvato dalle autorità competenti. In anni molto recenti, l'ACT ha conosciuto lo sviluppo di diversi nuovi ed interessanti approcci che potrebbero fare del trasferimento adottivo delle cellule T una pratica clinica consolidata nel trattamento dei tumori. L'applicazione di recenti acquisizioni quali il trasferimento adottivo in ospiti linfodepleti, la possibilità di superare la barriera rappresentata da popolazioni immunitarie con funzione regolatoria negativa (Treg, mieloidi soppressorie)^{28, 29} e l'uso di sistemi di coltura implementati³⁰ deve ancora essere valutata in trial clinici randomizzati.

In conclusione, lo scenario prospettato dalle terapie anti-tumorali fino ad oggi valutate in clinica è l'induzione di una risposta immunitaria effettiva, che tuttavia non correla con una significativa risposta clinica. Un grosso limite è rappresentato dal fatto che la valutazione dell'effetto terapeutico di tali approcci di vaccinazione si basa su criteri sviluppati per agenti citotossici, con caratteristiche cliniche differenti rispetto a prodotti biologici eterogenei. Recentemente, il Cancer Vaccine Clinical Trial Working Group, assieme a industrie farmaceutiche e biotecnologiche e alla Food and Drug Administration (FDA) americana, hanno definito nuove linee guida per lo sviluppo dei vaccini terapeutici anti-tumorali, dotati indubbiamente di caratteristiche uniche³¹. La proposta è di investigare nuovi vaccini in due fasi sequenziali: *proof of the principle trials* e *efficacy trials*. La prima fase di sperimentazione ha come scopo la dimostrazione di un principio e dovrebbe comprendere una popolazione omogenea di quasi 20 pazienti in un contesto adiuvante o metastatico, senza che la malattia progredisca troppo velocemente per consentire ai vaccini un tempo sufficiente ad indurre un'attività biologica. Gli obiettivi dovrebbero comprendere la valutazione della sicurezza, la determinazione della dose e del protocollo e la dimostrazione dell'attività biologica, intesa come qualsiasi effetto del vaccino sul bersaglio tumorale e sul sistema immunitario dell'ospite. Se una qualche attività biologica dovesse essere dimostrata nella fase *proof of the principle*, si potrà procedere con la seconda fase o fase di valutazione dell'efficacia. Gli *efficacy trials* dovrebbero essere studi randomizzati e stabilire formalmente un beneficio clinico. Questo tipo di valutazione differisce dai trial di fase 2 a singolo braccio, usati per gli agenti citotossici, che spesso utilizzano il tasso di risposta tumorale come obiettivo primario e controlli storici per l'analisi comparativa.

3. ACT

La dimostrazione più convincente dei benefici clinici dell'immunoterapia adottiva derivano dal trasferimento di cellule T allogeniche in pazienti trapiantati immunosoppressi (DLI)^{32, 33}. L'infusione di linfociti allogenici è la terapia più efficace in pazienti leucemici con ricaduta dopo trapianto di cellule staminali allogeniche e rimane uno dei pochi protocolli di immunoterapia adottiva per cui è riconosciuto un provato potenziale curativo. Molte importanti informazioni sul trasferimento adottivo delle cellule T provengono da studi "pionieristici" di immunoterapia in pazienti con infezioni da cytomegalovirus (CMV), contratto in seguito all'immunosoppressione iatrogena in corso di trapianto di midollo osseo³⁴. In questi casi, l'immunità virale può essere effettivamente ripristinata mediante il trasferimento di cloni cellulari T. Colture di linfociti CMV-specifici venivano generate dai linfociti del sangue periferico (PBL) dei donatori di midollo osseo, mediante stimolazione *in vitro* con fibroblasti infettati da CMV. Singoli cloni CMV-specifici venivano quindi isolati ed espansi *in vitro* e, in ultimo, trasferiti al ricevente del midollo per profilassi. Questi cloni cellulari T CD8⁺ CMV-specifici si sono dimostrati efficaci nella prevenzione di infezioni acute durante il periodo successivo al trapianto. I cloni trasferiti non persistevano in tutti i pazienti e la ricostituzione endogena dell'immunità antivirale CD4⁺ correlava con la persistenza delle cellule T CD8⁺. Recentemente lo sviluppo della tecnologia dei tetrameri ha reso più facile isolare cellule T specifiche per particolari Ag, in questo caso CMV: al momento attuale, una procedura di selezione di sole 4 ore produce cellule T CD8⁺ specifiche, purificate dal donatore del trapianto e pronte per l'infusione diretta. Le cellule T CMV-specifiche si espandono a livelli rilevabili in tutti i pazienti entro 10 giorni dall'infusione³⁵ e *in vivo* riducono o eliminano la viremia. La miglior dimostrazione di efficacia clinica dei protocolli ACT è probabilmente rappresentata dal trasferimento adottivo di CTL e linee cellulari T specifiche per il virus di Epstein-Barr (EBV) per la terapia di linfomi EBV-indotti (PTLD), un'altra principale complicazione dei trapianti di midollo osseo allogenico. In questo caso, infusioni di cellule T allogeniche EBV-specifiche possono non solo trattare³⁶, ma anche prevenire interamente lo sviluppo delle PTLD³⁷. Tuttavia, l'incidenza di linfomi EBV-indotti che insorgono in pazienti immunosoppressi è stata drasticamente ridotta anche dagli avanzamenti nelle terapie che utilizzano Ab CD20-specifici (Rituximab).

La sfida più ardua della metodica ACT è rappresentata dai tumori solidi, meno suscettibili all'attacco del sistema immunitario rispetto alle neoplasie linfoidi. I TAA sono meno immunogenici degli Ag virali e, in generale, i pazienti con tumore sono immunocompromessi o per la malattia stessa o per il trattamento ricevuto. In passato si sono spesso utilizzati linfociti T attivati ed espansi

in maniera non specifica, quali *lymphokine-activated killer cells* (LAK) o PBL attivati *in vitro* con anticorpi anti-CD3, per curare pazienti con cancro metastatico^{38, 39}. Il basso tasso di risposta osservato in questi studi clinici e i dati dalla sperimentazione su modelli animali indicano che l'impiego di linfociti Ag tumorali-specifici è cruciale per trattare con successo pazienti con neoplasie solide. Attualmente, il pannello di bersagli antigenici è stato fortemente ampliato per molti tumori (<http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/>⁴⁰) e notevoli sono stati gli avanzamenti nell'ambito delle tecnologie per la coltura *in vitro* dei linfociti T. Recentemente, l'approccio del trasferimento adottivo di cellule T tumore-specifiche ha dimostrato una buona potenzialità terapeutica in pazienti con melanoma in stadio avanzato⁴¹.

4. OTTIMIZZAZIONE DELLE FUNZIONI CELLULARI T PER **PROTOCOLLI ACT**

Gli attuali protocolli clinici di ACT utilizzano fino a 10^{11} cellule T tumore-reattive, policlonali ed altamente avide, espanse da TIL, o più raramente da cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC)⁴². Il trasferimento di CTL derivati da PBL (*peripheral blood lymphocytes*) non ha dato fino ad oggi risultati incoraggianti^{43, 44}. Per i pazienti con melanoma, si sono ottimizzate colture di TIL che generano cellule T tumore-reattive altamente avide, espanse rapidamente mediante anticorpi anti-CD3, IL-2 fornita esogenamente e PBMC allogenicici irradiati come cellule feeder. Linee indipendenti di TIL vengono selezionate sulla base di un'elevata attività citotossica e di secrezione di IFN- γ , dopo co-coltura con linee tumorali autologhe o allogeniche MHC-matched. I pazienti vengono sottoposti ad un regime di preconditionamento linfodepletante, non mieloablativo, prima del trasferimento adottivo dei linfociti anti-tumorali (Fig. 1). Per poter definire condizioni ottimali di manipolazione *in vitro* dei linfociti T è necessario comprendere i meccanismi in base a cui gli stessi linfociti, trasferiti adottivamente, possono mediare la distruzione del tumore, persistere *in vivo* e conferire un'immunità a lungo termine. Diversi modelli e trial sono andati definendo le caratteristiche che le colture linfocitarie infuse devono possedere per incrementare l'efficacia immunoterapeutica nei confronti di tumori stabilizzati, nel topo o nell'uomo. Tra i principali fattori in grado di condizionare l'esito di un approccio di ACT vi sono il potenziale proliferativo, legato alla stadio di differenziazione dei clonotipi cellulari T, la capacità delle cellule T di raggiungere il sito tumorale, l'avidità relativa dei TCR (T-cell receptor). In particolare, alcuni lavori hanno

chiaramente dimostrato che esiste una correlazione diretta tra l'efficacia del trattamento e il numero di cellule T CD8+ trasferite, essendo tali cellule T linfociti tumore-specifici ad elevata affinità⁴⁵⁻⁴⁷.

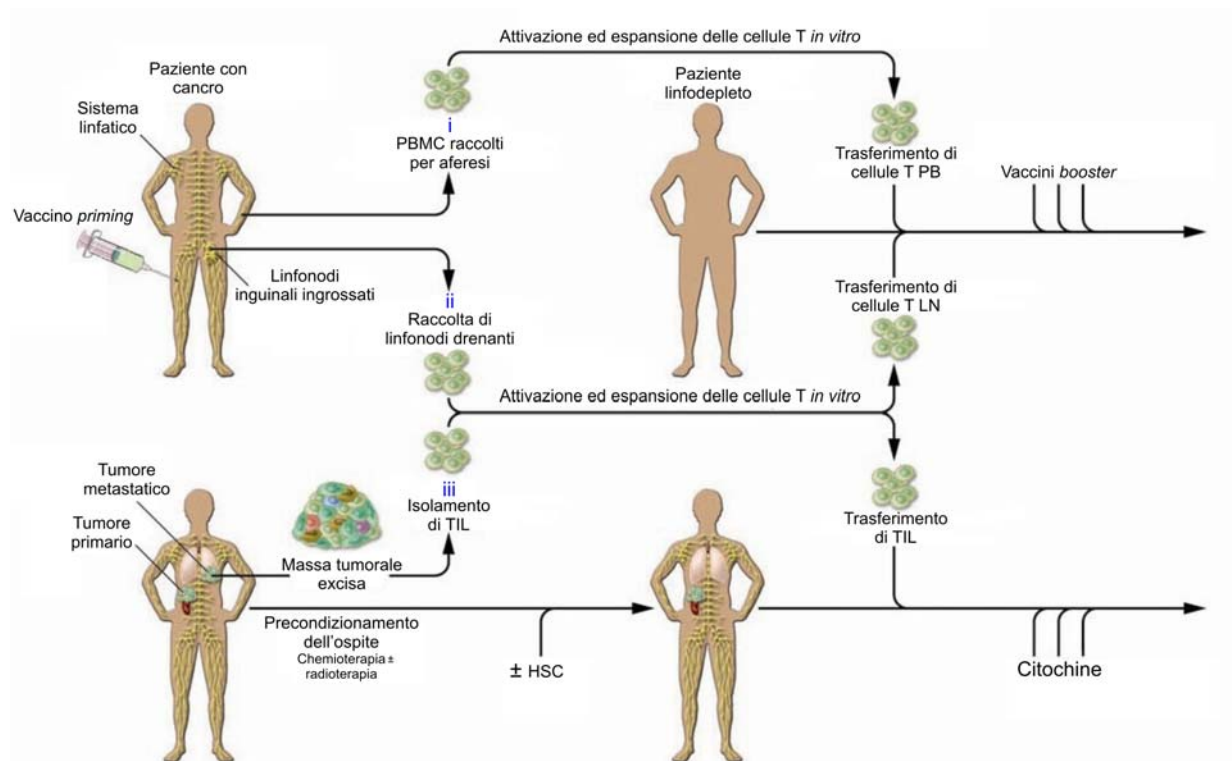


Figura 1. Protocolli per il trasferimento adottivo di linfociti T autologhi, attivati mediante vaccinazione ed espansi *in vitro*. Prima della raccolta dei linfociti, i pazienti vengono sottoposti a vaccinazione tumorale. Le cellule T, ottenute dal sangue periferico (i) o dai linfonodi drenanti (ii), vengono attivate ed espansi in maniera policlonale *in vitro* e successivamente reinfusi dopo chemioterapia linfodepletante. La funzione immunitaria Ag-specifica viene valutata dopo la somministrazione di vaccini stimolanti. (iii) I TIL possono essere isolati da tumori asportati chirurgicamente ed espansi *in vitro* per il trasferimento adottivo dopo chemioterapia linfodepletante. La maggior parte dei protocolli di trasferimento adottivo che utilizzano TIL prevedono anche infusioni di IL-2 dopo il trasferimento dei linfociti T, allo scopo di selezionare cellule T tumore-specifiche. *Immagine tratta e modificata da*⁴⁸.

4.1 Regime di precondizionamento

Come già anticipato da studi preclinici, l'ablazione immune rappresenta un regime di precondizionamento molto efficace, in grado di implementare la risposta T cellulare dopo

trasferimento adottivo⁴⁹. La chemioterapia sistemica linfodepletante con ciclofosfamide e fludarabine, prima del trasferimento adottivo dei linfociti T, ha indotto la consistente regressione tumorale ottenuta nei recentissimi lavori di ACT su pazienti con melanoma esteso multiviscerale, refrattario a trattamenti standard, compresi chemioterapia, radiazioni e trattamento con citochine^{41, 50}. Uno studio pubblicato nel settembre del 2007 da Paulos e collaboratori descrive per la prima volta i fini meccanismi responsabili della dimostrata implementazione dei protocolli di ACT da parte dei regimi linfodepletanti. Tali meccanismi comprendono la rimozione di linfociti inibitori e di *cytokines sinks*, l'aumento del livello di citochine omeostatiche e l'attivazione del sistema immunitario innato⁵¹ (Fig. 2).

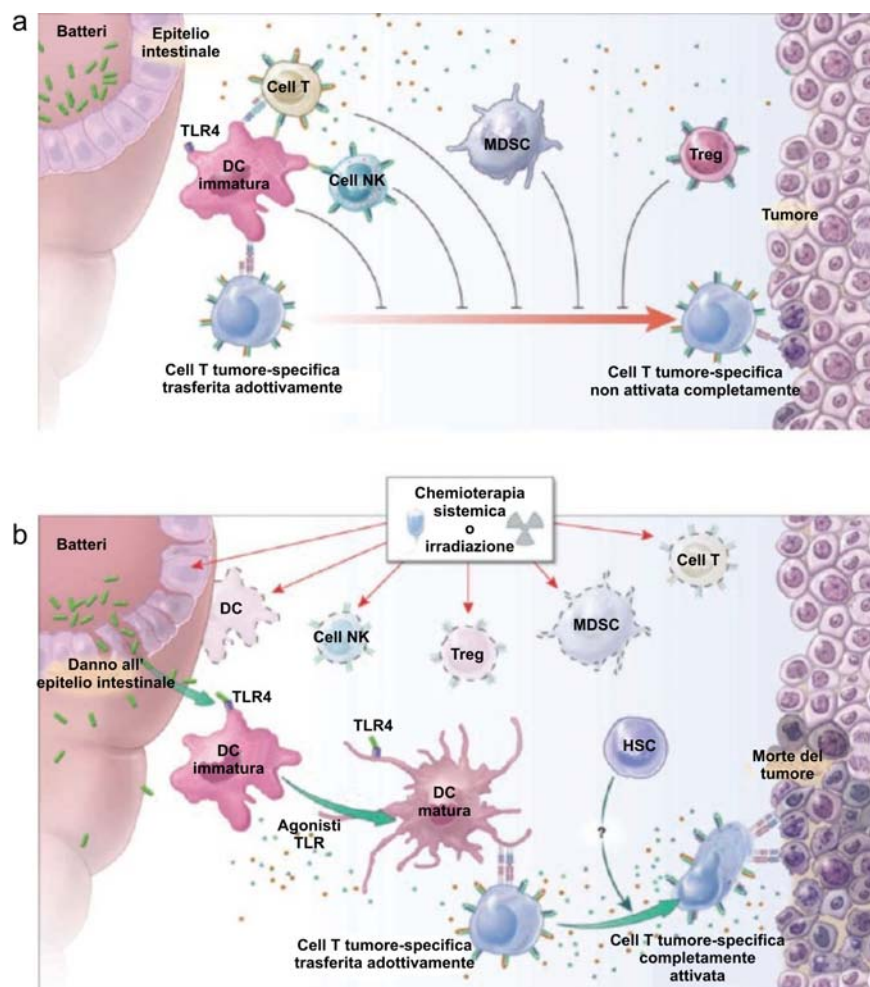


Figura 2. Terapia cellulare adottiva in un ospite linfodepletato. (a) In presenza di un sistema immunitario pienamente funzionale, le risposte indotte da cellule T trasferite adottivamente sono ostacolate dalla ridotta disponibilità di citochine omeostatiche (incluse IL-2, IL-7 e IL-15) a causa della competizione con le altre cellule immunitarie (*cytokine sinks*), e dall'attività soppressoria delle cellule Treg, MDSC, monociti

quiescenti e DC, e probabilmente cellule NK. **(b)** La chemioterapia sistemica o la radiazione prima del trasferimento adottivo alterano questa condizione nei soggetti portatori di tumore. A causa dell'uccisione diretta, le APC sono ridotte in numero; tuttavia, potrebbe verificarsi un netto incremento dell'attivazione linfocitaria a causa della ridotta competizione per l'Ag alla superficie delle restanti APC. Allo stesso tempo, come risultato della traslocazione di LPS microbico dopo danneggiamento chemio- o radio-indotto dell'epitelio intestinale, le DC maturano e migrano al linfonodo tramite segnalazione via TLR4. Citochine attivanti e infiammatorie e TNF- α aumentano per l'assenza di *sink* cellulari e per la concomitante attivazione del sistema innato. Complessivamente queste alterazioni promuovono la piena attivazione delle cellule T trasferite adottivamente e la distruzione del tumore. *Immagine tratta e modificata da*⁵¹.

Deplezione di cellule regolatorie. La linfodeplezione prima del trasferimento adottivo delle cellule T può ridurre il numero di cellule T regolatorie CD25⁺FoxP3⁺ Treg^{52, 53}. Le cellule Treg mantengono la tolleranza agli Ag *self* bloccando la funzionalità delle cellule T effettrici^{54, 55} e sono iper-rappresentate in lesioni tumorali di pazienti con melanoma e tumore ai polmoni^{29, 56}. Inoltre, sono state descritte cellule Treg specifiche per Ag di melanoma⁵⁷. Tali cellule possono quindi ostacolare consistentemente l'attività delle cellule trasferite in protocolli di ACT. Altre linee cellulari immunitarie possono indurre la disfunzione dei linfociti T e favorire la crescita del tumore: cellule NK e NKT, il cui ruolo immunosoppressivo non è stato ancora del tutto chiarito, e cellule MSC⁵⁸, in grado di infiltrare il tumore e inibire le risposte T cellulari mediante meccanismi di contatto diretto con le cellule T tumore-reattive e rilascio di prodotti del metabolismo dell'L-arginina⁵⁹.

Rimozione di citochine sinks. La linfodeplezione aumenta in parte l'efficacia delle cellule T trasferite eliminando il comparto linfoide che consuma citochine omeostatiche e aumentando di conseguenza la disponibilità di citochine che legano recettori a catena- γ quali IL-2, IL-7, IL-15 e citochine infiammatorie, come IL-6 e IL-12 e il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α).

Attivazione dell'immunità innata via trasferimento di microbi. Studi condotti presso il laboratorio di Restifo all'NIH, hanno dimostrato che il danno indotto all'intestino in topi irradiati permette la traslocazione dei microbi dai linfonodi mesenterici e il rilascio sistemico di lipopolisaccaridi (LPS) di derivazione batterica⁵¹. La traslocazione batterica risulta così nell'attivazione del sistema immunitario innato, come indicato dall'aumento di DC spleniche CD11c⁺CD86^{hi}, a loro volta in grado di attivare i linfociti T trasferiti⁶⁰. Inoltre, nel siero di topi irradiati si sono osservati livelli più alti di citochine pro-infiammatorie IL-1 β , IL-6 e TNF- α e di IL-12, che amplifica l'attività funzionale delle cellule T CD8⁺⁵¹. L'LPS, il principale mediatore dell'effetto dell'irradiazione, lega la proteina solubile legante LPS (LBP) e, interagendo con il recettore TLR4 sulla superficie delle APC, induce la produzione di citochine pro-infiammatorie, la modulazione positiva dell'espressione di molecole costimolatorie e di MHC-II sui fagociti⁶¹⁻⁶⁴.

LPS esogeno da solo, somministrato ad animali non irradiati e trattati con terapia cellulare adottiva, non media la regressione di tumori B16 estesi, stabilizzati, nonimmunogenici, rispetto a topi linfodepleti irradiati con 5 Gy⁵¹. La distruzione di tumori estesi in topi non irradiati è possibile solamente riproducendo tutti e tre i meccanismi che spiegano l'efficacia dell'irradiazione corporea (rimozione di cellule immunosoppressive e *cytokine sinks* e attivazione dell'immunità innata). Sulla base di tali meccanismi, reagenti alternativi potrebbero essere utilizzati in combinazione, per aumentare il potenziale di efficacia anti-tumorale delle cellule T trasferite nell'uomo ed eliminare la tossicità associata all'utilizzo di regimi di preconditionamento non specifici basati su agenti chemioterapeutici e irradiazione.

Dati preclinici dimostrano che aumentando l'intensità della linfodeplezione fino ad uno stadio mieloablativo, che richiede il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSC), si incrementerebbe ulteriormente l'efficacia del trasferimento cellulare adottivo. Questo approccio è già stato inserito in protocolli clinici sperimentali condotti all'NIH, attualmente in corso di valutazione⁶⁵⁻⁶⁷. Risultati preliminari indicano che nei pazienti pretrattati con agenti chemioterapici, in associazione ad irradiazione corporea (*total body irradiation*, TBI) di 200 cGy o 1200 cGy (6 dosi di 200 cGy TBI, due volte al giorno per 3 giorni) e trapianto HSC si inducono risposte durature.

4.2 Persistenza in vivo dei linfociti T

I recenti trial clinici su pazienti con melanoma metastatico refrattario ad altri trattamenti terapeutici hanno dimostrato che la terapia cellulare adottiva con TIL autologhi, dopo regime di chemioterapia condizionante, linfodepletante non mieloablativa, può indurre la regressione di tumori estesi e vascolarizzati in circa il 50% dei pazienti con melanoma metastatico^{41, 50}. In alcuni pazienti regressori, i linfociti anti-tumoralis infusi si sono consistentemente espansi *in vivo*, fino a rappresentare più del 70% dei linfociti totali del sangue periferico, per più di 5 mesi dal trasferimento. Complessivamente, circa un terzo dei pazienti hanno beneficiato di una regressione tumorale duratura. Robbins e colleghi hanno studiato il rapporto tra la persistenza delle cellule T e la regressione tumorale attraverso l'analisi di sequenza dei prodotti genici della regione variabile della catena β del TCR, espressi nei campioni ottenuti da 25 pazienti, infusi con circa lo stesso numero di linfociti totali⁶⁸. L'analisi di sequenza ha dimostrato che la risposta clinica non correlava con la percentuale di cellule T CD8⁺ tra i TIL, con le proprietà di riconoscimento di Ag tumorali noti o cellule tumorali autologhe, con il periodo di coltura *in vitro*, con il tasso di proliferazione

prima del trasferimento, o con caratteristiche generali del paziente quali l'età, il sesso o il sito dei focolai tumorali rilevabili. L'unica significativa corrispondenza emersa è stata quella tra la regressione tumorale e il grado di persistenza nel sangue periferico dei clonotipi T trasferiti adottivamente. In conclusione, l'inadeguata persistenza T cellulare potrebbe rappresentare uno dei maggiori fattori limitanti le risposte all'immunoterapia adottiva.

4.3 Stadio differenziativo dei linfociti

Tra i vantaggi della metodica di ACT in immunoterapia vi è il trasferimento di cellule con proprietà fenotipiche e funzionali prescelte. Attualmente, il solo criterio di selezione dei linfociti da trasferire nei pazienti con tumori solidi è la capacità delle cellule T di produrre IFN- γ e lisare le cellule tumorali dopo cocoltura⁶⁹. Tuttavia, cloni T CD8⁺, caratterizzati e selezionati *in vitro* sulla base di questi parametri, non hanno indotto alcuna risposta clinica oggettiva dopo trasferimento adottivo^{41,70,71}. Grazie all'analisi fenotipica *ex vivo* di cellule T virus-specifiche⁷², al calcolo della lunghezza dei telomeri⁷³, e allo studio dei profili di espressione genica e di differenziazione *in vitro*⁷⁴ è stato definito il processo di progressivo differenziamento cui vanno incontro le cellule T attivate ed espanse in coltura. Secondo il modello di "progressione-differenziamento" proposto da Antonio Lanzavecchia e Federica Sallusto⁷⁵, l'attivazione dei linfociti T vergini induce la proliferazione e il differenziamento attraverso stadi di cellule effettrici precoci, intermedie e tardive, in maniera dipendente dalla forza della stimolazione. In particolare, le cellule T accumulano e integrano i segnali provenienti dal TCR, dalle molecole costimolatorie e dai recettori per citochine. All'aumentare della soglia della forza del segnale, le cellule T proliferano, acquisiscono potenzialità di sopravvivenza, responsività alle citochine omeostatiche, funzioni effettrici e capacità di migrare ai tessuti periferici, e muoiono per morte cellulare indotta da attivazione. L'esposizione stocastica ad APC e citochine risulta in differenti livelli di stimolazione e genera livelli di differenziamento diversi. Dopo la rimozione dell'Ag, le cellule T attivate sono selezionate per la capacità di sopravvivere in presenza di citochine omeostatiche e costituiscono popolazioni distinte di cellule della memoria. Le cellule T della memoria rappresentano cellule arrestate in uno stadio intermedio di differenziazione, in grado di proliferare e differenziare ulteriormente in caso di stimolazione antigenica acuta o cronica. In risposta a stimoli Ag-indipendenti, proliferano e si differenziano con un tasso ridotto, mantenendo una riserva stabile di linfociti T effettrici. Nel topo e nell'uomo, le cellule T CD8⁺ della memoria possono essere mantenute in due sottopopolazioni fenotipicamente e funzionalmente distinte⁷⁶. Le cellule T della memoria centrali (*central memory*) (CC chemokine

receptor 7^+ [CCR7 $^+$], CD62L $^+$, migrano preferenzialmente ai linfonodi, producono IL-2 e mancano di funzioni effettrici immediate. Queste cellule sono responsabili delle risposte secondarie o croniche all'Ag. Le cellule T effettrici della memoria (*effector memory* CCR7, CD62L $^-$), circolano nel sangue periferico e nei tessuti, esprimono perforina, ed esplicano funzioni effettrici immediate. E' stato proposto per le cellule effettrici della memoria un'origine dalle *central memory*. Alternativamente, questo sottotipo della memoria potrebbe svilupparsi come progenie indipendente da precursori cellulari effettori⁷⁷.

Ogni stadio differenziativo delle cellule T CD8 $^+$ è associato a proprietà fenotipiche e funzionali distinte. Cellule effettrici precoci mostrano un profilo in parte sovrapponibile a quello delle cellule vergini, caratterizzato da livelli ancora elevati di molecole di *homing* ai linfonodi CD62L, integrina α_E , e CCR7, la molecola costimolatoria CD27 e la subunità α del recettore dell'IL-7 (IL-7 *receptor* α , IL-7R α). Stimolazioni ripetute *in vitro* comportano un differenziamento progressivo verso lo stato di cellule T CD8 $^+$ effettrici mature, come indicato dalla progressiva modulazione negativa delle molecole CD62L, CCR7, $\beta 7$ integrina, e CD27 e dal concomitante aumento dei livelli di espressione di CD44, CD69, CD25 e granzima B. Linfociti T altamente differenziati overesprimono alcuni geni codificanti molecole proapoptotiche, in grado di pregiudicare la sopravvivenza cellulare⁷⁸⁻⁸⁰. Cellule T effettrici intermedie esprimono alti livelli di molecole associate alla senescenza replicativa⁸¹ e il fattore di mortalità mrx, suggerendo un potenziale replicativo limitato anche per queste cellule⁸². L'acquisizione di un fenotipo di tipo effettore è inoltre associato all'aumentata espressione di molti geni responsabili dell'attività funzionale cellulare, quali granzimi, perforina, IFN- γ , e Fas-ligando. Come atteso sulla base del profilo di espressione genica, le cellule T effettrici vanno incontro ad un incremento dell'attività citolitica e di rilascio di IFN- γ e a un decremento nella produzione di IL-2.

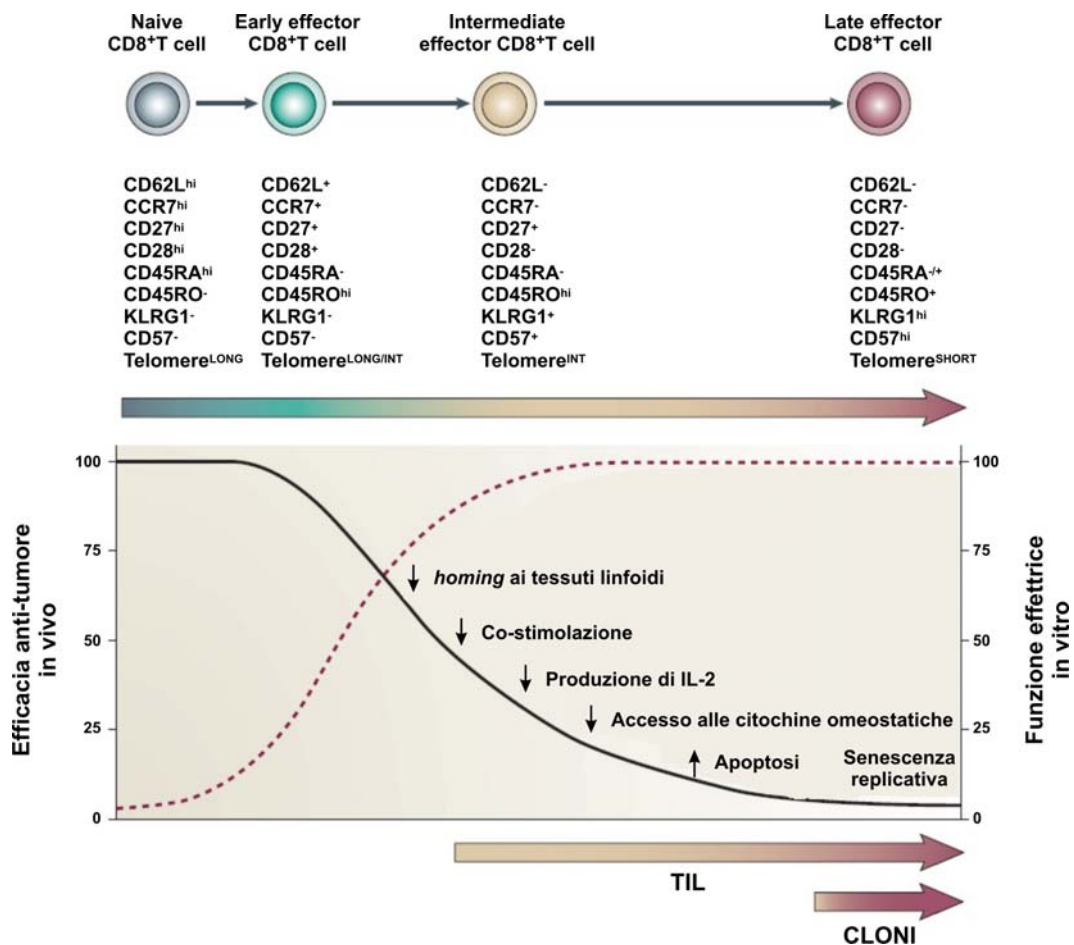


Figura 3. Relazione inversa delle funzioni anti-tumorali *in vitro* e *in vivo* di sottotipi T cellulari vergini ed effettori, trasferiti adottivamente. All'aumentare della forza della stimolazione, le cellule T CD8⁺ vergini (*naive CD8⁺ T cell*) proliferano e si differenziano progressivamente attraverso stadi effettori precoci (*early effector CD8⁺ T cell*), intermedi (*intermediate effector*) e tardivi (*late effector*). I cambiamenti fenotipici e funzionali che caratterizzano questo processo sono rappresentati come assenza di espressione (-), espressione intermedia (+) ed espressione elevata (hi) dei diversi marcatori. La progressiva acquisizione di piene funzioni effettrici (linea tratteggiata) è associata ad una ridotta abilità delle cellule T di indurre regressione del tumore dopo trasferimento adottivo (linea continua). Immagine tratta e modificata da⁸³.

Inaspettatamente, la progressiva acquisizione di piene funzioni effettrici è associata ad una corrispondente diminuzione della capacità di indurre regressione tumorale dopo trasferimento adottivo, come emerso da studi su alcuni modelli murini e di trapianto allogenico HSC^{47,74,84,85} (Fig. 3). Tra i meccanismi coinvolti sono stati descritti la modulazione negativa di molecole costimolatorie e di migrazione ai linfonodi e, in un secondo momento, l'incapacità di produrre IL-2 e di avere accesso alle citochine omeostatiche, lo squilibrio tra segnali pro- e anti-apoptotici e infine l'acquisizione di uno stato di senescenza replicativa. Alla luce di queste considerazioni, è evidente che i cloni T CD8⁺, essendo cellule T differenziate in maniera terminale, possiedono potenti

funzioni effettrici, ma hanno esaurito potenziale proliferativo e di sopravvivenza. E' noto, tuttavia, che cloni cellulari T trasferiti adottivamente possono impedire complicazioni da infezioni con Citomegalovirus (CMV) in pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo⁸⁴. I TIL CD8⁺ tumore-specifici, trasferiti adottivamente per ACT, vengono generalmente stimolati *ex vivo* con anticorpi anti-CD3 e cresciuti in eccesso di IL-2 per circa 14 giorni. Al momento dell'infusione i TIL esprimono un fenotipo CD27^{Lo} CD28^{Lo} CD45RO⁺ CD62L⁻ CCR7⁻ IL-7R α ^{Lo}⁸⁶. Uno studio condotto dal gruppo di Steven Rosenberg su un campione di 6 pazienti con melanoma, inseriti nel trial sopracitato e responsivi alla terapia ACT, descrive la transizione fenotipica delle cellule T CD8⁺ dopo trasferimento *in vivo*⁸⁶. In alcuni pazienti con significativa regressione tumorale, si è riscontrata una consistente linfocitosi, immediatamente dopo l'infusione. A questa è seguita una fase di contrazione della popolazione effettrice, infine la persistenza a lungo-termine di una popolazione clonale di cellule T CD8⁺ melanoma-reattive nel sangue periferico. Lo studio dei clonotipi T CD8⁺ di specificità antigenica nota persistenti nei 6 pazienti regressori dopo l'infusione ha dimostrato la transizione *in vivo* dei cloni T CD8⁺ da uno stadio effettore tardivo (CD27⁻ CD28⁻CD45RA⁻) a un fenotipo effettore della memoria (CD27⁺ CD28⁺ CD45RA^{INT}). TIL espansi *ex vivo* mancano dell'espressione di CCR7 e CD62L e persistono come cellule T CD8⁺ effettrici della memoria CCR7⁻ e CD62L⁻ circolanti *in vivo* dopo trasferimento adottivo. E' possibile che cellule *central memory* CCR7⁺ e CD62L⁺ non siano rilevabili nel sangue periferico a causa della preferenziale migrazione agli organi linfoidi. Oppure, il mantenimento di cellule T CD8⁺ *effector memory* nei pazienti riceventi TIL Melan-A-specifici potrebbe essere sostenuto da una stimolazione cronica mediata dai melanociti che esprimono Melan-A a bassi livelli. La quasi totalità delle cellule T CD8⁺ tumore-reattive circolanti esprime inoltre IL-7R α a breve distanza dalla somministrazione dei TIL, che non lo esprimono o lo esprimono debolmente. Inoltre, la frequenza di cellule CD28⁺ circolanti aumenta una settimana dopo il trasferimento adottivo. In conclusione, questo studio dimostra la sopravvivenza a lungo termine di una popolazione clonale CD8⁺ CD27⁺ CD28⁺ CD45RA^{int} CD45RO⁺ CD62L⁻ CCR7⁻ IL-7 α antigene-specifica in pazienti che vanno incontro a regressione tumorale *in vivo*.

Le caratteristiche fenotipiche e funzionali dei linfociti T CD8⁺ responsabili della regressione tumorale *in vivo* sono state chiarite anche da esperimenti condotti su un modello murino di ACT, basato su topi pmel-1 (topi transgenici per un TCR anti-gp100, Ag di differenziazione melanocitario)⁷⁴. In breve, melanomi stabilizzati B16 venivano trattati trasferendo adottivamente cellule T CD8⁺ anti-gp100 derivate da topi pmel-1 e ristimate *in vitro*. Il numero di stimolazioni

in coltura delle cellule T era associato ad un particolare stadio differenziativo, noto al momento dell'inoculo. Questo studio ha associato in maniera diretta il destino *in vivo* dei linfociti T trasferiti a precise caratteristiche cellulari.

L'espressione di molecole di *homing* ai linfonodi, quali CD62L, consente alle cellule T trasferite di migrare ai tessuti linfoidei secondari, dove possono efficientemente interagire con APC professionali⁷⁴. Non si esclude comunque la possibilità che la migrazione ai linfonodi non sia richiesta in presenza di tumori altamente immunogenici. In questo caso, cellule T differenziate in maniera terminale, potrebbero ugualmente esercitare una potente attività anti-tumorale direttamente sulle cellule bersaglio dopo l'infusione.

L'interazione di CD28 con CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) sulle APC amplifica l'attivazione e la proliferazione TCR-mediata delle cellule T CD8⁺^{87,88} e correla con l'induzione dell'enzima telomerasi⁸⁹. Analogamente, l'interazione di CD27 con il suo ligando CD70 incrementa la proliferazione cellulare T TCR-mediata ed è inoltre richiesta per la generazione e il mantenimento delle cellule T della memoria *in vivo*⁹⁰; la negatività per CD27 definisce, al contrario, una popolazione di cellule T effettrici differenziate in maniera terminale. La stimolazione ripetuta via TCR risulta, a lungo termine, nella modulazione negativa dell'espressione di entrambe le molecole CD28 e CD27^{91,92}.

Le citochine omeostatiche, quali IL-7 e IL-15, sostengono l'attivazione e la proliferazione dei linfociti, svolgendo un ruolo cruciale nell'ambito delle risposte anti-tumorali in ACT⁹³. In particolare, l'IL-7 è critica per la generazione e la sopravvivenza delle cellule T CD8⁺ della memoria, e l'espressione di IL-7R α identifica cellule T CD8⁺ effettrici in transizione a cellule T della memoria di lunga vita⁹⁴. Anche l'IL-15 ha un ruolo di supporto nella sopravvivenza e nella proliferazione delle cellule T trasferite adottivamente⁹⁵; tuttavia, IL-15R α è debolmente espresso dai TIL impiegati in ACT e non si trova modulato sulle cellule T tumore-specifiche persistenti dopo trasferimento. La segnalazione via IL-15 potrebbe comunque verificarsi mediante presentazione *in trans* dell'IL-15 da parte delle APC e delle cellule stromali, un processo per cui IL-15R α presenta IL-15 attiva, *in trans*, alle cellule opposte che esprimono un complesso a bassa affinità per IL-15.

In ultimo, l'accorciamento dei telomeri, osservato per cellule T che differenziano da cellule T vergini a T della memoria durante la fase di consistente espansione *in vitro*, riduce la capacità replicativa dei TIL e correla con la persistenza *in vivo* delle cellule T dopo trasferimento adottivo⁸⁹.

4.4 Sistemi di coltura

Da quanto esposto emerge che i linfociti ideali in ACT sono cellule scarsamente differenziate di tipo *central memory*. Questo assunto impone la ricerca di protocolli di coltura ed espansione *in vitro* differenti dagli attuali. Un primo obiettivo è la riduzione della fase di manipolazione *ex vivo*, che comporta la generazione di cellule T in uno stadio di differenziazione intermedio/tardivo. Tuttavia, tempi inferiori in fase di espansione limitano il numero di cellule totali disponibili per il trasferimento, ed è noto che l'efficacia *in vivo* dei protocolli di ACT aumenta all'aumentare del numero di cellule T tumore-reattive trasferite⁴⁷. Fino ad oggi si sono impiegate diverse metodiche di stimolazione *ex vivo* dei linfociti: fitoemoagglutinina (PHA), Ab monoclonali (mAb) anti-CD3, mAb anti-CD28, anticorpi legati a biglie immunomagnetiche, IL-2 e citochine omeostatiche. In tutti questi casi, la competenza immunologica delle cellule espanse rimane fortemente compromessa. Il fenotipo della memoria rappresenta ancora la sottopopolazione predominante e il rapporto CD4/CD8 risulta invertito o perlomeno ridotto^{96,97}. Alcuni autori sostengono l'importanza di identificare citochine alternative all'IL-2, attualmente impiegata nella fase di rapida espansione *in vitro* che precede l'infusione nel paziente. Le osservazioni condotte su modelli murini suggeriscono che altri fattori di crescita, come l'IL-15, potrebbero indurre le cellule T a proliferare in coltura pur mantenendo uno stadio differenziativo precoce, assicurando quindi una superiore regressione tumorale se confrontate con cellule espanse in presenza di IL-2⁷⁴. Considerazioni analoghe sono state avanzate per differenti citochine che impiegano la catena comune γ_c nel loro recettore, quali l'IL-7 e l'IL-21, analogamente deputate all'omeostasi cellulare T⁸³.

5. INGEGNERIZZAZIONE DELLE CELLULE T

Attualmente, l'obiettivo di molti gruppi di ricerca è attivare il sistema immunitario endogeno contro il cancro, con la speranza di giungere presto a terapie efficaci in clinica. Tuttavia, un filone parallelo continua ad incoraggiare le sperimentazioni di approcci alternativi, non interamente fondati su componenti immunitarie endogene. Tali approcci consistono precisamente nella

modificazione genetica delle cellule T naturali per generare cellule T dalle proprietà implementate. L'ingegnerizzazione dei linfociti T può aumentare la funzionalità dei linfociti stessi attraverso diversi meccanismi cellulari indipendenti, quali l'espressione di molecole suicida, l'aumento della sopravvivenza e l'espressione di un TCR anti-tumorale.

Espressione di molecole suicida. Una severa e potenzialmente letale *graft versus host disease* (GVHD) rappresenta una complicazione frequente dell'immunoterapia allogenica e della DLI. L'espressione del gene timidina chinasi del virus herpes simplex (HSV-TK) nelle cellule T consente di eliminare *in vivo* le cellule trasdote mediante la somministrazione di acyclovir o ganciclovir⁹⁸. L'approccio dell'HSV-TK sembra promuovere la ricostituzione immune e preserva gli effetti anti-tumorali delle cellule T trasferite adottivamente in soggetti immunosoppressi⁹⁹. Un recente trial clinico di fase II ha confermato ed esteso dati precedenti, dimostrando ulteriormente la sicurezza e la realizzabilità del trasferimento adottivo di cellule T del donatore trasdote con geni suicida¹⁰⁰. Questo approccio potrà essere esteso anche a soggetti immunocompetenti quando verranno sviluppati vettori codificanti proteine meno immunogeniche (ad esempio proteine endogene), in grado comunque di conferire alle cellule T trasdote un'elevata sensibilità a farmaci che ne inducano la morte.

Potenziamento della sopravvivenza. Un limite dell'ACT è che le cellule T CD8⁺ non persistono a lungo nell'ospite in assenza dell'infusione di cellule Th e/o citochine. Allo scopo di aumentare l'emivita dei CTL circolanti e di conseguenza la loro efficacia anti-tumorale, è stata proposta l'ingegnerizzazione delle cellule T con recettori chimerici GM-CSF-IL-2 che inviano il segnale dell'IL-2 quando legano GM-CSF¹⁰¹: i CTL stimolati dall'Ag secernono GM-CSF e innescano un circuito autocrino che consente ai CTL di proliferare anche in assenza di citochine. Strategie analoghe prevedono di trasdurre i linfociti T con citochine proinfiammatorie e omeostatiche^{102,103}, con CD28¹⁰⁴, con la subunità catalitica della telomerasi¹⁰⁵ o molecole anti-apoptotiche¹⁰⁶.

Generazione di cellule con specificità anti-tumorale. Molti studi hanno dimostrato la possibilità di trasferire adottivamente l'immunità cellulare mediante linfociti T trasdotti con geni codificanti TCR di desiderata specificità. In particolare, il conferimento della reattività contro Ag tumorali a cellule T scarsamente differenziate, di tipo *central memory*, è potenzialmente realizzabile mediante trasduzione di PBL, di cellule T vergini o di cellule HSC (Fig. 4).

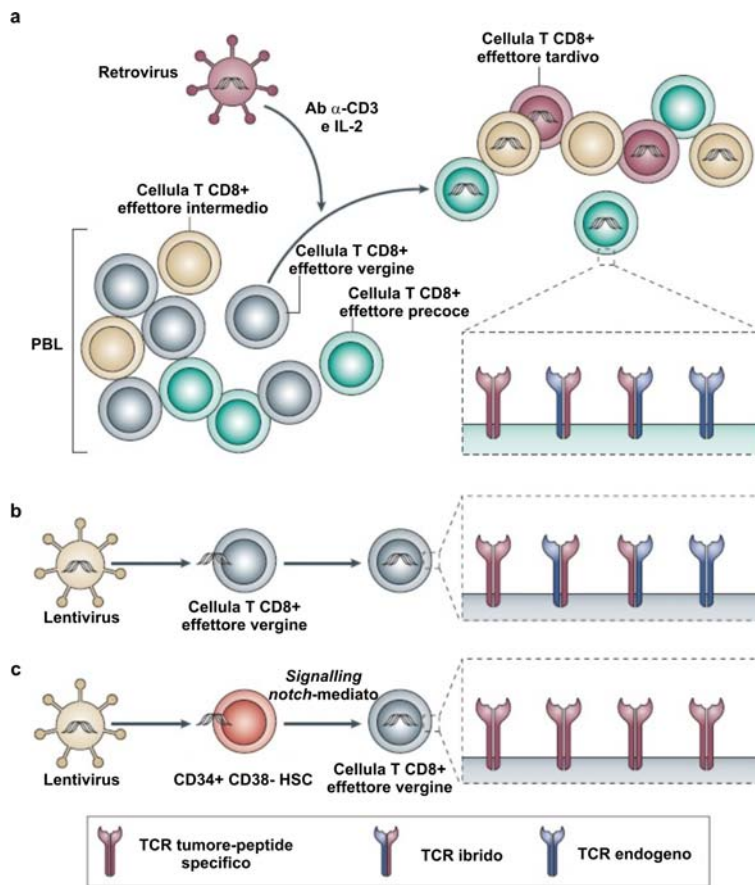


Figura 4. Generazione di cellule T CD8⁺ Ag tumorale-specifiche poco differenziate, di tipo *central memory*, mediante trasferimento genico del TCR. (a) Trasduzione retrovirale di PBL attivati *in vitro* con mAb anti-CD3 e IL-2. Questa metodica risulta nella generazione di cellule T trasdotte più differenziate. L'appaiamento con il TCR endogeno può inoltre ridurre il numero di TCR tumore-specifici. (b) Trasduzione lentivirale di cellule T CD8⁺ vergini. Anche in questo caso, l'appaiamento con il TCR endogeno può inoltre ridurre il numero di TCR tumore-specifici. (c) Trasduzione lentivirale di cellule HSC. Tali cellule possono essere indotte a differenziare in cellule T CD8⁺ vergini *in vitro* attraverso la segnalazione indotta da Notch. La repressione dei geni attivanti la ricombinazione da parte del TCR trasdotto comporta l'espressione uniforme del TCR tumore-specifico. *Immagine tratta e modificata da*⁸³.

6. TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR

Al momento attuale, i fattori tecnici riguardanti la generazione di cellule T tumore-specifiche rappresentano l'ostacolo maggiore all'utilizzo dei TIL in *trial* clinici randomizzati. Solamente il 30-40% delle biopsie fornisce popolazioni T cellulari sufficienti, e il procedimento è lungo e laborioso (circa 6 settimane per ottenere le cellule per l'infusione⁶⁹). Le ragioni della ridotta disponibilità di un numero adeguato di cellule T per l'espansione sono molteplici: i) non tutti i pazienti con melanoma hanno lesioni tumorali accessibili e di dimensioni sufficienti a fornire abbastanza materiale per la coltura; ii) non tutte le colture di TIL danno origine a popolazioni tumore-specifiche; iii) la stimolazione con PBMC e l'espansione con linee di melanoma allogeniche genera numeri limitati di CTL tumore-specifici¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. D'altronde, cellule T vergini specifiche per Ag *self* che risiedono prevalentemente nel circolo e sono quindi più accessibili hanno un'avidità inferiore rispetto a TIL

tumore-specifici attivati localizzati nei siti tumorali e nei linfonodi^{8,110}. Infine, sebbene l'immunoterapia adottiva sia efficace nei pazienti con melanoma^{41,46,68}, pochi *trial* hanno coinvolto altre tipologie di tumore, a causa della difficoltà di isolare cellule T tumore-reattive in pazienti non affetti da melanoma. Il secondo grande ostacolo alla generazione di linfociti T tumore-specifici è dovuto all'espressione prevalente di molecole *self* da parte della maggioranza dei tumori. Le cellule T più reattive al *self* vengono tuttavia eliminate o rese non responsive durante lo sviluppo. Quindi le cellule T con appropriate affinità e avidità contro Ag *self* o tumorali sono spesso assenti nel repertorio immunitario naturale. Ciò ha convinto molti ricercatori ad ampliare tale repertorio attraverso l'introduzione di geni codificanti recettori T tumore-specifici in linfociti T primari. Il trasferimento del TCR è infatti condizione necessaria e sufficiente a conferire alle cellule del ricevente la specificità del donatore¹¹¹. Questo approccio prevede che le popolazioni di cellule T autologhe o da donatore vengano fornite di un TCR con specificità nota in colture *ex vivo* a breve termine e, una volta ridirezionate, trasferite al portatore di tumore. I due grandi vantaggi dell'applicazione clinica di tale strategia sono la generazione istantanea di un'immunità T cellulare definita e la possibilità di introdurre TCR con specificità non contemplate dal repertorio naturale di linfociti T.

La reattività desiderata può essere conferita alle cellule T mediante l'utilizzo di geni codificanti le catene α e β di un TCR tumore-reattivo (Fig. 6). Fino ad oggi sono stati caratterizzati TCR derivati da clonotipi T ottenuti dal tumore (TIL)^{108,112-114}, da sangue periferico di donatori sani o di pazienti oncologici^{115,116} e TCR murini o "umanizzati" da topi transgenici¹¹⁷⁻¹²⁰. Inoltre, librerie di Phage Display permettono di selezionare sequenze geniche varianti che codificano per TCR dalle caratteristiche ottimali¹²¹.

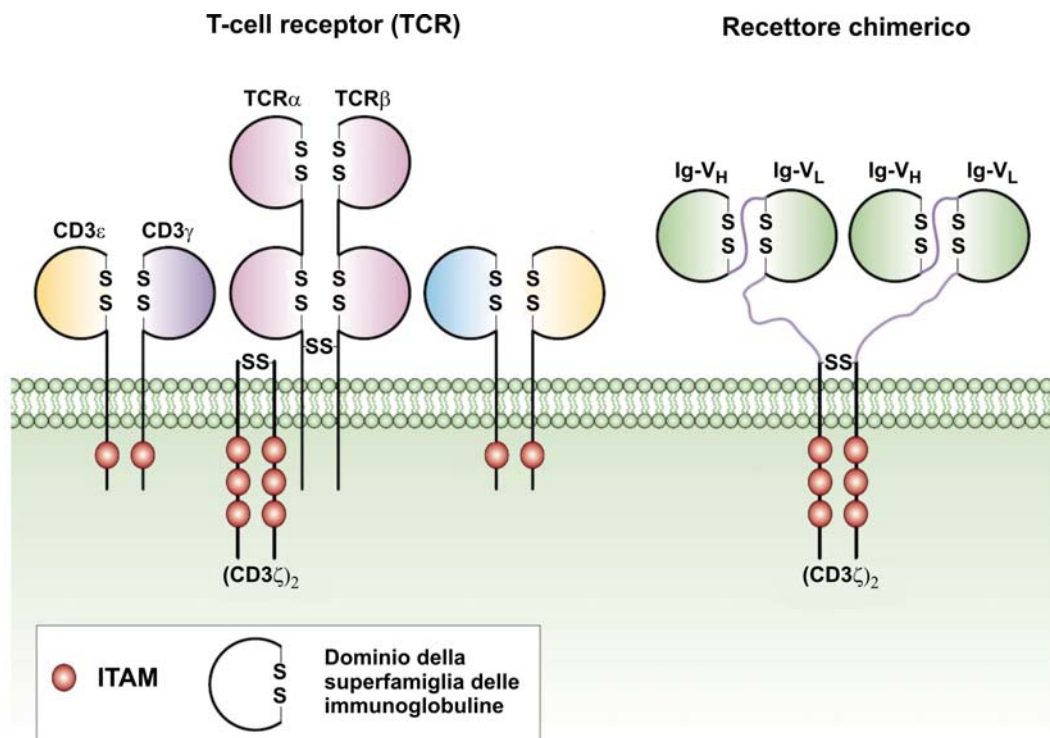


Figura 6. TCR vs recettori chimerici. Il complesso TCR è composto nel 90-95% dei linfociti T umani da un eterodimero $\alpha\beta$, associato con polipeptidi non polimorfici CD3. Le catene α e β sono glicoproteine di membrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline (Ig), la cui porzione extracellulare si organizza in un dominio variabile e un dominio costante. A destra, in figura, è riportato un esempio di recettore chimerico. I CAR interagiscono con le molecole della superficie cellulare mediante domini Ig e trasmettono segnali di attivazione attraverso il dominio citoplasmatico, generalmente di derivazione da componenti CD3 del TCR fisiologico. *Tratto e modificato da*¹²².

Il TCR è il recettore attraverso cui i linfociti T riconoscono i peptidi antigenici per cui sono specifici. La molecola TCR è un eterodimero composto da due catene polipeptidiche transmembrana; il 90-95% dei linfociti T umani esprime l'eterodimero $\alpha\beta$ ed è responsabile delle classiche risposte *helper* e citotossiche. L'eterodimero $\alpha\beta$ è espresso in associazione con i polipeptidi CD3 γ δ ϵ e ζ non polimorfici a formare il complesso TCR/CD3. TCR $\alpha\beta$ riconosce l'Ag, mentre le proteine CD3 presiedono all'assemblaggio del complesso e alla trasduzione intracellulare del segnale. Un'alternativa al trasferimento di catene TCR complete è l'impiego di geni che codificano catene di mAb in grado di costituire recettori chimerici (CAR) funzionali di membrana (Fig. 6).

6.1 CAR (*chimeric antigen receptor*)

Ab specifici per TAA possono essere facilmente generati immunizzando i topi. I geni che codificano i frammenti variabili a singola catena (scFv) di questi Ab sono usati per costruire recettori chimerici in grado di ridirigere la responsività delle cellule T verso gli Ag tumorali. I CAR sono tipicamente composti da un scFv legato mediante una regione cerniera a domini transmembrana e di segnalazione intracellulare derivati da complessi TCR (ad esempio la catena ζ del CD3) o dal recettore ad alta affinità di IgE (Fc ϵ RI). Il razionale per la produzione di tali recettori è la possibilità di conferire proprietà di riconoscimento antigenico indipendenti dall'HLA (complesso maggiore di istocompatibilità maggiore umano) del paziente trattato, di generare risposte sia *helper* che citotossiche e di evitare la dimerizzazione del recettore con catene TCR α o β endogene. I CAR, diversamente dai TCR fisiologici, riconoscono non solo Ag proteici, ma anche carboidrati e glicolipidi. Nell'ultimo decennio vari gruppi di ricerca hanno costruito CAR per diversi Ag tumorali, dimostrando la mediazione dell'attività citolitica in ibridomi di cellule T, in cellule T primarie murine e umane e in cellule T umane derivate da pazienti¹²³⁻¹²⁵. L'efficacia *in vivo* di cellule effettrici modificate con CAR è stata recentemente valutata in uno dei primi *trial* clinici di ACT condotti impiegando cellule T ingegnerizzate per l'espressione di TCR anti-tumorali¹²⁶. Il gruppo di Kershaw e colleghi ha generato cellule T reattive contro l'Ag FR (recettore dell' α -folato), associato al cancro ovarico, modificando geneticamente cellule T autologhe con un vettore retrovirale (RV) codificante un gene chimerico. Dopo aver provato l'efficacia terapeutica delle cellule trasdotte in un modello murino, è stato autorizzato uno studio clinico di fase I in pazienti con cancro ovarico. I risultati di questo trial sono decisamente sconcertanti: indipendentemente dal protocollo utilizzato (somministrazione endovenosa (e.v.) di dosi crescenti di cellule T in combinazione con IL-2 o somministrazione e.v. di cellule T dotate di duplice reattività contro l'Ag FR e PBMC allogenici, seguita da vaccinazione con PBMC allogenici), il trattamento non ha indotto alcuna risposta anti-tumorale in nessun paziente. Indipendentemente da considerazioni di carattere generale riguardanti le proprietà delle cellule trasdotte, coltivate a lungo termine e infine infuse nei pazienti, il dato più significativo è lo sviluppo di un'attività inibitoria delle cellule T nel siero a seguito del trattamento. Responsabile di tale attività inibitoria è la presenza di immunoglobuline dirette probabilmente contro la componente scFv murina del recettore chimerico, in grado di bloccare l'interazione tra il recettore stesso e l'Ag FR¹²⁶.

Le attuali tecnologie disponibili per la generazione dei CAR richiedono indubbiamente ulteriore ottimizzazione. Non è chiaro, ad esempio, se la fusione di alcune componenti del CD3,

come la catena ζ , sia sufficiente a riprodurre l'intero spettro delle proprietà di segnalazione intracellulare di un complesso TCR-CD3 fisiologico. Altre limitazioni all'utilizzo dei CAR sono la natura del bersaglio, che deve necessariamente essere una molecola della superficie cellulare, e la potenziale immunogenicità di una struttura generata dalla fusione di differenti domini proteici. La scelta di utilizzare linfociti T trasdotti con un TCR eterodimerico fisiologico o un recettore chimerico per terapie di trasferimento adottivo è dettata da ragioni per lo più alternative. Gli studi riguardanti i due approcci sperimentali procedono in parallelo e, non a caso, i primi trial clinici delle relative metodiche ACT sono stati pubblicati quasi contemporaneamente^{126,127}. La strategia di trasferimento prescelta per il modello sperimentale presentato in questa tesi prevede l'impiego di un TCR $\alpha\beta$ fisiologico. In questa sede si proseguirà quindi a discutere di tale approccio.

7. TRASFERIMENTO DI ETRODIMERI TCR $\alpha\beta$

La prima evidenza di ridirezionamento della specificità T cellulare mediante trasferimento del TCR deriva da topi transgenici¹¹¹. In seguito, molti gruppi hanno trasdotto con successo eterodimeri funzionali TCR $\alpha\beta$ in cellule della linea T umana Jurkat. Il primo esempio di trasferimento genico del TCR in linfociti T primari umani fu reso possibile dagli studi condotti sugli Ag di melanoma: in quel caso si trasdussero PBMC umani con un eterodimero $\alpha\beta$ specifico per il peptide p9-27 di Melan-A¹¹². Da allora sono stati selezionati molti altri bersagli antigenici tumore-associati, compresi il fattore di trascrizione MDM-2¹²⁰, la proteina antigenica del tumore di Wilms WT1¹²⁸ e la proteina oncosoppressore mutata p53¹²⁹, l'Ag CT NY-ESO-1¹³⁰. Il primo approccio preclinico di ACT con cellule T ingegnerizzate per TCR è stato condotto in un modello murino dal gruppo di Ton Schumacher nel 2001¹³¹. Successivamente la capacità delle cellule trasdotte di riconoscere specificamente le cellule tumorali *in vivo* è stata confermata da altri studi¹³²⁻¹³⁴.

7.1 Quale TCR?

La maggioranza dei lavori pubblicati descrive il trasferimento di TCR ristretti per MHC-I^{112,114,135-138}, ma in alcuni casi, cellule Th sono state efficientemente trasdotte con TCR ristretti per MHC-II¹³⁰. Dato che la generazione e la propagazione di cellule Th è difficoltosa in pazienti

portatori di tumore, le attuali strategie si sono prevalentemente focalizzate sulla generazione di CTL e cellule Th ottenute mediante trasferimento di TCR derivati da linfociti T CD8⁺. Le colture di PBMC trasdotti danno origine sia a cellule T CD4⁺ che T CD8⁺, in cui il TCR transgenico riproduce le caratteristiche del clone di origine. In particolare, il TCR transgenico media il riconoscimento specifico degli epitopi bersaglio, Ag melanocitari e non melanocitari, presentati da cellule caricate con il peptide o dalle cellule tumorali, preservando la fine specificità del clone parentale¹¹⁶. Le cellule T trasdotte esercitano specifiche funzioni effettrici contro tali bersagli e mantengono l'espressione del TCR esogeno durante le successive espansioni mitotiche. I dati relativi ai livelli delle citochine prodotte, al riconoscimento MHC-I-ristretto di basse dosi di Ag e alla lisi mediata dai linfociti umani primari ingegnerizzati con TCR specifici per Ag melanocitari coincidono con quelli relativi ai CTL altamente avidi anti-melanoma¹³⁸.

7.2 Quali cellule T riceventi?

Molti autori hanno dimostrato che i linfociti riceventi mantengono la specificità originale anche dopo la trasduzione^{115,135,138}, divenendo così cellule T a duplice specificità. Da cui, la scelta di trasferire il TCR in cloni cellulari T a specificità nota, ottenuti facilmente dal sangue periferico di donatori o pazienti, anziché in linfociti T attivati in maniera aspecifica. Quest'ultimo approccio comporta un elevato rischio di alloreattività nel caso in cui il donatore dei linfociti T trasdotti e il ricevente del trasferimento adottivo siano *mismatched* per molti alleli, ad esempio nel contesto di DLI dopo trapianto di cellule staminali allogeniche (allo-SCT). Un altro rischio dell'introduzione di TCR in linfociti T policlonali è la possibilità di conferire la specificità anti-tumorale a cellule T regolatorie o cellule T con profili citochinici non desiderati (e.g. cellule Th2 che producono IL-13¹³⁹). E' stato dimostrato che la duplice specificità si conserva anche nel caso di cicli ripetuti di stimolazione via TCR endogeno^{115,140,141}. Nel caso particolare del trasferimento di un TCR diretto contro un Ag minore di istocompatibilità (mHag) ristretto per classe MHC-II in cloni T specifici per la tossina tetanica (TT), la stimolazione via TT è risultata la più efficiente in termini di espansione e funzionalità delle cellule trasdotte¹⁴². Alcuni interessanti lavori del gruppo di Heemskerk descrivono il trasferimento di un TCR anti-HA-2 (mHag) in cellule T CMV-specifiche, dimostrando che l'inserimento del recettore conferiva reattività contro cellule leucemiche esprimenti tale Ag¹¹⁵ pur conservando la specificità anti-CMV. Stimolando ripetutamente le cellule a duplice specificità via TCR endogeno virus-specifico o TCR esogeno contro HA-2 le cellule T divergevano verso una popolazione esprimente a livelli elevati solo il TCR per cui erano state

attivate (van Loenen MM *et al*, comunicazione orale al XV congresso annuale della Società Europea di terapia genica e cellulare, ESGCT). Tale divergenza si annullava rapidamente dopo stimolazione con il secondo TCR, suggerendo che era frutto di una variabilità di distribuzione dei TCR in superficie e non la conseguenza della selezione di cellule T differenti. I linfociti T preservano quindi la duplice specificità mediata dai due TCR e sono in grado di riorganizzare l'assetto dei TCR di membrana a seguito di ristimolazioni successive. Questi dati implicano che la persistenza latente di virus quali CMV e EBV nell'organismo^{115,141} e/o la vaccinazione con peptidi virali¹⁴³ potrebbero garantire *in vivo* la sopravvivenza per lunghi periodi delle cellule T ingegnerizzate che possiedono una specificità endogena per tali virus. La scelta di cellule T virus-specifiche come bersaglio dei trasferimenti di TCR presenta un ulteriore vantaggio, ossia un ristretto repertorio TCR dei linfociti riceventi, in grado di limitare la potenziale formazione di eterodimeri $\alpha\beta$ con specificità non prevedibili. Nel topo è stato anche dimostrato che cellule T CD8⁺ a duplice specificità possono mediare *in vivo* una reattività anti-tumorale attraverso ambedue i TCR, indipendentemente dall'Ag utilizzato per l'attivazione *ex vivo*¹⁴⁴. E' chiaro che, in ambito clinico, sarà più conveniente utilizzare linfociti T con specificità nota attivati in maniera policlonale anziché cloni cellulari T come riceventi del trasferimento del TCR anti-tumorale.

Il trasferimento genico del TCR si è dimostrato utile anche in situazione di parziale *mismatch* per MHC tra donatore e ricevente del TCR, sia *in vitro* che in modelli preclinici^{115,133}. Un'altra interessantissima osservazione dello studio di Heemskerk è il fatto che le cellule trasdotte con TCR HA-2-specifico derivate sia da soggetti HLA-A2⁺ che HLA-A2⁻ esercitavano una potente reattività anti-leucemica, in assenza di segni di alloreattività anti-HLA-A2¹¹⁵. Se questi dati dovessero essere confermati nell'uomo, il trasferimento genico del TCR potrebbe ampliare il suo ambito di applicazione, offrendo la possibilità di allargare i gruppi di pazienti reclutabili, che potrebbero essere trattati con un repertorio limitato di TCR tumore-specifici.

7.3 Superamento della tolleranza al *self*

Una delle osservazioni più incoraggianti emerse dagli studi preclinici riguarda la capacità dei linfociti trasdotti di superare il problema critico della tolleranza al *self*. La disponibilità di potenti tecniche per generare TCR ad elevata affinità permette di creare specificità scarsamente rappresentate nel repertorio T cellulare periferico fisiologico. Inoltre, il trasferimento di TCR ad alta avidità, specifici per TAA universali, può produrre CTL che riconoscono Ag scarsamente espressi dalle cellule non trasformate e dai tessuti. La maggioranza dei TAA presentati da MHC-I identificati sono espressi esclusivamente da una certa linea o da un numero limitato di tumori¹⁴⁵.

TAA universali, quali survivina o telomerasi, presentati in grandi quantità dalle cellule di una vasta gamma di tumori umani e derivati da proteine coinvolte intimamente nel processo di trasformazione maligna, rappresentano dei bersagli ideali per approcci immunoterapici basati su CTL ad ampio spettro. Inoltre, dato che la sopravvivenza delle cellule maligne dipende dalla continua espressione di tali proteine, è meno probabile che si verifichi il mascheramento del tumore al sistema immunitario per selezione di varianti neoplastiche non esprimenti l'Ag. Tuttavia, epitopi di TAA universali riconosciuti da CTL sono stati identificati solo raramente¹⁴⁶. Il principale ostacolo alla messa a punto di strategie immunoterapeutiche specifiche per TAA universali è l'assenza nel repertorio periferico T cellulare di CTL ad elevata avidità diretti contro di essi. Infatti questi Ag derivano per la maggior parte da proteine intracellulari processate endogenamente e la loro presentazione in basso numero di copie da parte delle cellule non trasformate e dei tessuti, compreso il timo, risulta nello sviluppo della tolleranza al *self*. Nel 2001, Stanislawski e colleghi, utilizzando topi transgenici per HLA-A2.1, hanno identificato un epitopo riconosciuto da CTL tumore-specifici, derivato dall'oncoproteina MDM-2, l'omologo umano dell'oncoproteina murina *double-minute 2* (Mdm2), che appartiene alla categoria di proteine *self* ubiquitarie coinvolte nel processo di trasformazione maligna. MDM-2 inattiva la proteina p53 ed è espressa a livelli elevati in un vasto gruppo di tumori, compresi sarcomi, tumori uroteliali e della mammella, tumori delle cellule germinali dei testicoli, gliomi, neuroblastomi, linfomi Hodgkin e non-Hodgkin e leucemie acute e croniche¹²⁰. Il gruppo di Stanislawski ha dimostrato che il meccanismo della *self*-tolleranza verso questo Ag può essere eluso generando linee CTL ad alta avidità dai topi transgenici e dai linfociti T umani A2.1⁺ allo-A2.1-ristretti, in grado di riconoscere l'Ag in basso numero di copie e di lisare efficientemente molti bersagli tumorali e leucemici umani, ignorando cellule non trasformate che mancano dell'espressione dell'oncoproteina MDM-2. L'avidità e la specificità antigenica sono state ricostituite in linfociti T umani dopo trasferimento di geni TCR A2.1-ristretti e MDM-2-specifici, *wild type* o parzialmente umanizzati, derivati dai topi transgenici¹²⁰.

La prima dimostrazione *in vivo* che il trasferimento genico del TCR può essere usato per generare un compartimento T cellulare specifico per Ag *self* è stata realizzata in un topo transgenico (RIP-OVA^{hi}) che esprime la proteina ovalbumina OVA come *self*-Ag nelle cellule β producenti insulina delle isole pancreatiche¹³³: in questo modello, le cellule T trasdotte con TCR anti-OVA ad alta avidità si espandevano in seguito alla vaccinazione e bersagliavano sia le cellule pancreatiche che le cellule tumorali esprimenti l'Ag *self*. Utilizzando un protocollo di vaccinazione contemporanea all'infusione dei linfociti è stato possibile ottenere una buona espansione delle

cellule specifiche *in vivo*. Inoltre, il trasferimento del TCR in cellule T riceventi, parzialmente MHC-*mismatched*, risultava in un ridirezionamento funzionale *in vivo* e in effetti terapeutici non associati ad alcun evidente fenomeno di autoimmunità.

8. TRASFERIMENTO STABILE DEL TCR MEDIANTE VETTORI VIRALI

I vettori virali devono soddisfare due principali caratteristiche: garantire buoni livelli di trasduzione ed espressione del transgene ed escludere eventi di ricombinazione in grado di generare particelle virali competenti per la replicazione. Ad oggi, i vettori basati su Oncoretrovirus (RV) hanno rappresentato i vettori di scelta della terapia genica, grazie alla trasduzione stabile di cellule bersaglio e alla versatilità delle proteine dell'*envelope* di superficie sostituibili al fine di impedire la potenziale neutralizzazione in caso di ripetute introduzioni del vettore nel paziente. La maggior parte dei protocolli di ingegnerizzazione delle cellule T, sia *in vitro* che *in vivo*, utilizzano vettori derivati da retrovirus murini, come il virus della leucemia murina di Moloney (MoMuLV) o il virus murino delle cellule staminali (MSCV). I RV sono stati studiati per molti anni in modelli sperimentali e attualmente la loro applicazione sta dando buoni risultati anche in ambito clinico^{147,148}. I vettori lentivirali (LV) basati su lentivirus, come il virus umano dell'immunodeficienza di tipo 1 (HIV-1), furono sviluppati a metà degli anni '90 e rappresentano l'ultima categoria di vettori la cui applicazione spazia dalla ricerca di base alle biotecnologie e alla terapia genica. I LV possono ospitare cassette multiple di espressione grazie ad una capacità di 8-10 kb e, analogamente ai RV, possono essere pseudotipizzati con differenti *envelope* per ampliare lo spettro di bersagli cellulari potenziali e favorire la stabilità e la manipolazione delle particelle virali. Oltre alle caratteristiche che accomunano tutti i RV, i LV possono mediare l'integrazione di una copia del loro genoma nel DNA di cellule ospiti non replicanti. Sebbene rappresentino un sistema promettente per molti potenziali bersagli, l'efficienza del trasferimento genico, dell'integrazione e dell'espressione stabile mediate da tali vettori *in vivo* è stata indagata solo nel sistema nervoso centrale (CNS), nel sistema ematopoietico e, meno estesamente, nel fegato¹⁴⁹⁻¹⁵⁴.

La patogenicità del virus parentale impone l'introduzione di rigide norme di biosicurezza nella generazione dei LV. La sicurezza di un vettore virale è inversamente correlata al rischio di eventi di ricombinazione *in vivo* che possono portare alla generazione di particelle virali competenti per la replicazione. Allo scopo di generare vettori privi di ogni sequenza non indispensabile al trasferimento genico, sono state proposte molteplici varianti di costrutti lentivirali, fino alle

generazioni più recenti di vettori self-inattivanti (SIN), caratterizzati da un'estesa delezione nella regione U3 della ripetizione terminale lunga (*long terminal repeat*, LTR) all'estremità 3' del genoma virale, cui consegue l'inattivazione dell'LTR stessa. In questi vettori, un promotore interno aggiuntivo guida l'espressione del transgene a livelli comparabili a quelli osservati nei vettori con LTR *wild type*¹⁵⁵. I LV sono oggetto di continue manipolazioni per assicurarne migliori caratteristiche e capacità performanti. Ad esempio, l'incorporazione di sequenze cPPT (*central polypurine tract*) ed elementi regolatori post-trascrizionali, come WPRE (*woodchuck post-transcriptional regulatory element*), ha incrementato l'espressione genica e l'infettività delle particelle virali non competenti per la replicazione. La mutagenesi inserzionale dovuta all'integrazione provirale continua a rappresentare il rischio più temibile anche dei vettori di ultima generazione. L'integrazione dei RV nel genoma di una cellula ospite può condurre ad alterazioni nel fine controllo dell'espressione dei geni fiancheggiati il sito di inserzione. Dati *in vitro* e *in vivo* dimostrano che l'integrazione non è casuale¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. In particolare, i RV si integrano preferenzialmente adiacenti ai siti di inizio della trascrizione di geni attivi (sufficientemente adiacenti alle sequenze regolatorie da evocare effetti enhancer LTR-mediati), mentre i LV preferiscono unità geniche trascrizionali concentrandosi in regioni ad alta densità genica. Nuovi studi prediranno la frequenza delle inserzioni più rischiose, in grado di attivare proto-oncogeni anche a grande distanza nel caso dei RV o di inattivare geni regolatori nel caso dei LV, eventi che in ultimo portano alla crescita cellulare incontrollata e alla trasformazione maligna. Queste ipotetiche complicazioni della terapia genica sono già emerse come eventi avversi in ambito clinico¹⁶⁰.

Diverse caratteristiche molecolari dei LV a base HIV fanno ipotizzare un rischio inferiore di mutagenesi inserzionale, rispetto a quello osservato per RV: i) le LTR lentivirali possiedono inferiore attività basale; ii) l'espressione genica in questi vettori è guidata dal legame di Tat all'elemento TAR nell'LTR per facilitare l'elongazione dell'RNA di HIV piuttosto che dalla modulazione positiva dell'attività trascrizionale attraverso complessi proteici leganti sequenze DNA-*enhancer*; iii) i LV possiedono inferiore attività di *poly-A read through* in geni adiacenti¹⁶¹. L'inferiore rischio di mutagenesi inserzionale è sottolineato anche dal fatto che la leucemia è un evento estremamente raro nei pazienti sieropositivi e non è stato riconosciuto come effetto collaterale dell'infezione da HIV, nonostante le cellule T della memoria ospitino il virus per molti anni in forma integrata; in effetti, molte di queste forme provirali sono difettive e non uccidono le cellule ospiti¹⁶²⁻¹⁶⁴. Infine, i vettori SIN sembrano essere meno inclini alla transattivazione di geni

adiacenti rispetto ai RV¹⁶⁵. Tuttavia, la sicurezza dei LV non è ancora stata provata nell'uomo: il primo trial clinico per la valutazione di un LV è cominciato nel gennaio del 2003¹⁶⁶. Lo scopo del trial era determinare, in un gruppo molto ristretto di pazienti HIV-infetti, la sicurezza e la tollerabilità di VRX496, un vettore derivato da HIV-1, pseudotipizzato con la proteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV-G), esprime una sequenza antisense di 937 b contro l'*envelope* di HIV¹⁶⁷. Studi preclinici hanno fornito un solido razionale all'utilizzo di questo approccio in ambito clinico, per i potenti effetti antivirali dimostrati *in vitro* indipendentemente dallo stato del paziente o dal tropismo del virus infettante¹⁶⁸. Le valutazioni iniziali (nessuna incidenza di eventi avversi, carico virale stabile o diminuito, conta dei linfociti T CD4⁺ incrementata, mobilitazione auto-limitante del vettore e nessuna evidenza di mutagenesi inserzionale) sembrano supportare l'utilizzo dei vettori lenti virali per il trasferimento genico nell'uomo¹⁶⁹.

Sulla base di queste considerazioni è evidente che l'ottimizzazione di un sistema stabile di trasferimento genico da impiegare in protocolli di ACT deve principalmente garantirne la sicurezza. In secondo luogo, la metodica di ingegnerizzazione delle cellule T dovrebbe garantire il mantenimento di proprietà cellulari che *in vivo* correlano con la regressione tumorale. Come già descritto, le varie fasi di manipolazione *in vitro* dei linfociti T (attivazione, trasduzione, eventuale selezione ed espansione in presenza di IL-2) dovrebbero idealmente preservare una popolazione T policlonale che rappresenti tutti i precursori T circolanti nei donatori sani e un potenziale immunologico inalterato. Tuttavia, la trasduzione da parte di RV richiede l'attivazione del TCR e una sostenuta proliferazione delle cellule T attivate. Dal momento che è stato descritto che i LV possono trasdurre un ampio spettro di cellule a crescita lenta o non proliferanti^{149,153,154}, si è rivolta maggiore attenzione all'utilizzo di tali vettori per la trasduzione di cellule ematopoietiche. A questo proposito è stato provato che le proteine accessorie di HIV-1 (AP), la cui presenza in forma provirale impone valutazioni aggiuntive sulla sicurezza dei vettori e sulla corretta funzionalità delle cellule bersaglio, non sono necessarie per la trasduzione di molte tipologie cellulari, comprese cellule HSC^{152,170}, e linfociti non stimolati o vergini^{171,172}. L'inserzione di promotori specifici interni nei costrutti lentivirali può guidare un'espressione sostenuta e duratura del transgene^{173,174}, non più dipendente quindi dalle sequenze LTR virali che risultano delete nei vettori di ultima generazione e inattive nelle cellule T quiescenti¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Alcuni studi dimostrano inoltre che, a parità di MOI, i LV trasducono CTL Ag-specifici proliferanti con maggiore efficienza rispetto a RV^{172,179}, sebbene i meccanismi che sottendono a tali risultati non siano stati chiariti. Infine, i LV mediano buoni livelli di espressione del transgene anche a basse concentrazioni, risultando nell'integrazione

di un basso numero di copie di vettore per cellula e nella possibilità di evitare laboriosi procedimenti di immunoselezione o l'impiego di marcatori genici^{172,179}.

LV di ultima generazione pseudotipizzati con VSV-G possono trasdurre linfociti T in fase G1 del ciclo cellulare, non destinati alla proliferazione. E' stato infatti riportato che la stimolazione con bassi livelli di IL-2, IL-7 e IL-15 guida la progressione in fase G1 del ciclo cellulare senza indurre ulteriore progressione o proliferazione¹⁸⁰. Questa transizione correla con l'acquisizione della suscettibilità alla trasduzione da parte dei LV, sebbene solo una frazione delle cellule trattate risulti stabilmente trasdotta, anche in seguito a ripetute esposizioni al vettore¹⁸⁰. L'efficiente trasduzione dei linfociti T umani da parte di vettori di terza generazione non richiede necessariamente cellule ciclanti, sebbene un certo grado di attivazione sia comunque necessario. Inoltre, l'attivazione consente di espandere i linfociti T trasdotti in colture a lungo termine e garantisce elevati livelli di espressione del transgene¹⁷². Il grande vantaggio di una metodica di trasduzione che non preveda l'attivazione cellulare TCR-mediata è ridurre o eliminare il rischio della selezione e modificazione fenotipica delle cellule T in coltura.

Nonostante gli approcci di trasferimento genico del TCR si siano moltiplicati negli ultimi anni e alcuni siano già approdati in clinica, pochissimi lavori riportano l'impiego di un LV come sistema di trasferimento del TCR per studi *in vitro*^{137,181}. In particolare, Tsuji e colleghi hanno indotto cellule Th e CTL tumore-specifiche mediante il trasferimento dei geni delle catene TCR- α e - β isolati da un clone CTL, ristretto per HLA-A24, diretto contro il peptide del tumore di Wilms 1 (WT-1). Tuttavia, anche in questo caso, le condizioni di attivazione e trasduzione erano del tutto simili a quelle impiegate nei precedenti studi di trasferimento genico mediato da RV.

9. TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR E CLINICA

Sulla base delle incoraggianti premesse precliniche, la strategia di trasferimento dei linfociti T geneticamente modificati per l'espressione di un TCR ha raggiunto la clinica e dati relativi al primo lavoro sono oggi disponibili¹²⁷. L'efficacia *in vivo* di cellule T ingegnerizzate con un TCR anti-Melan-A è stata valutata in 17 pazienti affetti da melanoma metastatico progressivo, non responsivo a terapie precedenti con IL-2. I PBL derivati da pazienti con melanoma sono stati trasdotti mediante RV con geni codificanti le catene α e β di un TCR anti-Melan-A. Il linfocita clonale donatore del TCR è un clone TIL derivato da uno dei pazienti con melanoma metastatico che hanno sperimentato la completa regressione del tumore grazie al trasferimento adottivo di TIL⁴¹. 2 pazienti su un gruppo

di 15 trattati, trasfusi con PBL autologhi ingegnerizzati, hanno dimostrato una regressione oggettiva stabile della malattia (sistema di valutazione RECIST). Tutti e 15 i pazienti hanno ricevuto trattamenti di ACT con PBL autologhi TCR-trasdotti (42% di espressione media della catena β del TCR specifico) al momento della massima linfo-deplezione. I pazienti regressori appartenevano a 2 coorti sperimentali distinte sulla base delle condizioni di coltura cui sono stati sottoposti i PBL prima dell'infusione. In un caso il periodo di coltura *ex vivo* è stato limitato a 6-9 giorni dalla stimolazione delle cellule con un anticorpo anti-CD3, allo scopo di somministrare linfociti nella loro fase attiva di crescita; nell'altro caso, un numero maggiore di cellule in attiva divisione sono state generate per l'ACT attuando un secondo rapido protocollo di espansione dopo 8-9 giorni. L'analisi di RT-PCR sull'RNA virale, dimostra che tutti i pazienti appartenenti alle due coorti descritte hanno esibito una persistenza delle cellule trasdotte a livelli $> 9\%$ (percentuale di cellule trasdotte nel circolo del paziente) a 1 e 4 settimane dal trattamento. Si è inoltre osservato un livello di persistenza stabile $>17\%$ durante un periodo di monitoraggio di più di 90 giorni in 7 degli 8 pazienti che hanno fornito nel tempo i campioni per l'analisi. In particolare, nel circolo dei due pazienti regressori, il numero di linfociti ingegnerizzati è aumentato rispettivamente di un fattore 1400 e 30, rispetto alle cellule infuse. Ad un anno dall'infusione, entrambi i soggetti presentavano livelli elevati di cellule trasdotte circolanti (20% e 70%). Al contrario, nei 3 pazienti non responsivi di un terzo gruppo sperimentale, sottoposti ad infusioni di cellule T trasdotte ed espanse per 19 giorni in coltura, meno del 2% dei linfociti terapeutici era rilevabile *in vivo* oltre i 50 giorni. La ridotta espressione del transgene nelle cellule persistenti a più di un mese dal trattamento potrebbe essere una conseguenza del descritto decremento nella trascrizione di transgeni inseriti mediante RV¹⁸² e del declino dell'attività metabolica durante la conversione delle cellule attivate a cellule della memoria. Questo decremento influisce soprattutto sulle analisi condotte mediante marcatura con tetramero specifico, il cui legame è influenzato dall'aggregazione di recettori multipli. Tuttavia, l'attività funzionale delle cellule trasdotte si è mantenuta su livelli sufficienti per mediare la regressione tumorale. Sebbene il tasso di risposta osservato sia inferiore (13%) rispetto a quello raggiunto dall'infusione di TIL autologhi in studi clinici⁴¹, questi dati dimostrano che l'approccio terapeutico è realizzabile e funzionale nell'uomo e che le cellule trasferite non danno tossicità.

10. PROBLEMI IRRISOLTI E RISCHI DEL TRASFERIMENTO ADOTTIVI DI CELLULE T RIDIREZIONATE

I recenti trial clinici di trasferimento del TCR hanno rappresentato una buona occasione di bilancio sullo stato attuale della sperimentazione in questo ambito. Il successo terapeutico è ancora insoddisfacente e vari aspetti sperimentali dovranno essere oggetto di studi e innovazioni future.

10.1 Colture *in vitro* e proprietà delle cellule trasferite

La scarsa persistenza *in vivo* continua ad essere uno dei principali problemi associati agli attuali protocolli di ACT e conferma la necessità di individuare presto diverse condizioni di manipolazione *in vitro* delle cellule T. Durante la fase di espansione *ex vivo*, i linfociti T vanno incontro ad alterazioni che comportano la perdita di sottotipi T cellulari vergini e la selezione di un nuovo repertorio di TCR^{183, 184}. E' stato dimostrato che tali alterazioni derivano dalla coltura stessa piuttosto che dalle procedure di trasduzione e/o selezione¹⁸⁴. Differenti protocolli vengono attualmente valutati per individuare condizioni di coltura che assicurino una buona vitalità cellulare e consentano la trasduzione e l'espansione delle cellule T in numero sufficiente per il trasferimento adottivo. La trasduzione richiede l'attivazione dei linfociti T, in genere indotta dalla PHA o anticorpi anti-CD3 e IL-2. L'attivazione T-cellulare mediata da Ab solubili è stato il metodo di scelta fino all'ideazione di biglie leganti Ab. Si suppone che gli Ab accoppiati a biglie garantiscano prestazioni superiori rispetto agli Ab solubili, mimando le cellule APC e ricreando quindi una situazione più fisiologica. Sia l'impiego di Ab solubili che accoppiati a biglie per l'attivazione T-cellulare conservano ancora molti limiti riguardanti principalmente il fenotipo immunologico. In 5 giorni le cellule deviano verso un fenotipo prevalentemente della memoria e attivato⁹⁶. Tuttavia, l'attivazione con biglie risulta in una trasduzione piuttosto omogenea delle cellule in coltura, al contrario della stimolazione con Ab solubili che favorisce la prevalenza di cellule T CD3⁺CD8⁺ al termine della trasduzione. Verisimilmente, a seguito di quest'ultimo metodo di attivazione, le cellule T CD8⁺ sono indotte a ciclare più consistentemente delle cellule T CD4⁺ e sono quindi più suscettibili all'entrata del virus; lo stesso vale per le cellule T della memoria che proliferano meglio delle cellule T vergini.

10.2 Stabilità dell'espressione del transgene

Il ruolo terapeutico del transgene sembra essere condizionato dalla modulazione trascrizionale negativa cui va incontro nelle cellule T persistenti. La necessità di incrementare la stabilità dell'espressione del transgene rende più interessanti sistemi di trasferimento genico alternativi ai

RV. E' stato ampiamente documentato che sia MoMuLV/MSCV LTR (usate in molti RV) che HIV-1 LTR sono debolmente attivi come promotori in cellule quiescenti ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷, implicando che la conversione delle cellule T ingegnerizzate ad un fenotipo della memoria *in vivo* può portare ad una riduzione dell'espressione del transgene. LV della generazione SIN sembrano soddisfare i criteri richiesti, grazie all'incorporazione di promotori interni costitutivi che guidano l'espressione del transgene indipendentemente dallo stato di attivazione della cellula T trasdotta e a elementi regolatori *in cis* ^{185, 186} che aumentano l'efficienza del trasferimento genico e la stabilità dell'RNA transgenico. La struttura del genoma LV riduce significativamente il rischio di fenomeni di silenziamento (101) e quello residuo verrà presto eliminato da costrutti dotati di nuovi elementi *in cis* ¹⁸⁷.

10.3 Ruolo potenziale di cellule T CD4⁺ trasdotte

E' noto che i linfociti T CD4⁺ giocano un ruolo determinante nell'induzione e nella persistenza di un'efficiente risposta immunitaria (interazione diretta e indiretta con CTL attraverso il rilascio di citochine, interazione con DC e reclutamento dell'immunità innata) ¹⁸⁸⁻¹⁹¹. Inoltre, le cellule T CD4⁺ mediano specificamente la rottura della tolleranza al *self*, favorendo la regressione tumorale attraverso l'induzione di risposte immunitarie contro Ag *self* non mutati. In clinica, casi di regressione tumorale sono stati registrati a seguito del trasferimento combinato di linfociti T autologhi CD4⁺ e CD8⁺ ^{50, 192}. L'isolamento e la propagazione di cellule Th tumore-specifiche da pazienti portatori di tumore rimane operativamente difficoltosa, dato che pochi peptidi tumore-specifici, ristretti per MHC-II sono stati isolati; inoltre, tentativi di vaccinazione con peptidi ristretti per MHC di I o II classe non sono risultati nella simultanea induzione di sottotipi cellulari antitumorali cooperanti Th e CTL ¹⁹³. La difficoltà di indurre cellule Th tumore-specifiche ha portato all'assenza di una fonte disponibile di TCR ristretti per classe II, con qualche nota eccezione ¹³⁸. Quindi, i ricercatori hanno estesamente caratterizzato TCR ristretti per MHC-I allo scopo di inserirli in cellule T CD4⁺ e di conferire a tali cellule una funzionalità completa in risposta all'Ag specifico ^{114, 118, 129, 135, 137, 138}.

10.4 Potenziale induzione di effetti autoimmuni

Anche se cellule T modificate per l'espressione del TCR transgenico dimostrano la desiderata specificità per MHC e Ag in studi *in vitro*, l'infusione delle cellule T trasdotte potrebbe, almeno in teoria, indurre autoimmunità non prevista attraverso tre meccanismi: i) formazione di eterodimeri

misti potenzialmente reattivi contro Ag *self*; ii) attivazione ed espansione di cellule T ignoranti *self*-reattive (entrambi questi meccanismi sono indipendenti dalla restrizione MHC) e iii) induzione di alloreattività in caso di parziale *mismatch* tra donatore e ricevente (Fig. 7).

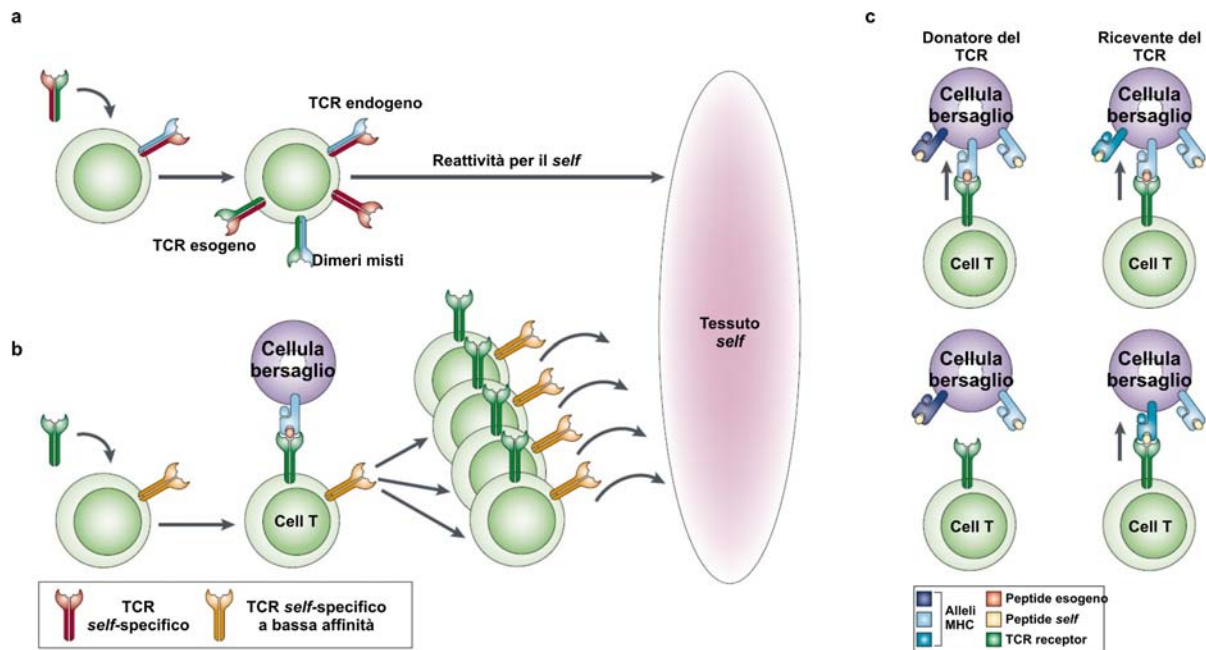


Figura 7. Meccanismi per cui il trasferimento genico del TCR può causare autoimmunità. Nel caso in cui il donatore del TCR e il ricevente siano MHC-*matched* **(a)** una cellula T che riceve il TCR esogeno produce dimeri TCR ibridi potenzialmente auto-reattivi; **(b)** una cellula T *self*-specifico rimane ignorante (ad esempio, TCR specifico per il *self* a bassa affinità) viene attivata e si espande in maniera clonale attraverso il TCR esogeno. La popolazione T che ne deriva è auto-aggressiva. **(c)** Nel caso in cui il donatore del TCR e il ricevente siano MHC-*mismatched*, il TCR esogeno riconosce l'elemento di restrizione MHC condiviso tra donatore e ricevente quando complessato all'Ag esogeno, ma nel ricevente è in grado di riconoscere anche un secondo prodotto MHC del ricevente stesso complessato a peptidi *self*. Tratto e modificato da¹²².

Se ogni singola catena endogena ed esogena si appaiasse con affinità simile e non si verificasse alcuna competizione per componenti cellulari tra le catene, la densità dei TCR esogeni ed endogeni sui linfociti T sarebbe circa il 25% dei TCR totali espressi in membrana, mentre circa il 50% dell'espressione totale di TCR $\alpha\beta$ sarebbe rappresentato da dimeri TCR misti. La formazione di dimeri è stata sempre inferita mediante analisi di marcatura con anticorpi diretti contro le catene singole e tetrameri specifici¹¹⁵. Il rischio della formazione di TCR ibridi è ancora argomento di discussione: al momento, molti gruppi suggeriscono che alti livelli di trascrizione e traduzione delle catene esogene rappresenterebbe una strategia per superare il problema. Questa idea si basa sul concetto che il TCR introdotto esogenamente e il TCR espresso endogenamente competono per i

componenti cellulari del complesso TCR espresso in membrana. Un ulteriore suggerimento per evitare la potenziale competizione di catena deriva da un recente lavoro che mostra l'uso di linfociti T $\gamma\delta$ come bersagli cellulari per la trasduzione¹⁹⁴. Anche se è stata dimostrata la realizzabilità di tale approccio *in vitro*, questo modello necessita di ulteriori considerazioni, dato che cellule T $\gamma\delta$ (che comprendono solo 1-10% dei linfociti T del sangue periferico) differiscono per molti aspetti dalle controparti T $\alpha\beta$.

De Witte e colleghi hanno dimostrato la sicurezza del trasferimento genico del TCR in termini di induzione di autoimmunità in un gruppo di più di 60 topi riceventi linfociti T parzialmente MHC-*mismatched*¹³³. I dati raccolti suggeriscono che l'attivazione di cellule T *self*-specifiche ignoranti o la formazione di eterodimeri misti non rappresenta un serio fattore di rischio per lo sviluppo di patologie autoimmunitarie conseguenti al trasferimento adottivo delle cellule T modificate per l'espressione del TCR. Inoltre, le differenze alleliche degli MHC del donatore e del ricevente sono compatibili con il trasferimento genico di TCR allogenici efficaci e sicuri, in accordo a dati precedenti sulla profilassi e il trattamento delle PTLD con linee T cellulari EBV- o CMV-specifiche¹⁹⁵. Queste osservazioni consentirebbero di generare collezioni di geni TCR utilizzabili per indurre risposte cellulari T Ag-specifiche in un grande numero di riceventi parzialmente MHC-*mismatched*. Ad oggi, gli studi pubblicati non hanno evidenziato fenomeni collaterali imputabili ai meccanismi autoimmuni precedentemente elencati e coinvolgenti il TCR transgenico.

10.5 Meccanismi di sicurezza per l'eliminazione delle cellule T modificate che mostrano autoreattività o espansione clonale

Varie proposte sono state avanzate in merito alla problematica dell'autoimmunità come effetto collaterale di una terapia adottiva che impiega cellule T ingegnerizzate con TCR specifici. Le cellule T trasferite nel paziente possono essere eliminate mediante l'impiego di geni suicidi (ad esmpio HSV-TK) e l'induzione di apoptosi attraverso l'oligomerizzazione di un recettore chimero Fas¹⁹⁶ o la dimerizzazione di una caspasi 9 chimera¹⁹⁷. Tuttavia, questi meccanismi dipendono da alti ed omogenei livelli di espressione dei transgeni o richiedono la purificazione e l'arricchimento delle cellule modificate, procedure potenzialmente in grado di interferire negativamente con la funzionalità cellulare. Recentemente è stato proposto un "sistema di sicurezza" basato su un meccanismo di deplezione intrinseco del recettore T trasferito, ossia la generazione di TCR contenenti epitopi *tag* contro cui dirigere Ab specifici per la deplezione *in vivo*. Cellule T trasdotte con TCR murini (OT-1, P14) e umani (gp100) modificati con un peptide della proteina c-myc

umana come *tag* possono essere deplete *in vitro* utilizzando Ab specifici per c-myc, in grado di mediare la lisi delle cellule ad opera del complemento e la citotossicità anticorpo-dipendente (Kieback E *et al*, comunicazione orale al Xv congresso annuale della ESGCT). Il TCR modificato mantiene le caratteristiche del TCR originale per quanto riguarda l'espressione di superficie, il legame all'Ag e l'induzione di funzioni effettrici. Inoltre, la deplezione *in vivo* delle cellule trasdotte con TCR-*tag* ha consentito la sopravvivenza di topi che avevano sviluppato un diabete autoimmune potenzialmente fatale.

10.6 Trasformazione delle cellule T per mutagenesi inserzionale

Dalla pubblicazione nel 2003 dell'insorgenza di due casi di leucemia in un trial clinico di terapia genica, il rischio di fornire alle cellule T trasdotte e trasferite nel paziente un vantaggio proliferativo legato ad eventi di mutagenesi inserzionale, viene attentamente valutato¹⁶⁰. In quel caso, HSC autologhe di bambini affetti da deficienza immune combinata severa legata all'X (X-SCID) sono state trasdotte con un RV codificante la catena γ comune dei recettori citochinici. Le cellule staminali ematopoietiche potrebbero essere particolarmente suscettibili alla mutagenesi inserzionale, data la prolungata e superiore capacità proliferativa. I PBMC contengono circa lo 0,2% di cellule CD34⁺¹⁹⁸, considerate cellule staminali ematopoietiche. Quindi, una fase aggiuntiva di selezione precedente la manipolazione genetica dei linfociti potrebbe aumentare la sicurezza del trasferimento adottivo. Fortunatamente, il rischio di trasformazione maligna per linfociti T maturi sembra sostanzialmente inferiore rispetto alle cellule HSC (assenza di effetti avversi o tossici dovuti al trasferimento genico retrovirale nei pazienti trattati con linfociti T^{199,200}). E' probabile che non solo le cellule terminalmente differenziate siano intrinsecamente meno suscettibili alla trasformazione maligna rispetto a cellule con uno schema di espressione genica ancora in evoluzione, ma gli stessi RV potrebbero inserirsi in siti diversi da quelli potenzialmente pericolosi nelle cellule staminali. In conclusione, la biologia e la funzionalità delle cellule T non sembrano influenzate dall'integrazione dei vettori²⁰⁰ e ad oggi, non sono stati riportati casi di leucemia causata dalla trasduzione di linfociti T maturi.

11. PROSPETTIVE DELLA TERAPIA GENICA DEL CANCRO MEDIANTE TRASFERIMENTO DI TCR

Differenti strategie potranno essere ottimizzate per migliorare l'efficacia anti-tumorale delle cellule T ingegnerizzate con TCR. Le risposte delle cellule T correlano con i livelli di espressione del TCR e raggiungono un plateau dopo che l'attivazione ha coinvolto un certo numero di TCR^{201,202}. Studi su cellule a duplice specificità dimostrano che, sebbene i livelli di espressione di un TCR introdotto esogenamente siano inferiori rispetto al clonotipo T di origine, sono sufficienti a indurre un'attivazione cellulare comparabile a quella della cellula donatrice¹⁴⁴. Questa finestra sul livello di espressione del TCR è molto importante dal momento che i TCR trasdotti sono spesso espressi in maniera meno efficiente rispetto ai TCR endogeni. Tuttavia, si continuano ad individuare strategie alternative per massimizzare i livelli di espressione del TCR transgenico sulla membrana delle cellule trasdotte.

Dal momento che i linfociti T maturi esprimono geni TCR $\alpha\beta$, il conferimento di nuove specificità mediante eterodimeri transgenici TCR $\alpha\beta$ può essere ostacolato dalla diluizione o dalla competizione in membrana dei complessi endogeni ed esogeni. Molti lavori riportano il trasferimento del TCR in cellule HSC: è probabile che le cellule T generate da cellule HSC trasdotte non esprimano due TCR a causa del fenomeno dell'esclusione allelica. Infatti, dal momento che l'espressione dei geni TCR esogeni è guidata da promotori attivi continuamente, tali geni cominceranno ad esprimersi prima di quelli endogeni, ossia prima del verificarsi del processo di ricombinazione genica. Fino ad oggi, i tentativi di produrre grandi quantità di cellule T *in vitro* è stato limitato dalla mancanza di sistemi di coltura adatti a supportare la differenziazione completa dei progenitori ematopoietici in linfociti T maturi. Attualmente, l'impiego della linea stromale murina OP-9 derivata dal midollo osseo, esprime il ligando di Notch Delta-like1 (DL1) supporta la differenziazione dei linfociti T umani a partire da progenitori isolati da midollo osseo, cordone ombelicale e timo post-natale^{203,204}. La trasduzione dei progenitori ematopoietici umani da timo e cordone ombelicale con TCR per Ag selezionati e la successiva coltura su monostrati cellulari di OP9-DL1 genera linfociti T maturi e funzionali con specificità per l'Ag²⁰⁵. La trasduzione dei progenitori con costrutti retrovirali codificanti la catena TCR α e/o TCR β di TCR per Ag tumorali (Melan-A), virali (CMV) e del complesso minore di istocompatibilità (HA-2), fornisce un vantaggio competitivo su altre popolazioni cellulari nella cocoltura PO9-DL1 in termini di velocità

e misura della maturazione delle cellule T. Il trasferimento genico risulta nella forte esclusione allelica al locus TCR β , come dimostrato dall'espressione limitata (<1%) delle catene TCR β endogene da parte delle cellule T mature esprimenti il TCR transgenico. Le cellule T Ag-specifiche possono essere facilmente isolate dalle coculture sulla base di marcatori specifici per linee cellulari T e marcatura con tetramero specifico, quindi ulteriormente espanse *in vitro* e testate per attività funzionale Ag-specifica. Accurati modelli animali dovranno accertare la funzionalità *in vivo* di queste cellule dopo trasferimento adottivo e dimostrare la validità dell'approccio per immunoterapia adottiva nell'uomo. Tuttavia le considerazioni più importanti riguardano il processo potenziale di mutagenesi inserzionale che la manipolazione genetica di cellule HSC può indurre, già discusso in un precedente paragrafo.

Studi recenti hanno dimostrato che TCR “forti” o “dominanti” sono efficientemente espressi nei linfociti T umani, mentre TCR “deboli” sono scarsamente espressi. Nonostante le basi molecolari che determinano la forza del TCR non siano ancora state chiarite, una rapida eterodimerizzazione delle catene TCR e l'associazione efficiente con molecole CD3 sono probabilmente proprietà dei TCR dominanti. Quindi, si ipotizza che una manipolazione strutturale che aumenti l'efficienza dell'appaiamento e la competizione per l'associazione a CD3 sia predittiva di un'aumentata espressione di complessi TCR transgenici in cellule T umane modificate geneticamente. La dimostrazione del principio è fornita dalla fusione di CD3 ζ ai domini extracellulari delle catene TCR α e TCR β risultante in una preferenziale eterodimerizzazione²⁰⁶. Oltre all'impiego di CAR, nuove soluzioni cominciano ad emergere. Recentemente, alcuni gruppi hanno proposto l'introduzione di residui di cisteina nelle catene TCR per l'induzione di legami disolfuro intercatena che promuovono l'appaiamento preferenziale di catene TCR a costituire TCR desiderati²⁰⁷⁻²⁰⁹. Analogamente, catene TCR ibride in cui la regione costante umana è sostituita da sequenze murine favoriscono l'assemblaggio di TCR specifici e l'associazione con molecole CD3 in cellule T umane^{117,209}. Tuttavia, un lavoro recente del gruppo di Stauss ha dimostrato che, nonostante l'espressione di TCR ibridi o modificati con cisteine favorisca l'espressione in membrana e il legame a tetrameri specifici, tale espressione non risulta in un'aumentata avidità funzionale o nell'incremento dell'attività citotossica.

La selezione *ex vivo* di cellule T correttamente trasdotte che si traduce in un aumento della frequenza di precursori di cellule T modificate e/o l'inclusione di una componente cellulare di supporto, rappresentata da linfociti T CD4⁺, potrebbero favorire l'attività anti-tumorale dei CTL trasferiti adottivamente. Ancora, il blocco della segnalazione intracellulare via TGF- β nelle cellule

T modificate e la somministrazione di alte dosi di IL-2 nei pazienti dopo trasferimento cellulare adottivo favorirebbero la sopravvivenza e l'efficacia delle cellule infuse. Per quanto riguarda i sistemi di trasferimento, l'impiego di vettori lentivirali per trasdurre linfociti T non proliferanti e l'ingegnerizzazione dei costrutti per evitare il silenziamento dei transgeni nel tempo sono ulteriori obiettivi che garantirebbero miglioramenti degli attuali protocolli ACT. In ultimo, bersagliare il tumore su più fronti impiegando popolazioni miste di linfociti ingegnerizzati per l'espressione di TCR multipli aumenterebbe l'efficacia della sorveglianza immunitaria contro eventuali fenomeni di evasione da parte del tumore.

MODELLO SPERIMENTALE

Alla luce degli argomenti introdotti, gli obiettivi specifici del mio progetto di ricerca sono stati: i) lo sviluppo di un protocollo per la generazione di CTL diretti contro Ag tumorali desiderati; tale protocollo aveva come obiettivi principali l'affidabilità, la riproducibilità e l'orientamento all'applicazione clinica e si è basato sul ridirezionamento di PBMC in coltura mediante trasferimento genico di TCR con LV; ii) la caratterizzazione di una popolazione di cellule T specifiche, indotte a seguito del trasferimento di TCR ristretti per molecole MHC di classe I ed espanse *in vitro*; iii) la valutazione e la validazione direttamente *in vivo* del ruolo antitumorale delle cellule trasdotte.

Melana-A/MART-1, modello antigenico tumorale di questo studio, è un gene espresso nella maggior parte dei melanomi e nei melanociti, codificante una proteina di 118 aminoacidi dalla funzione sconosciuta. Diversi aspetti rendono tale Ag un eccellente potenziale bersaglio delle strategie terapeutiche che utilizzano il trasferimento genico del TCR: l'alta frequenza di espressione nella maggior parte dei pazienti di melanoma, l'osservazione che l'ignoranza immunologica a Melan-A viene superata nella maggioranza di questi pazienti, la possibilità di rilevare *in vivo* elevati livelli di cellule T Melan-A-specifiche. Rispetto ad altri modelli tumorali, il melanoma offre migliori garanzie di risultati clinici positivi, dato che gli Ag melanocitari sono più specifici di altri TAA e vengono espressi da tessuti e cellule normalmente più accessibili ai linfociti T rispetto ad Ag associati ad altri tumori.

Il recettore per l'Ag (TCR) impiegato nel modello sperimentale qui discusso è stato derivato da uno specifico clone CTL, a sua volta isolato dal sangue periferico di un paziente affetto da melanoma metastatico. Il trasferimento genico del TCR in PBMC umani è stato eseguito mediante l'impiego di LV. Questi vettori virali di recente sviluppo, pur mantenendo le caratteristiche comuni a tutti i RV, possono mediare l'integrazione di una copia del loro genoma nel DNA di cellule non in attiva proliferazione, offrendo quindi idealmente l'opportunità unica di eliminare fasi di manipolazione *in vitro* dei linfociti T che ne condizionano negativamente le proprietà biologiche. Essendo la cotrasduzione con vettori distinti e la trascrizione coordinata e simultanea dei transgeni, quali le catene TCR, i principali fattori metodologici limitanti l'efficienza di espressione del TCR in membrana, si è ritenuto di ottimizzare l'approccio di trasferimento genico mediante l'utilizzo di un vettore bidirezionale recentemente sviluppato²¹⁷. Nel lavoro in cui si descrisse per la prima volta

questo costrutto, si era paragonata l'efficienza del duplice trasferimento genico mediato da vettori bidirezionali con quella osservata per vettori bicistronici basati su elementi IRES o peptidi *self-processing*. Sebbene tutti questi vettori consentano di trasferire ed esprimere due geni, i livelli osservati variano significativamente in funzione del costrutto: in generale, i LV bidirezionali consentono un efficiente duplice trasferimento genico e l'espressione coordinata *ex vivo* e *in vivo*, con prestazioni superiori rispetto ad altre tecnologie attualmente disponibili. L'espressione coordinata è superiore anche nel caso di preparazioni virali a basso titolo, garantendo quindi l'integrazione in basso numero di copie nel genoma delle cellule ospiti. In particolare, l'analisi di cellule contenenti una sola copia del vettore integrato dimostra che i) la trascrizione divergente è guidata dal singolo promotore bidirezionale, ii) l'espressione di entrambi i transgeni è coordinata e correlata funzionalmente, iii) i promotori bidirezionali sono consistentemente attivi in tutti i tipi di cellule bersaglio valutate senza il verificarsi di fenomeni di silenziamento o l'instaurarsi di una casuale direzione fissa di trascrizione, anche dopo differenziamento cellulare. Le prestazioni del vettore bidirezionale sono state valutate anche in bersagli cellulari rilevanti per applicazioni di terapia genica: i risultati ottenuti confermano un efficace duplice trasferimento genico in cellule ematopoietiche primitive, "commissionate" e differenziate. Nello specifico, l'espressione coordinata di due geni *reporter* è stata dimostrata in PBL trasdotti in condizioni standard di proliferazione indotta dalla costimolazione con anticorpi anti-CD3/CD28 e in PBL non proliferanti trattati per quattro giorni con IL-7, una citochina attivante che tuttavia consente di conservare il fenotipo cellulare *naive*. I livelli di espressione coordinata dei transgeni, per infezioni a basso numero di copie del vettore virale, si aggiravano intorno al 10% e 5%, rispettivamente per PBL attivati e trattati con IL-7²¹⁷.

Infine, nonostante la tecnica del *TCR transfer* adottata in protocolli di ACT sia già approdata alla sperimentazione clinica, la letteratura scientifica manca di importanti risposte sul destino delle cellule trasferite *in vivo*. Tali risposte saranno fornite solo dall'impiego di adeguati modelli animali preclinici. A questo scopo si è utilizzato un modello tumorale di melanoma, ottenuto inoculando topi Scid con cellule SK-23 MEL.

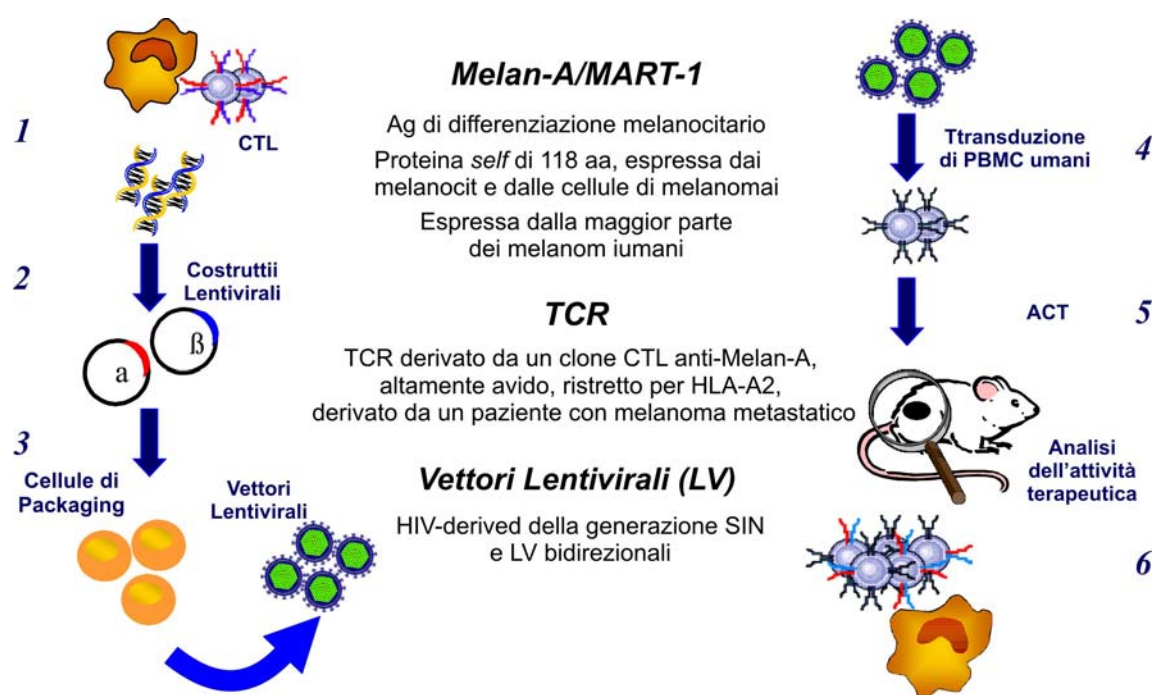


Figura 8. Rappresentazione schematica del progetto di ridirezionamento dell'immunità anti-tumorale in immunoterapia adottiva. Cloni di cellule T specifici per l'Ag melanocitario Melan-A vengono isolati ed espansi a partire dai PBMC di pazienti con cancro metastatico. I TCR derivati da cloni con buone capacità di riconoscimento dell'Ag (elevata avidità funzionale) vengono quindi caratterizzati e isolati per il clonaggio in vettori lentivirali di ultima generazione. Le particelle vettore così ottenute consentono il trasferimento dei geni delle catene TCR α e TCR β in effettori alternativi (PBMC umani). Il destino e l'efficacia terapeutica dei PBMC trasdotti vengono valutate in un modello tumorale preclinico, ottenuto inoculando topi Scid con cellule di melanoma SK-23 MEL.

MATERIALI E METODI

1. LINEE CELLULARI

- **Linee cellulari di melanoma**

Si sono utilizzate le seguenti linee melanocitarie derivate da pazienti: *SK-23 MEL* (Melan-A⁺/HLA-A2⁺), *MeWo* (Melan-A⁺/HLA-A2⁺), *A375* (Melan-A⁻/HLA-A2⁺) e *PDO-328 MEL* (Melan-A⁻/HLA-A2⁻). Le linee SK-23 MEL e PDO-328 MEL sono state mantenute in terreno di coltura Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM, Gibco, Invitrogen) al 10% di siero bovino fetale (FBS, Euroclone) precedentemente inattivato al calore (56 °C per 30 minuti), addizionato con 150 U/ml Streptomicina, 200 U/ml Penicillina (Cambrex BioWhittaker), 116 mg/L L-arginina HCl, 36 mg/l L-asparagina, 219 mg/l L-glutammina (Merck), Hites 1X (1 nM idrocortisone, 0,5 µg/mL insulina, 10 µg/mL transferrina, 1 nM 17-β-estradiolo, 3 nM selenite di sodio) (Sigma) e 1 mM Hepes (n-2-idrossimetilpiperazina-n-2-acidoetalsulfonico) (Cambrex BioWhittaker). Per la linea A375 si è utilizzato il terreno Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) al 10% di FBS addizionato con 150 U/ml Streptomicina, 200 U/ml Penicillina, 2 mM Glutammina (Cambrex BioWhittaker) e 2 mM Hepes (terreno DMEM completo). Infine la linea MeWO è stata mantenuta in RPMI 1640 (Euroclone) al 10% di FBS addizionato con gli stessi reagenti descritti per il terreno della linea A375 (terreno RPMI completo).

- **Linee leucemiche**

Jurkat e *MOLT-3*: linee leucemiche T umane, CD4⁺, mantenute in terreno RPMI 1640 completo al 10% di FBS. In particolare, la linea Jurkat utilizzata in questo studio esprime il TCR endogeno a bassi livelli.

T2: linea leucemica T umana difettiva per l'espressione del trasportatore TAP. TAP trasloca i peptidi dal citosol al lume del reticolo endoplasmatico (RE) e facilita il legame del peptide alle molecole MHC-I. In assenza del peptide, molecole di classe I parzialmente assemblate sono trattenute nel RE grazie ad un meccanismo di "controllo di qualità". Le cellule TAP-deficienti esprimono livelli decisamente inferiori di molecole MHC-I sulla superficie cellulare. L'aggiunta di un peptide esogeno stabilizza i complessi e ne ripristina l'espressione. La linea

T2 è stata mantenuta in IMDM al 10% di FBS, completo degli additivi 150 U/ml streptomicina, 200 U/ml penicillina, 116 mg/L L-arginina HCl, 36 mg/l L-asparagina, 219 mg/l L-glutammina, 1mM HEPES.

- **293 T**

Linea cellulare di carcinoma renale umano, ad elevata trasfettabilità ed espressione dei transgeni. Mantenuta in terreno DMEM completo al 10% di FBS e utilizzata come cellula di *packaging* per la produzione di particelle virali.

- **Linee cellulari linfoblastoidi**

LCL: le cellule linfoblastoidi trasformate dal virus di Epstein Barr (EBV) sono state ottenute infettando i PBMC di un donatore sano, tipizzato per HLA, con il virus EBV contenuto nel sovranatante di coltura della linea cellulare B95.8 (*American Type Culture Collection*). La linea B95.8 è stata originariamente ottenuta dall'infezione di linfociti circolanti nel sangue periferico di scimmia *marmoset* con il virus EBV. La coltura è stata inizialmente addizionata con ciclosporina A (CsA, Sandoz Pharma AG) alla concentrazione finale di 700 ng/ml, al fine di inibire la crescita di cellule T. Le cellule LCL sono state successivamente mantenute in terreno di coltura RPMI 1640, al 10% di siero umano tipo AB inattivato al calore (Cambrex BioWhittaker), addizionato con 1 mM Sodio Piruvato (Cambrex BioWhittaker), 10 mM Hepes (Cambrex BioWhittaker), 2 mM Ultraglutammina (Cambrex BioWhittaker) e 1% antibiotico/antimicotico (Gibco, Invitrogen). Ci riferiremo in seguito a questo terreno come RPMI HS completo.

VISY-EBV: linea linfoblastoide B, immortalizzata da EBV e positiva per l'allele HLA-A2, mantenuta in coltura in terreno RPMI al 10% di FBS, addizionato con gli additivi del terreno delle LCL addizionato di siero umano.

Tutte le linee cellulari sono state cresciute in fiasche da 25 o 75 cm² (Falcon, Becton Dickinson) in incubatore termostato a 37 °C, all'8% (linee cresciute in IMDM) o 5% (tutte le restanti linee) di CO₂ e 95% di umidità. Le linee cellulari VISY-EBV, SK-23 MEL, PDO-328 e T2 sono state gentilmente fornite dalla Dr.ssa Mandruzzato del Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche dell'Università di Padova, mentre la linea MeWO proviene dal laboratorio del Dr. Maio presso l'istituto CRO di Aviano (PN).

2. PBMC

Tutti i PBMC utilizzati in questo studio sono stati separati secondo gradiente di Ficoll (GE, Healthcare) da 10-20 ml di sangue venoso periferico anticoagulato con eparina o *buffy coat* di donatori sani. Le cellule mononucleate ottenute sono state congelate immediatamente a -80 °C in una soluzione contenente 20% p/V D-glucosio (Fluka) e 33% Dimetilsolfossido (DMSO; Sigma) in RPMI 1640 o seminate alla concentrazione di 1×10^6 cellule/pozzetto in piastre da 24 (Falcon) e attivate per 48 ore con Fitoemoagglutinina (PHA, Sigma-Aldrich) ad una concentrazione finale di 10 µg/ml e IL-2 100 U.I./mL (Proleukin Chiron Corporation). In alternativa alla PHA, si sono anche utilizzati mAb anti-CD3/CD28 immobilizzati su biglie immunomagnetiche (Dynabeads® CD3/CD28, Dynal) al rapporto di 3 biglie per ogni cellula.

3. COLTURE CTL

- **Clone CTL SELA-A 64**

Clone CTL specifico per l'Ag Melan-A/A2₂₆₋₃₅ derivato dai PBMC del sangue periferico di un paziente affetto da melanoma metastatico isolati mediante marcatura con tetramero Melan-A/A2 e successiva separazione in citofluorimetria a flusso¹⁰⁸. Il clone è stato mantenuto in passaggio continuo *in vitro* mediante ristimolazioni settimanali in piastre da 24 pozzetti a fondo piatto (Falcon) alla concentrazione di 5×10^5 cellule per pozzetto in presenza di 2×10^5 cellule VISY-EBV e 1×10^6 PBMC, precedentemente irradiati a 100 e 50 Gy rispettivamente, in un volume finale di 2 mL di IMDM al 10% di siero umano (Cambrex BioWhittaker), completo di tutti gli additivi (150 U/ml streptomicina, 200U /ml penicillina, 116 mg/L L-arginina HCl, 36 mg/l L-asparagina, 219 mg/l L-glutammina, 1mM Hepes) e addizionato di β-mercaptoetanololo (0,5 µM) e di IL-2 (100 U.I./mL) (Proleukin, Chiron Corporation). Durante le ristimolazioni settimanali, sono state utilizzate come cellule presentanti l'Ag alternativamente PBMC o cellule VISY-EBV, entrambi incubati per 45 minuti a temperatura ambiente in presenza del peptide Melan-A modificato (A27L), alla concentrazione finale di 5µM. Il peptide Melan-A modificato A27L (ELAGIGILTV) è stato sintetizzato nel laboratorio del Dr. Marin, presso il centro CRIBI di Padova. A27L presenta una sostituzione

dell'alanina per leucina in posizione 2 dalla terminazione NH_2 rispetto alla sequenza aminoacidica del peptide naturale. Tale sostituzione rende il peptide Melan-A più fortemente immunogenico. Test precedenti avevano confermato la cross-reattività del clone ristimolato con l'analogo A27L verso peptidi Melan-A processati naturalmente¹⁰⁸.

- **Linea cellulare T CD4⁺ EBV-specifica**

Cellule T CD4⁺ EBV-specifiche sono state ottenute da PBMC cocoltivati con LCL autologhe irradiate a 40 Gy in rapporto 40 PBMC: 1 LCL (*responder: simulator* = 40:1) in terreno RPMI HS completo e mantenuti in piastre da 24 pozzetti (Corning) alla concentrazione di 2×10^6 cellule/ml a 37 °C e 6,5% CO₂. Al giorno 10 e successivamente su base settimanale, le cellule sono state raccolte, lavate e ristimate con LCL irradiate in rapporto R:S = 4:1. Al giorno 14 è stata aggiunta IL-2 alla concentrazione di 35 U.I./ml (Proleukin Chiron Corporation), quindi ripristinata ogni 2 giorni. Dopo la terza stimolazione con LCL, le cellule T CD4⁺ sono state selezionate mediante separazione immunomagnetica, utilizzando il CD4⁺ T cell Isolation Kit II (Myltenyi Biotech), secondo le istruzioni del produttore. Ad ogni ristimolazione la concentrazione delle cellule CD4⁺ in coltura è stata riportata a $1,5 \times 10^6$ cellule/ml (protocollo modificato da Heslop H. et al, 1996).

4. VETTORI

- **Vettori di packaging** (Fig. 9)

*p8.74*²¹⁰: vettore lentivirale di *packaging* codificante per gag e pol di HIV-1, privo di tutti i geni accessori di HIV-1 (*vif*, *vpu*, *vpr* and *nef*). Usato per produrre lentivirus ricombinanti.

*hCMV-G*²¹¹: vettore usato per pseudotipizzare le particelle vettore con proteine VSV-G.

- **Vettori di trasferimento** (Fig. 9)

pRRL.sin18.cPPT.CMV.GFP.WPRE (*pCMV-EGFP*): vettore SIN derivato da HIV-1 in cui la regione U3 dell'LTR in 3' risulta deleta e il gene *reporter* EGFP (enhanced green fluorescent protein) è sotto il controllo della sequenza promotore/*enhancer* del Citomegalovirus umano CMV (hCMV). Le sequenze aggiuntive cPPT e WPRE sono responsabili di un aumento dell'espressione del transgene. Utilizzato come vettore di controllo.

pCMV-TCR α e *pCMV-TCR β* : vettori derivati da pCMV-EGFP sostituendo il transgene EGFP con le sequenze codificanti rispettivamente le catene complete α e β del TCR del clone SELA-A 64.

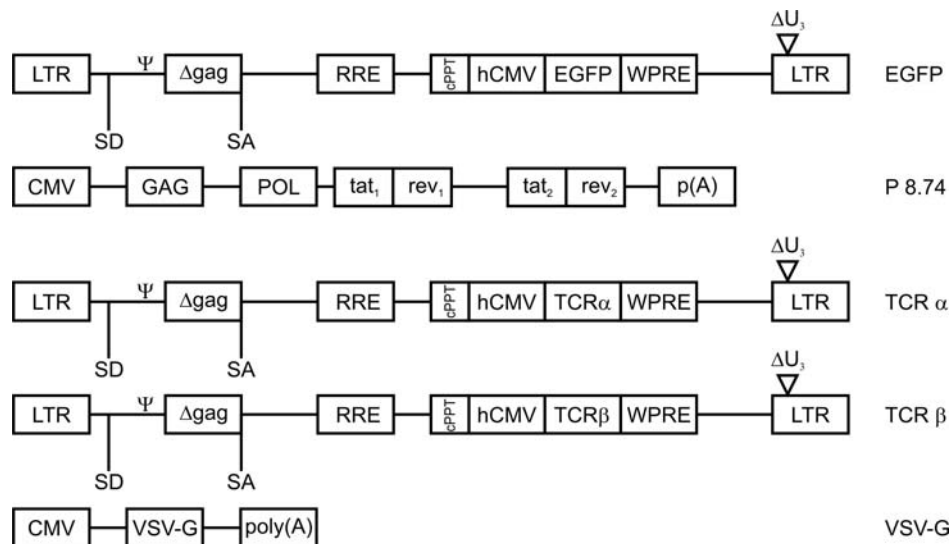


Figura 9. Disegni schematici dei vettori di *packaging* e di trasferimento utilizzati per la produzione di particelle lentivirali non replicanti monocistroniche

- **Altri vettori** (Fig. 10)

pBlu2KSM.minCMVPGK: costruito utilizzato per clonare il promotore bidirezionale del vettore lentivirale bidirezionale.

#310: costruito lentivirale utilizzato per generare vettori lentivirali bidirezionali.

I vettori pBluKS e #310 sono stati gentilmente forniti dal Dr. Luigi Naldini (DIBIT, Milano).

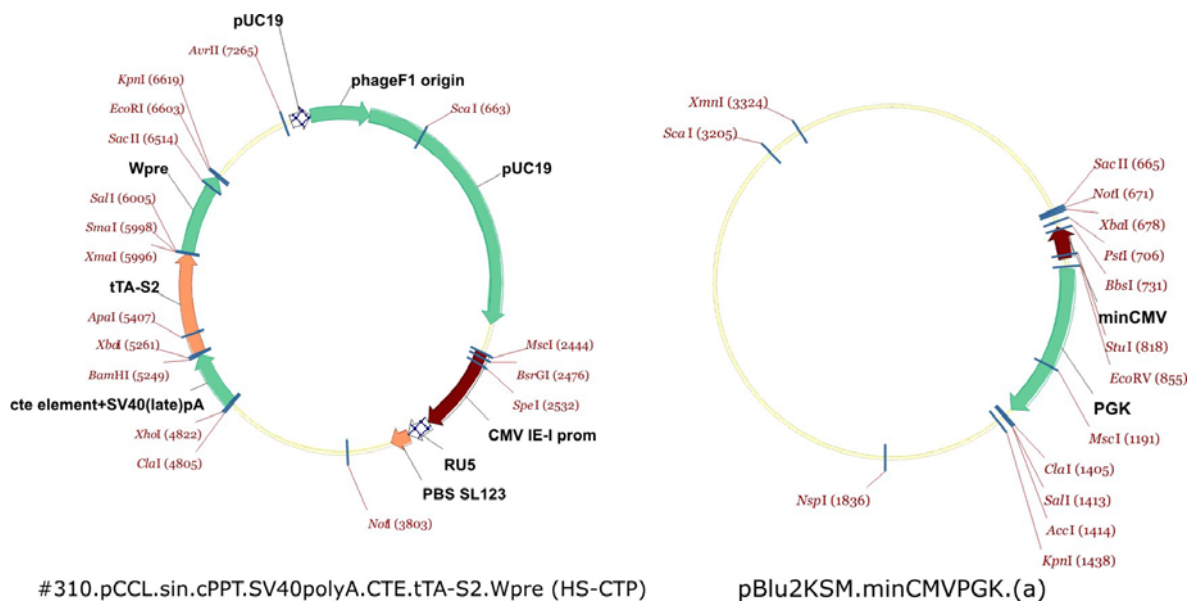


Figura 10. Mappe dei costrutti utilizzati per la produzione di vettori lentivirali bidirezionali.

5. GENERAZIONE DI COSTRUTTI LENTIVIRALI

• Vettori monocistronici

L'estrazione dell'RNA totale dal clone CTL SELA-A 64 è stata eseguita con TRIzol (Invitrogen), secondo le indicazioni del produttore. Per la retrotrascrizione a cDNA si sono utilizzati i reagenti oligodT (Invitrogen) e M-MLV (retrotrascrittasi, Invitrogen). Allo scopo di determinare l'identità delle catene TCR del clone CTL, si sono condotte diverse reazioni PCR sul cDNA precedentemente ottenuto, utilizzando un pannello di oligonucleotidi AV (regione variabile della catena α) e BV (regione variabile della catena β) specifici del repertorio TCR $\alpha\beta$ umano. L'analisi e il successivo sequenziamento di CDR3 hanno permesso di derivare la sequenza cDNA completa delle catene TCR, dimostrando che il clone CTL SELA-A 64 esprime i segmenti genici riarrangiati $\alpha 2.2$ e $\beta 14$ ²¹². Le sequenze complete sono quindi state amplificate con *primer* contenenti siti per enzimi di restrizione, necessari all'inserimento dei prodotti di PCR in due distinti costrutti pCR2.1 TOPO (Invitrogen). Il frammento contenente il transgene di ogni vettore TOPO2.1 è stato sequeziato e clonato tra i siti XbaI e SalI del vettore pCMV-EGFP in sostituzione del transgene EGFP, generando così i vettori di trasferimento pCMV-TCR α e pCMV-TCR β .

• Vettori bidirezionali

I vettori pCR2.1 TOPO contenenti TCR α o TCR β sono stati utilizzati come costrutti donatore delle sequenze TCR per la generazione di vettori lentivirali bidirezionali (LV-BD). I vettori BD-TCR, codificanti le catene TCR anti-Melan-A, sono stati ottenuti attraverso fasi successive di clonaggio in diversi costrutti intermedi. Le sequenze delle catene TCR α e β sono state inizialmente clonate nel medesimo vettore intermedio pBluKS, contenente il promotore bidirezionale (Fig. 11a). In particolare, la catena TCR β è stata clonata a valle del promotore minCMV, usando il sito di restrizione Xba-I. L'inserto contenente la catena α in orientamento anti-senso è stato ottenuto dal corrispondente vettore pCR2.1TOPO usando i siti di restrizione Kpn-I e EcoRV e trasferito nel vettore pBluKS tra i siti di restrizione Cla-I and Kpn-I, a valle del promotore hCMV. Infine, la sequenza completa di pBluKS- $\alpha\beta$ contenente i transgeni legati al promotore bidirezionale sono stati clonati nel LV #310 utilizzando il sito di restrizione Sal-I (Fig. 11b). Gli inserti clonati sono stati identificati ad ogni passaggio mediante PCR, digestione enzimatica e sequenziamento del DNA. Si sono così ottenuti due distinti vettori BD-TCR (BD-I e BD-V), distinguibili esclusivamente per la posizione relativa del promotore e quindi dei transgeni rispetto alle altre sequenze lentivirali (Fig. 11c).

Tutti i plasmidi sono stati espansi mediante trasformazione e coltura di batteri E.Coli del ceppo AG1, resi competenti per la trasformazione mediante shock termico. I vettori utilizzati per la produzione del vettore virale sono stati purificati mediante EndoFree Very Low-Copy Plasmids Maxi kit (QIAGEN), allo scopo di ottenere DNA puro e concentrato.

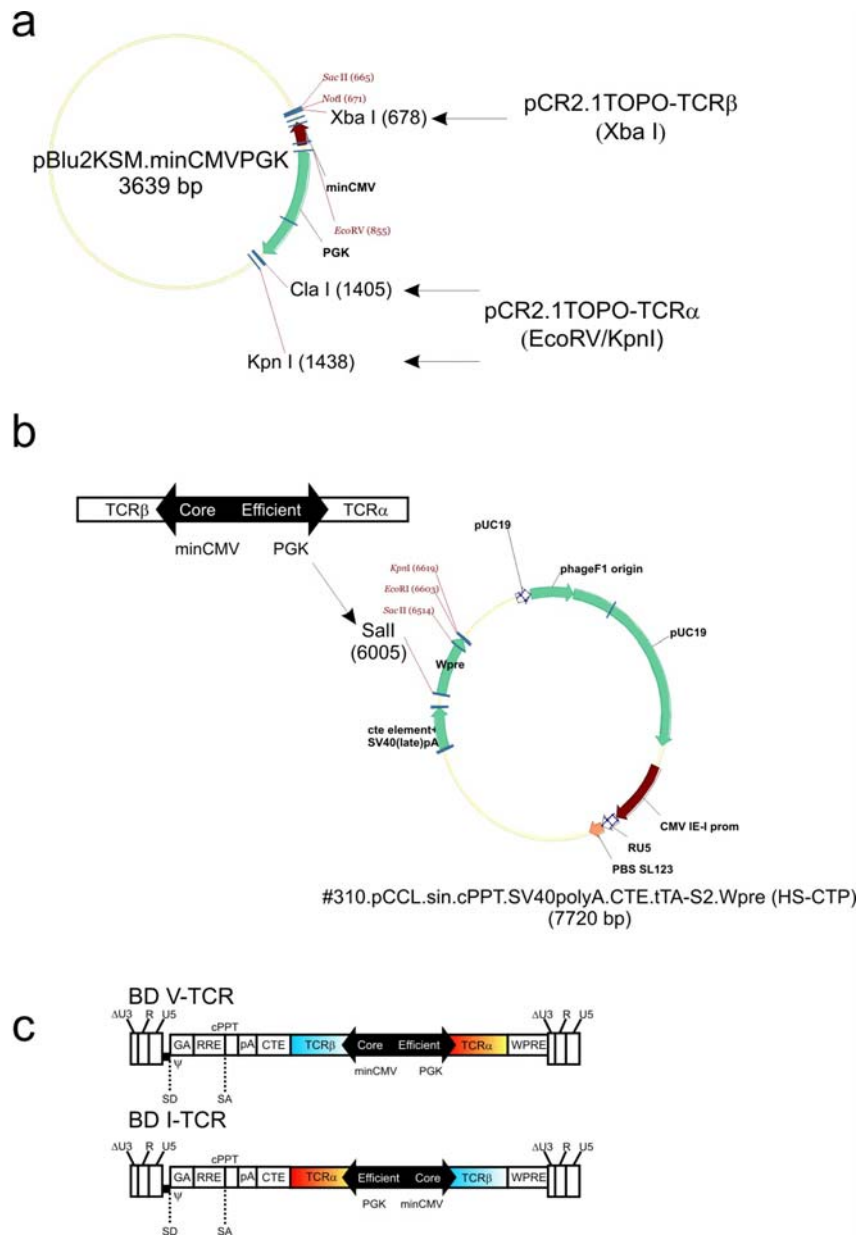


Figura 11. Fasi di clonaggio per la generazione dei vettori bidirezionali. (a) Inserimento delle sequenze complete codificanti le catene del TCR nel vettore intermedio pBluKS. **(b)** Clonaggio dell'inserto contenente il vettore bidirezionale nel costrutto lentivirale finale #310. **(c)** Schema dei vettori bidirezionali BD-I e BD-V.

6. PRODUZIONE VIRALE

Per la produzione dei LV pCMV-EGFP, CMV-TCR α e CMV-TCR β , 4×10^6 cellule di *packaging* della linea 293T sono state piastrate e coltivate in fiasche da 75 cm² (Falcon, Becton Dickinson) per 24 ore in terreno completo. Il terreno di coltura è stato quindi rimosso e le cellule

trasfettate mediante la tecnica della coprecipitazione con calcio-fosfato a 3 plasmidi, utilizzando le seguenti quantità di DNA: 12 µg di vettore di trasferimento, 6 µg di plasmide p8.74, 1,2 µg di plasmide hCMV-G. Una soluzione contenente il DNA plasmidico, 62 µl di CaCl₂ (Fluka) e H₂O al volume finale di 500 µl è stata aggiunta, goccia a goccia, a 500 µl di tampone HBS 2X (274 mM NaCl₂, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄*7H₂O, 12 mM Destrosio, 42 mM Hepes, pH 7,1) e incubata per 20 minuti a temperatura ambiente. Il mix di trasfezione così ottenuto è stato trasferito, goccia a goccia, nella fiasca di coltura delle cellule di *packaging*. Dopo 18 ore di incubazione il mix è stato sostituito con 8 ml di terreno fresco. A 48 ore dalla trasfezione il sovranatante virale è stato raccolto, centrifugato per 10 minuti a 1500 g, filtrato con filtri di 0,45 µm di diametro per rimuovere cellule e detriti e aliquotato in ampolline da congelamento da 1 o 2 ml per la conservazione a -80 °C. Una seconda raccolta è stata eseguita a 72 ore dalla trasfezione. I vettori lentivirali di alcune produzioni sono stati concentrati mediante ultracentrifugazione a 76000 g per 2 ore a 4 °C e risospesi in terreno RPMI semplice.

La produzione di LV bidirezionali ha previsto condizioni identiche di trasfezione e raccolta, eccetto che per un'unica variante: 10 mM Sodio Butirrato (Fluka, Sigma) è stato aggiunto nel mezzo di coltura al termine della trasfezione e mantenuto per 6-8 ore di incubazione. Il terreno è stato quindi sostituito con terreno fresco completo privo di sodio butirato.

Per determinare la quantità di particelle vettore presenti nelle preparazioni virali è stato effettuato il dosaggio, mediante ELISA (kit InnostestTM HIV Ag mAb, INNOGENETICS), del quantitativo di p24^{gag} equivalenti presente nei sovrinatanti virali. Il titolo, espresso in termini di concentrazione di particelle virali, variava da 0,5 a 3 µg p24/mL per produzioni virali concentrate. Sulla base di valutazioni precedenti si è assunta un'infettività pari a 0,5-1x10⁵ Unità Trasducenti (TU)/ng di p24 per i vettori CMV monocistronici e a 2-6x10⁴ TU/ng of p24 per i vettori bidirezionali. Per ogni traduzione definiremo MOI il rapporto tra TU e numero assoluto di cellule trasdotte.

7. TETRAMERO

L'analisi citofluorimetrica per l'espressione del TCR anti-Melan-A è stata condotta marcando le cellule con tetramero Melan-A₂₆₋₃₅/A2 specifico, prodotto nel nostro laboratorio¹⁰⁸. Il tetramero Melan-A/A2 è costituito dalla molecola HLA-A2, dalla β_2 -microglobulina e dal peptide Melan-A₂₆₋₃₅ A27L. Il peptide modificato aumenta la stabilità del tetramero senza alterarne la capacità di legame con il TCR specifico²¹³.

8. TRASFERIMENTO GENICO DI MELAN-A TCR $\alpha\beta$ E CLONAGGIO DI CELLULE T JURKAT ESPRIMENTI IL TCR

Il trasferimento genico del TCR in cellule della linea Jurkat a bassa espressione del TCR endogeno è stato condotto incubando 2×10^5 cellule per pozzetto in piastre da 12 (Falcon) con 1 ml di sovrinatante virale in presenza di 8 $\mu\text{g/ml}$ di solfato di protamina (Sigma), a 37 °C e 5% CO₂. Cellule T Jurkat non trasdotte sono state utilizzate come controllo negativo. Dopo un primo ciclo di trasduzione di 6 ore con sovrinatante virale contenente pCMV-TCR α , le cellule sono state lavate (10 minuti a 250 g) e immediatamente sottoposte ad un ulteriore ciclo di trasduzione di 6 ore con il vettore pCMV-TCR β . Al termine del secondo ciclo di trasduzione il terreno fresco completo è stato ripristinato in coltura e le cellule espanse.

Al fine di isolare popolazioni clonali ad alta espressione del TCR transgenico, le cellule Jurkat trasdotte sono state piastrate e coltivate in condizioni di diluizione limite in micropiastre da 96 pozzetti (Falcon). I cloni cellulari T così ottenuti sono stati valutati per l'espressione del TCR anti-Melan-A in citofluorimetria. In particolare, il clone J19 è stato selezionato ed espanso sulla base di un'elevata affinità di legame al tetramero specifico (99% cellule T tetramero⁺). La stabilità dell'espressione, valutata mediante marcatura con tetramero, e la funzionalità del TCR (segnalazione del Ca²⁺ TCR-dipendente) sono state confermate durante tutto il periodo di impiego del clone per gli esperimenti descritti (> 12 mesi).

9. MISURAZIONE DEL CALCIO NELLA SOSPENSIONE CELLULARE

La funzionalità del TCR transgenico espresso sulla membrana delle cellule Jurkat trasdotte è stata valutata mediante rilevazione dei livelli intracellulari di calcio dopo stimolazione con Ab anti-CD3 (OKT-3, prodotto nel nostro laboratorio), anti-TCR (TCR $\alpha\beta$, clone WT31; Becton Dickinson) e anti-V β 14 (clone CAS.1.1.3; Biodesign). Come indicatore efficiente della concentrazione di Ca²⁺ è stato utilizzato il Fura-2 (Molecular Probes), colorante fluorescente sensibile al Ca²⁺ che può essere caricato nelle cellule permeabilizzate. A tale scopo, 10⁷ cellule Jurkat mock e trasdotte sono state incubate per 30 minuti a 37 °C, in agitazione continua, in 1 ml di terreno RPMI 10% FBS completo, addizionato con 2,5 μ M Fura-2, 1 μ l di una soluzione al 20% di Pluronic (Molecular Probes) e 25 μ l di Sulfinpirazone 10 mM (Sigma). Questa mix è composta, oltre che da Fura-2, da un detergente che favorisce l'entrata del colorante esterificato nelle cellule (Pluronic) e un bloccante dei trasportatori di anioni organici delle membrane cellulari per impedire la compartimentalizzazione o l'estrusione del colorante dalla cellula (Sulfinpirazone). Al termine dell'incubazione la soluzione è stata diluita con 1 ml di tampone carbonato glucosidato e mantenuta per altri 30 minuti a temperatura ambiente (RT). Prima della lettura le cellule sono state lavate e risospese in un volume identico della stessa soluzione salina, addizionata di sulfinpirazone (50 μ l). Ogni lettura è stata eseguita su 2x10⁶ cellule stimulate direttamente in cuvetta mediante l'aggiunta di 20 μ g/ml OKT-3, 1 μ l di una soluzione salina di tetramero Melan-A 1 μ M o 5 μ l mAb anti-V β 14. Tutte le misurazioni (lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione, 340/380 e 505 nm rispettivamente) sono state condotte utilizzando lo spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS-50B (Perkin Elmer). Le variazioni della concentrazione intracellulare di calcio [Ca²⁺] sono state espresse come variazione del rapporto della luce emessa a 505 nm in seguito all'eccitazione alle due lunghezze d'onda, 340 and 380 nm (R340/380).

10. TRASFERIMENTO GENICO DI MELAN-A TCR $\alpha\beta$ IN LINFOCITI T PRIMARI E CTL CD4⁺ ANTI-EBV

Si descrivono in questa sezione le condizioni generali di trasduzione dei PBMC e CTL CD4⁺ anti-EBV con i vettori pCMV-EGFP, pCMV-TCR α , pCMV-TCR β e BD-TCR. Parametri specifici (MOI, volumi di incubazione e numero di cicli di trasduzione) relativi ai singoli esperimenti saranno precisati nella sezione *risultati*.

Le prove di trasduzione dei PBMC attivati per 48 ore con PHA o biglie anti-CD3/CD28 (vedi paragrafo *PBMC*) sono state inizialmente condotte incubando 1×10^6 cellule T con 1 ml (quando non altrimenti specificato) di sovrinatante virale in piastre da 24 pozzetti, a 37 °C e 5% CO₂. Ogni ciclo di trasduzione variava da un minimo di 6 ad un massimo di 72 ore. Cicli successivi di trasduzione sono stati condotti uno consecutivamente all'altro. Al termine dell'ultimo ciclo le cellule sono state risospese in terreno fresco completo addizionato con 100 U.I./ml IL-2 e mantenute in coltura per 72 ore, prima di essere testate in citofluorimetria per l'espressione del transgene EGFP o del TCR anti-Melan-A. CTL CD4⁺ anti-EBV al V-VI giorno dopo la ristimolazione sono stati trasdotti secondo le modalità descritte per i PBMC. Mostrando in generale uno stato di vitalità superiore rispetto alle cellule T primarie, i CTL CD4⁺ hanno consentito periodi di incubazione di 72 ore in presenza del sovrinatante virale. In caso di positività per la presenza del transgene a 72 ore dalla trasduzione, i CTL CD4⁺ sono stati ristimolati con LCL autologhe e mantenuti in coltura secondo le condizioni ottimizzate per i CTL CD4⁺ non trasdotti.

Metodica spinoculation: protocollo di trasduzione che prevede: i) centrifugazione della piastra di semina per 5 minuti a 350 g; ii) sostituzione del sovrinatante di coltura con 1 ml di preparazione virale in presenza di 8 µg/ml di Solfato di Protamina (Sigma) e 100 U.I./ml IL-2; iii) seconda centrifugazione di 45 minuti a 550 g, seguita da un'incubazione *over night* (o.n) a 37 °C e 5% CO₂; iv) ripristino del terreno completo di coltura addizionato con IL-2.

Le colture cellulari T caratterizzate fenotipicamente e funzionalmente ed impiegate per studi di trasferimento adottivo sono state generate secondo il seguente protocollo di trasduzione: 10^6 PBMC attivati per 48 ore sono stati risospesi in 200 µl di sovrinatante virale concentrato 1:100 e incubati in tubi da 14 ml in polistirene (Falcon) per 1 ora a 37 °C e 5% CO₂. Le cellule sono state direttamente risospese in 1 ml di terreno fresco completo addizionato con IL-2 100 U.I./ml e nuovamente piastrate in p24. Dopo 72 ore, i PBMC sono stati raccolti, lavati (10 min a 250 g) e ristimolati.

11. STIMOLAZIONE ANTIGENICA DEI LINFOCITI T TRASDOTTI CON TCR

- **Stimolazione aspecifica**

La stimolazione aspecifica dei PBMC trasdotti con vettori codificanti il transgene EGFP o il TCR anti-Melan-A è stata condotta addizionando al terreno di coltura PHA alla concentrazione di 10 µg/ml, immediatamente al termine dell'ultimo ciclo di trasduzione.

- **Stimolazione specifica**

La stimolazione specifica è stata condotta co-incubando i PBMC con cellule T2 caricate con il peptide Melan-A, immediatamente al termine della trasduzione e da quel momento, una volta alla settimana per tutto il periodo di mantenimento in coltura. In particolare, le stimolazioni venivano condotte in piastre da 24 pozzetti in 2 ml di terreno di coltura completo e in presenza di 100 U.I./ml IL-2. Ogni pozzetto conteneva 1×10^6 PBMC trasdotti e 2×10^5 cellule *feeder* T2 irradiate a 60 Gy e caricate per 1 ora a 37 °C con il peptide Melan-A₂₆₋₃₅ modificato alla concentrazione di 5 µM.

12. ANALISI CITOFUORIMETRICHE

Le cellule trasdotte sono state analizzate in citofluorimetria per l'espressione dei transgeni a partire da 72 ore dal termine dell'ultimo ciclo di trasduzione, per consentire il raggiungimento dell'espressione del transgene stesso a livelli di equilibrio ed escludere la pseudotrasduzione, ossia la rilevazione di fluorescenza dovuta a proteine transgeniche sintetizzate nelle cellule di *packaging* e incorporate nelle particelle vettore o da plasmidi non integrati. L'intensità di fluorescenza è stata valutata con lo strumento FACSCalibur (Becton Dickinson) e analizzata mediante il software CellQuest (BD Biosciences). Durante i vari passaggi le cellule, i reagenti e la centrifuga sono stati mantenuti alla temperatura costante di 4 °C.

- **Valutazione dell'espressione di EGFP**

L'espressione di EGFP da parte delle cellule trasdotte con il vettore di controllo

pCMV-EGFP è stata determinata mediante analisi citofluorimetrica direttamente su campioni cellulari centrifugati (10 minuti a 250 g) e risospesi in tampone fissante (Phosphate Buffered Saline, PBS 1X (Oxoid) contenente 0,2% glucosio, 0,03% NaN₃

- **Valutazione dell'espressione di superficie del TCR transgenico**

L'espressione di superficie del TCR $\alpha 2.2/\beta 14$ è stata valutata mediante marcatura con tetramero specifico ed eseguita incubando, al buio per 15 minuti a RT, $2-5 \times 10^5$ cellule con il tetramero Melan-A/A2 coniugato con ficoeritrina (PE) alla concentrazione di $0,4 \mu\text{M}$ in $50 \mu\text{L}$ di tampone per citofluorimetria (Phosphate Buffered Saline, PBS (Oxoid) contenente 2% albumina di siero bovino, BSA (Sigma) e 0,02% di sodio azide, NaN_3 (Sigma)), in grado di rallentare il metabolismo cellulare e inibire la fagocitosi. Successivamente e direttamente nel tampone della prima marcatura, sono stati aggiunti mAb diretti contro diverse molecole di superficie. Le cellule Jurkat sono state marcate con $3 \mu\text{l}$ di Ab anti-CD3 coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC; clone SK-7, Becton Dickinson). La doppia marcatura dei PBMC è stata eseguita con tetramero e $3 \mu\text{l}$ di mAb anti-CD8 FITC (clone G42-8, BD Pharmingen) o tetramero e $3 \mu\text{l}$ di mAb anti-CD4 FITC (clone SK-3, BD). Dopo 25 minuti d'incubazione al buio e in ghiaccio, i campioni sono stati lavati con PBS, risospesi in tampone fissante e tenuti a $+4^\circ\text{C}$ fino al momento della lettura citofluorimetrica. Campioni di cellule non trasdotte e marcate con tetramero specifico sono stati assunti come controlli negativi negli esperimenti di trasduzione. Inoltre sono stati utilizzati controlli isotipici dei reagenti di marcatura al fine di stabilire con precisione i parametri di lettura al citofluorimetro: oltre ad anticorpi anti-IgG murine (BD) si è impiegato il tetramero scorrelato BMLF1/A2 coniugato con PE, specifico per un Ag di EBV.

I mAb utilizzati per evidenziare catene transgeniche negli esperimenti di marcatura delle linee Jurkat e Molt alla sezione "Competizione di catene" sono stati i seguenti: anti-V β 14 FITC (clone CAS.1.1.3; Biodesign); anti-TCR α 19 non coniugato e coniugato con FITC (Pierce Biotechnology); anti-TCR V β 9, V β 12, V β 14 e V β 92 (Coulter-Immunotech).

- **Espressione di molecole di superficie**

Altre analisi citofluorimetriche sono state condotte marcando le cellule con mAb diretti contro molecole di superficie. Gli Ab utilizzati secondo le modalità indicate dai produttori sono stati: anti-CD62L FITC (Immunotools); anti-CD25 FITC (Becton Dickinson); anti-IL-7R α PE (CD127, Becton Dickinson), anti-CD27 PE e anti-CD28 PE (Immunotech); anti-TCR FITC (TCR $\alpha\beta$, clone WT31; Becton Dickinson) e i corrispondenti controlli isotipici acquistati presso le stesse ditte.

- **Analisi intracitoplasmatica dell'IFN γ**

La produzione di IFN γ da parte dei CTL è stata valutata tramite marcatura intracitoplasmatica con l'utilizzo del kit Cytofix/Cytoperm Plus with Golgi Stop (BD-Pharmingen), del mAb anti-IFN γ umano coniugato con FITC (Immunotech Coulter, 20 μ l/10⁶ cellule) e del controllo isotipico anti-IgG1 murina coniugato con FITC (Becton Dickinson). La produzione di questa citochina da parte dei CTL è stata analizzata in condizioni basali (CTL non stimolati), in presenza di cellule T2 caricate con il peptide modificato Melan-A₂₆₋₃₅ (stimolo antigenico), di cellule T2 non caricate e di uno stimolo massimale, costituito da PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato, 40 ng/ml; Sigma-Aldrich) e Ionomicina (4 μ g/ml; Sigma-Aldrich). Prima della stimolazione, alcuni campioni di CTL trasdotti sono stati marcati con tetramero specifico o controllo scorrelato secondo le condizioni classiche di marcatura già descritte per il tetramero. La stimolazione dei CTL comporta infatti l'internalizzazione del TCR e ne impedisce la rilevazione dopo marcatura di superficie. I CTL sono stati quindi seminati in piastre da 24 pozzetti a 1x10⁶ cellule/pozzetto in rapporto 1:1 con eventuali cellule bersaglio e incubati per 15 ore a 37 °C e 5% di CO₂, in terreno completo contenente monensina (Golgi Stop), un inibitore del trasporto intracellulare che blocca il rilascio di citochine da parte della cellula (1,3 μ l/2 ml/pozzetto). Al termine dell'incubazione, dopo un lavaggio, i CTL sono stati risospesi in PBS 1X-EDTA 1 mM: l'EDTA (acido etilendiamminotetracetico, Sigma-Aldrich) è un chelante del calcio che facilita la separazione di eventuali aggregati cellulari. Dopo un'incubazione di 15 ore a 37 °C ed un ulteriore lavaggio, i campioni sono stati risospesi in PBS al 10% di FBS per 10 minuti a RT, allo scopo di saturare i siti di legame aspecifico. Si è quindi proceduto alla permeabilizzazione delle cellule e alla marcatura con mAb anti-IFN γ : in particolare, i campioni sono stati lavati con PBS freddo, ed incubati per 20 minuti in 250 μ l di Cytofix/Cytoperm in ghiaccio e al buio al fine di fissare le cellule e renderle permeabili agli anticorpi specifici contro IFN γ . Successivamente, sono stati lavati per due volte, sempre a freddo, con 1 ml di Perm/Wash ed infine risospesi in 50 μ l di Perm/Wash contenente gli anticorpi anti-IFN γ , o i rispettivi controlli isotipici per 15 minuti a RT. Completata l'incubazione si è proceduto con un nuovo lavaggio e con la risospensione in 250 μ l di PBS freddo per la lettura al citofluorimetro.

- **Analisi intracitoplasmatica della proteina Melan-A**

Per valutare l'espressione della proteina intracellulare Melan-A nelle cellule di melanoma si sono condotte marcature intracitoplasmatiche utilizzando il kit Cytofix/Cytoperm Plus with Golgi Stop (BD-Pharmingen). Le linee melanocitarie (5×10^5 cellule) sono state lavate con PBS 1X, risospese in 1 ml di PBS 1X addizionato con 10% FBS e incubate per 10 minuti a RT. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati lavati con PBS freddo ed incubati per 20 minuti in 250 μ l di Cytofix/Cytoperm in ghiaccio e al buio. Successivamente le cellule sono state lavate per due volte, sempre a freddo, con 1 ml di Perm/Wash ed infine marcate in ghiaccio per 1 ora con 50 μ l di Perm/Wash contenente l'Ab primario anti-Melan-A diluito 1:100 (clone A103, Dako). Le cellule sono state quindi nuovamente lavate in Perm/Wash e incubate per 30 minuti a 4 °C con 2 μ l di Ab policlonale secondario anti-IgG mouse FITC (Dako). Infine, i campioni sono stati lavati con PBS 1X e risospesi in tampone da citofluorimetria per l'analisi.

13. SAGGIO DI RILASCIO DI ^{51}Cr

L'attività litica dei differenti effettori analizzati (clone CTL SELA-A 64 o cellule T trasdotte) è stata valutata mediante saggio di citotossicità a breve termine, utilizzando come bersagli cellulari differenti linee tumorali. Le cellule bersaglio sono state marcate per 1 ora a 37 °C, in fondello secco, con 100 μ Ci di $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (DuPont, Boston, MA, USA) e, dove specificato (T2 caricate con il peptide), coincubate con il peptide sintetico Melan-A A27L (1 μ l di una soluzione 5 μ M). Dopo opportuni lavaggi, le cellule sono state risospese in terreno al 3% di FBS alla concentrazione di 2×10^4 /ml. 100 μ l di ciascuna sospensione cellulare, corrispondenti a 2000 cellule bersaglio, sono stati seminati in triplicato in una micropiastra da 96 pozzetti fondo ad U (Bibby Sterlin Ltd, Stone, UK) in presenza di diluizioni scalari di cellule effettrici, partendo dal rapporto effettore/bersaglio indicato. Le micropiastre sono state quindi centrifugate per 5 minuti a 200 g e incubate a 37 °C per 4 h al 5% di CO_2 e 95% di umidità. Da ogni pozzetto sono stati quindi prelevati 100 μ l di surnatante e trasferiti in appositi tubini nei quali è stata contata la radioattività espressa in cpm (colpi per minuto) utilizzando un contatore per radiazioni γ (Cobra Gamma Counting System, Packard Instrument Company, USA). La percentuale di lisi specifica è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ citotossicità} = \frac{100 \times (R_{\text{sper.}} - R_{\text{spon.}})}{(R_{\text{max.}} - R_{\text{spon.}})}$$

nella quale:

R_{spon} = rilascio spontaneo, quantità di isotopo rilasciato dalle cellule bersaglio incubate in assenza di effettori.

R_{max} = rilascio massimo ottenuto dopo trattamento delle cellule bersaglio con 100 µl di una soluzione di Triton X-100 (Fluka, Sigma) al 5 % in PBS.

R_{sper} = rilascio sperimentale di ciascuna combinazione tra effettore e bersaglio.

13.1 Curva di Avidità

Le curve di avidità per il peptide modificato Melan-A26-35 del clone SELA-A 64 e della popolazione trasdotta sono state ottenute mediante un saggio di citotossicità alle 4 ore con rapporto effettore/bersaglio costante (1:1). Cellule bersaglio T2 sono state incubate per 1 ora a 37°C in micropiastra con diluizioni scalari 1:5 di peptide a partire da 1 µM. Al termine del caricamento delle cellule T2 con l'Ag sono stati aggiunti gli effettori.

13.2 Citotossicità con blocco della molecola CD8

La dipendenza funzionale del complesso TCR dalla molecola costimolatoria CD8 è stata valutata utilizzando un mAb anti-CD8 (clone UCHT-4, Sigma) in un saggio di citotossicità con rapporto effettore/bersaglio variabile. Le cellule effettrici sono state preincubate per 30 incubate a 37 °C in presenza del mAb anti-CD8 (clone UCHT-4, Sigma) alla concentrazione saturante di 10 µg/ml, prima di essere poste in contatto con le cellule bersaglio nel saggio di citotossicità.

14. TOPI

Per gli esperimenti *in vivo* sono stati utilizzati topi scid/scid (*Severe Combined Immunodeficiency*) di 6-8 settimane, acquistati da Charles River Laboratories (Calco, Como, Italia) o nati nello stabulario del Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Sezione di Oncologia dell'Università di Padova (Padova, Italia). Si tratta di topi omozigoti per una mutazione autosomica recessiva del gene scid, mappato nei pressi del centromero del cromosoma 16. La mutazione impedisce il corretto riarrangiamento dei geni per il TCR (*T cell receptor*) nei linfociti T e delle Ig nei linfociti B che si traduce in linfopenia, agammaglobulinemia ed estrema suscettibilità

alle infezioni batteriche, virali e da altri microorganismi. L'immunodeficienza rende questi topi tolleranti all'impianto di tessuti estranei, in quanto non sono in grado di generare una risposta efficace verso il *non-self*. La mutazione non coinvolge lo sviluppo degli altri componenti cellulari del sangue quali NK, macrofagi e granulociti. I topi sono stati mantenuti in gabbie di plastica, a temperatura costante e dieta bilanciata, nello stabulario SPF (Specific Pathogen Free) del Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Sezione di Oncologia dell'Università di Padova. Gli esperimenti a cui sono stati sottoposti gli animali si sono attenuti alle direttive nazionali ed internazionali per la salvaguardia degli animali da sperimentazione (D.L. 116/92 e successive circolari attuative).

15. WINN ASSAY

Il test di "Winn Assay", è stato condotto inoculando sottocute (s.c.) una sospensione di cellule tumorali (1×10^6 /animale) sole o mescolate con cellule T di una coltura BD trsdotta (5×10^6 /animale). Le cellule sono state mescolate dopo un'incubazione di 5 minuti in ghiaccio, immediatamente prima dell'inoculo, per bloccare l'interazione T cellulare con il bersaglio prima dell'inoculo. I topi sono stati osservati con scadenza giornaliera, e lo sviluppo del tumore determinato mediante misurazioni con calibro dei diametri perpendicolari della massa tumorale. Gli animali venivano sacrificati quando le dimensioni del tumore raggiungevano un massimo di 300 mm³ o in presenza di ulcerazioni, secondo le indicazioni del veterinario.

16. TRASFERIMENTO ADOTTIVO DEI LINFOCITI T TRASDOTTI

L'efficacia terapeutica delle cellule ingegnerizzate per l'espressione del TCR anti-Melan-A è stata valutata *in vivo* nel contesto del modello tumorale di melanoma SK-23 MEL. Il modello murino di melanoma è stato ottenuto nel modo seguente: al giorno zero le cellule tumorali sono state lavate più volte, risospese in RPMI 1640 alla concentrazione di 10×10^6 cellule/ml e inoculate nei topi s.c. in un volume di 100 µl, corrispondenti a 1×10^6 cellule. I trasferimenti adottivi di cellule T sono stati effettuati nei giorni indicati per ogni singolo esperimento, inoculando gli animali s.c. con 10×10^6 linfociti T trsdotti risospesi in 200 µl o, in alternativa, mediante inoculi per via endovenosa (e.v.) di 10×10^6 cellule T risospese in 200 µl di RPMI 1640.

La crescita della massa tumorale è stata monitorata mediante misurazioni periodiche con calibro. Il volume del tumore (TV) è stato calcolato applicando la formula:

$$TV \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{d^2 \times D}{2}$$

dove:

d = diagonale minore della massa tumorale;

D = diagonale maggiore della massa tumorale.

Si è inoltre valutata la sopravvivenza nel tempo dei topi inoculati rispetto ai topi di controllo non trattati. Le curve di sopravvivenza ottenute sono state analizzate mediante test Kaplan-Meier e i *p-values* calcolati con l'ausilio del programma statistico MedCalc (versione 8.1, Mariakerke, Belgium). Durante questi esperimenti gli animali sono stati seguiti giornalmente ricorrendo ad eutanasia qualora mostrassero segni di malattia o tossicità dovuta al trattamento. Tutti gli esperimenti di crescita tumorale *in vivo* sono stati condotti in accordo alle linee guida del UK Coordinating Committee Cancer Research (UKCCCR) (*Cancer Metastasis 1989, "UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia"*).

17. IMAGING OTTICO

L'*imaging* ottico consiste nell'uso di sonde ottiche per l'analisi di informazioni funzionali su molecole, proteine e cellule *in vivo*. Tale tecnica misura l'interazione della luce con i tessuti e in particolare il comportamento dei fotoni (assorbimento e *scattering*). L'intervallo di lunghezze d'onda per le sonde ottiche è generalmente compreso tra 400 e 950 nm. Per gli studi *in vivo* è preferibile lavorare nella regione *near infrared* NRI (650-900nm) dove sono minori le proprietà di assorbimento dei tessuti e la luce può penetrare per vari centimetri. Si considerano due tipi di reporter ottici, bioluminescenti e fluorescenti. Le sonde bioluminescenti sono generalmente basate su luciferasi e non richiedono luce di eccitazione. Le sonde fluorescenti richiedono invece una luce di eccitazione per eccitare il fluoroforo ad un livello energetico superiore, seguito da emissione di luce a più lunga lunghezza d'onda. Le sonde fluorescenti comprendono proteine codificate geneticamente come GFP, DFsRed e altre varianti con emissione limitata alla parte visibile dello spettro (400-650 nm) e numerosi coloranti fluorescenti sviluppati per citofluorimetria e microscopia

confocale (fluoresceina, Alexa Fluor, ecc) con lunghezza d'onda di emissione tra 500 e 850 nm. Una nuova serie di composti, i Quantum Dots (qdots o QD) ha permesso di rivoluzionare l'ambito della fluorescenza sia a livello cellulare che in vivo.

I Quantum Dots (QDots) sono nanocristalli semiconduttori colloidali, di pochi nanometri di diametro, con proprietà ottiche uniche, utilizzabili come fluorofori *in vitro* e *in vivo*; quelli impiegati in ambito biologico sono principalmente costituiti da un corpo centrale di CdSe e da un rivestimento di ZnS che li protegge dall'ossidazione. Rispetto ai coloranti organici e alle proteine fluorescenti, i QD presentano importanti vantaggi come elevati coefficienti di estinzione molare (da 10 a 100 volte più elevati di quelli dei coloranti organici), l'emissione dal visibile all'infrarosso, un ampio coefficiente di assorbimento in un largo intervallo spettrale, un elevatissimo livello di brillantezza, un'elevata fotostabilità e resistenza alla degradazione chimica. Grazie al loro ampio profilo di eccitazione e allo stretto spettro di emissione, i QD possono essere facilmente combinati a differenti substrati biologici permettendo l'analisi simultanea e precisa di molteplici bersagli molecolari contemporaneamente (Fig. 12). I QDots possono essere funzionalizzati con ligandi idrofilici per essere resi idrosolubili o possono essere coniugati a biomolecole, soprattutto proteine (come streptavidina e anticorpi) e acidi nucleici. Le principali applicazioni dei QDots in biologia sono rappresentate da: i) marcature cellulari (di cellule vive o fissate), che permettono di evidenziare cellule intere, organelli cellulari, proteine e recettori di superficie o bersagli citoplasmatici (microtubuli, actina) e nucleari; in tal caso, i QDots possono entrare nelle cellule mediante microiniezione, elettroporazione o fagocitosi; ii) *imaging in vivo*, grazie alla capacità dei QDots di rimanere fluorescenti nei tessuti per lungo tempo (fino a 4 mesi); iii) visualizzazione di proteine e DNA.

I *Qtracker Cell labelling kit* rappresentano uno strumento ideale per studi di *tracking* cellulare: un peptide per il *targeting* selettivo, non covalentemente legato al nanocristallo, ne consente l'internalizzazione nel citoplasma; una volta internalizzati, i QDot si distribuiscono in vescicole, vengono trasmessi alle cellule figlie fino a sei generazioni successive e presentano elevata fluorescenza che può essere osservata per tempi lunghi, senza limitazioni dovute a *photobleaching* o degradazione. Tale fluorescenza si mantiene costante anche in condizioni biologiche che differiscono per pH, temperatura e attività metabolica; vari esperimenti inoltre hanno dimostrato che la marcatura con Qtracker non influenza la proliferazione cellulare o l'attività enzimatica. I Qtracker sono pertanto ideali per studi a lungo termine di vitalità, funzionalità e migrazione cellulare^{158,214}.

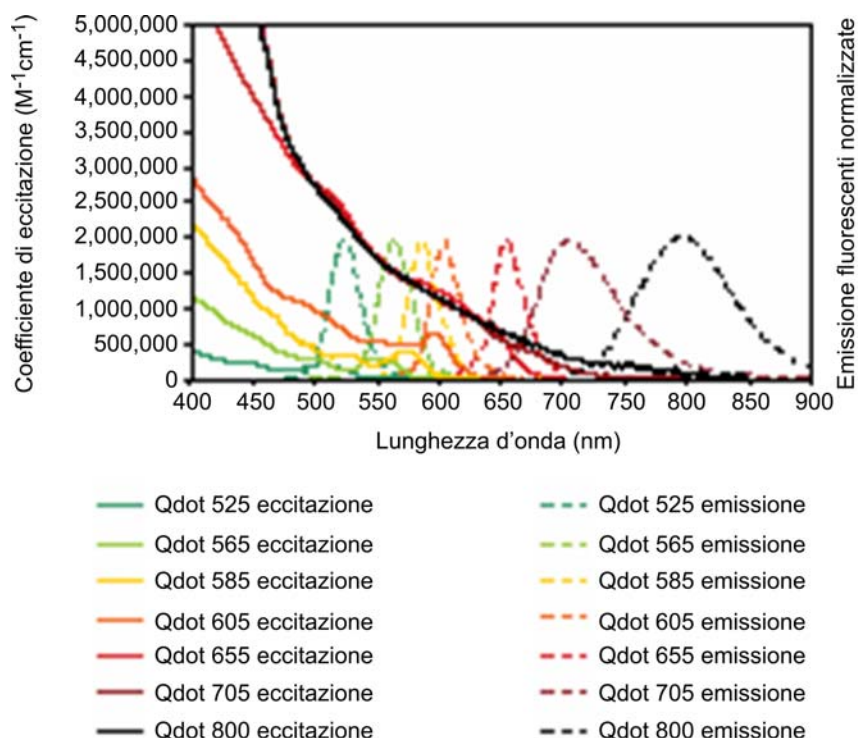


Figura 12. Spettri di eccitazione ed emissione dei QD.

- ***eXplore Optix***

eXplore Optix (GE Healthcare) è un sistema per *imaging* ottico preclinico finalizzato a caratterizzare, quantificare e visualizzare eventi cellulari e molecolari *in vivo* utilizzando sonde fluorescenti. In particolare, tale apparato di imaging permette l'analisi di farmaci e approcci anti-tumorali direttamente in modelli preclinici di neoplasia. Il sistema è anche in grado di funzionare in bioluminescenza ed è particolarmente adatto per l'imaging quantitativo "whole body" di piccoli roditori. Lo strumento *eXplore Optix* si basa sulla tecnologia Time Domain (TD), capace di differenziare i fotoni in base al tempo impiegato ad emergere dal tessuto in cui avvengono i fenomeni di *scattering* e di delineare le curve TPSF (*Temporal Point Spread Function*) che indicano la distribuzione, nel tempo, del numero di fotoni provenienti da ogni singolo punto del campione (Fig. 13). Le caratteristiche del segnale che questa tecnologia consente di descrivere sono: i) la profondità del segnale, ricavata dall'informazione temporale della curva TPSF; ii) la stima della concentrazione relativa dei fluorofori ad una determinata profondità; iii) la lifetime dei fluorofori, cioè il tempo necessario per ritornare allo stato basale dopo l'eccitazione, un parametro specifico per ogni singolo fluoroforo, indipendente dallo spettro di eccitazione-emissione, ma influenzato da

temperatura, pH e livelli di ossigeno presenti. Quest'ultima informazione consente di distinguere diversi fluorofori contemporaneamente presenti nel campione o di individuare differenze nel microambiente (GE Healthcare, ART, Explore Optix Optiview User's Manual).

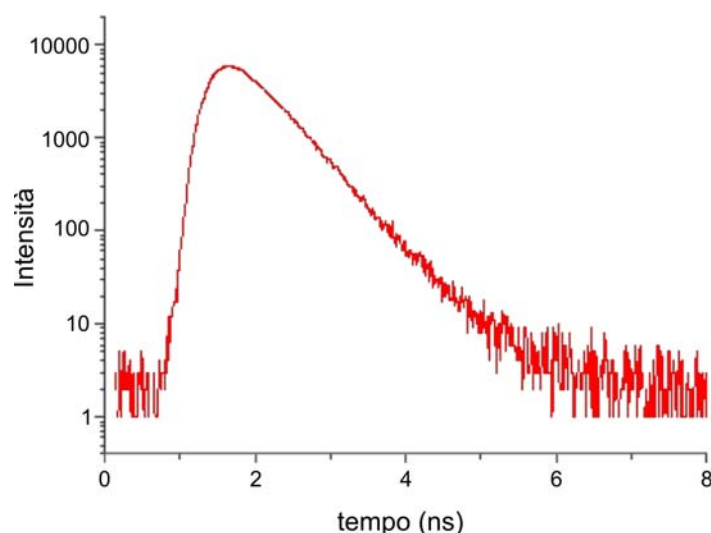


Figura 13. Esempio di curva TPSF

- **Marcatura di CTL con Qtracker 705**

Per monitorare la localizzazione e la persistenza dei linfociti *in vivo*, 12×10^6 CTL sono stati marcati con Qtracker 705 utilizzando il Qtracker[®] 705 Cell Labelling Kit (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), secondo le indicazioni del produttore; in breve, 0,8 ml di soluzione di marcatura (10 nM labelling solution in 200 μ l di terreno RPMI 10% FBS, addizionato con Hepes, L-Glutamina, Penicillina-Streptomycin) sono stati addizionati a 4×10^6 CTL precedentemente pellettizzati in eppendorf da 1,5 ml. Dopo un'incubazione di 60 minuti a 37°C, 5% CO₂, si sono eseguiti due lavaggi in terreno completo, al termine dei quali i linfociti sono stati risospesi nel tampone di inoculo o in quello per citofluorimetria. L'analisi citofluorimetrica, eseguita eccitando il fluoroforo a 488 nm e utilizzando il filtro LP 670 nm, ha fornito il controllo positivo di avvenuta marcatura. Le analisi di fluorescenza eseguite con lo strumento per *imaging* ottico eXplore Optix (GE, Healthcare) sono state condotte utilizzando il laser 470 nm e il filtro LP 693 nm. Prima di procedere con l'inoculo *in vivo*, il segnale di fluorescenza delle cellule marcate è stato misurato in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto di colore nero, seminando $1,5 \times 10^6$ cellule per pozzetto. Successivamente, 10×10^6 CTL sono stati inoculati s.c. nel dorso di un topo Scid in un volume finale di 100 μ l PBS 1X; le analisi di fluorescenza *in vivo* sono state effettuate a tempi successivi (prima dell'inoculo e a 10 minuti,

24 e 48 ore, 4 e 7 giorni dall'inoculo) utilizzando gli stessi parametri di acquisizione precedentemente descritti.

18. ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA

Al momento del sacrificio, le masse tumorali di alcuni topi appartenenti all'esperimento di trasferimento adottivo eseguito mediante inoculi e.v. sono state resecate, fissate con formalina al 4% (Sigma) e incluse in blocchetti di paraffina. I campioni sono stati processati per ottenere sezioni di 4 μ m, successivamente reidratate e processate per immunoistochimica con procedure standard. Si sono eseguiti nell'ordine lo smascheramento termindotto dell'epitopo per 30 minuti in una soluzione 10 mM Tris (triidrossimetilamminoetano), 1 mM EDTA (acido etilendiamminotetracetico), 0,05% Tween 20 a pH 9; la saturazione in siero preimmune di cavallo; l'incubazione per 1 ora a RT con un mAb primario anti-Melan-A (clone A103, DakoCytomation), diluito 1:50; dopo lavaggio, le sezioni sono state incubate per 30 minuti a RT con un anticorpo secondario anti-Ig di topo biotinilato e coniugato con perossidasi (HRP) (Vector). La rivelazione è stata eseguita con il cromogeno AEC (BioGenex) per 10 minuti a RT. Le sezioni sono state infine controcolorate con Ematossilina di Mayer e montate in soluzione acquosa di Glucosio 50%.

19. COMPETIZIONE TRA CATENE

19.1 Vettori virali

I vettori virali codificanti catene ibride TCR $\alpha\beta$: ζ specifici per MAGE-1, gp100 e EBNA4, utilizzati per lo studio della competizione tra catene, sono stati costruiti dal gruppo di Immunologia dei Tumori del Dipartimento di Oncologia Medica presso l'Erasmus Medical Center-Daniel den Hoed di Rotterdam (Olanda). In breve, le sequenze codificanti le catene sono state ottenute collegando i domini extracellulari delle catene TCR α e β fisiologiche alla molecola CD3 ζ umana completa (V α C α ζ e V β C β ζ)^{206,116}. Le sequenze cDNA così ottenute sono state successivamente clonate in vettori retrovirali pBullet e usati per trasdurre cellule T Jurkat *wild-type* o cellule Jurkat precedentemente trasdotte con Melan-A TCR. Retrovirus MoMLV pseudotipizzati con VSV-G contenenti TCR RNA sono stati prodotti co-coltivando le cellule di *packaging* Phoenix-A a seguire la precipitazione con calcio e fosfato. Per la trasduzione di cellule T umane, piastre di coltura da 24

pozzetti sono stati rivestiti con Retronectina e pre-trattate con particelle retro virali positive per TCR. Successivamente, 1×10^6 cellule T per pozzetto sono state centrifugate in sovranatante contenente virus fresco e coltivate per 4-5 ore a 37 °C e 5% CO₂. Le cellule sono state sottoposte ad un ulteriore ciclo di trasduzione il giorno seguente, dopo il quale sono state raccolte e trasferite in fiasche da 25 mm².

19.2 FRET

Flow Cytometry based Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) è stata realizzata marcando le cellule con i) mAb anti-TCRV α 19 seguito da anti-mouse IgG Fab coniugato con Cy-5 (accettore) e mAb anti-TCRV β 9 coniugato a Cy3 (donatore); ii) mAb anti-TCRV α 19 seguito da anti-mouse IgG Fab coniugato con Cy-5 (accettore) e mAb anti-TCRV β 14 coniugato a Cy3 (donatore)²¹⁵. Le intensità di fluorescenza sono state misurate con un citofluorimetro a doppio laser FACSCalibur (Beckton Dickinson) leggendo le emissioni a 570 nm (canale del donatore, eccitazione a 488 nm), 670 nm (canale accettore, eccitazione a 635 nm) e oltre 670 (canale FRET, eccitazione a 488 nm). I dati sono stati analizzati mediante software FLEX su base cellulare²¹⁶.

RISULTATI

1. SVILUPPO DI LV PER IL TRASFERIMENTO DI UN TCR DIRETTO CONTRO L'AG MELANOCITARIO MELAN-A₂₆₋₃₅.

1.1 Caratterizzazione fenotipica e funzionale del clone SELA-A 64 donatore del TCR Il clone CTL SELA-A 64 è un clone T CD8⁺ che riconosce l'epitopo 26-35 del peptide Melan-A/MART-1 nel contesto della molecola MHC di I classe HLA-A2. Tale clone fu originariamente generato mediante clonaggio di PBMC isolati dal sangue periferico di un paziente affetto da melanoma metastatico mediante marcatura con tetramero Melan-A e successiva separazione in citofluorimetria a flusso¹⁰⁸. Dei 53 cloni ottenuti e caratterizzati fenotipicamente e funzionalmente mediante saggio di citotossicità a breve termine, il clone 64 era emerso, in particolare, per superiore attività litica. Allo scopo di confermare la scelta di un clone CTL con elevate capacità di riconoscimento ed attività citotossica, abbiamo ricondotto le analisi dello *screening* iniziale. La doppia marcatura e il saggio di rilascio di ⁵¹Cr dimostrano rispettivamente la positività del clone SELA-A 64 sia per il CD8 che per il tetramero Melan-A, e la lisi specifica di cellule della linea T2 caricate con il peptide antigenico Melan-A₂₆₋₃₅ modificato (Fig. 14a). Il clone esercita inoltre una rilevante attività citotossica contro la linea tumorale SK-23-MEL, positiva sia per l'Ag Melan-A che per l'allele HLA-A2, dimostrando un buon riconoscimento dell'Ag tumorale processato naturalmente nel contesto della cellula neoplastica (Fig. 14b)

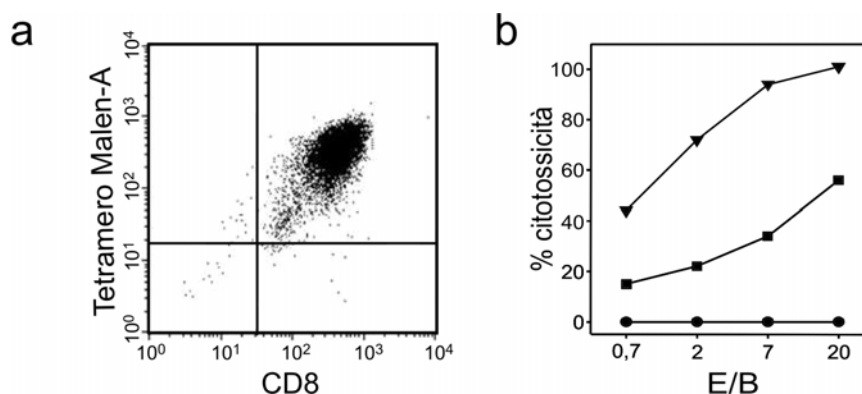


Figura 14. Caratterizzazione fenotipica e funzionale del clone SELA-A 64. (a) Analisi ciofluorimetrica del clone marcato con mAb anti-CD8 e tetramero Melan-A/A2. Gli eventi doppi positivi (quadrante in alto a destra) rappresentano il 99% della popolazione marcata. (b) La valutazione dell'attività litica è stata

effettuata su cellule bersaglio T2 (●), T2 incubate con il peptide Melan-A₂₆₋₃₅ (▼) e sulla linea di melanoma SK-23 MEL (■), al rapporto effetttore/bersaglio indicato.

1.2 Generazione e caratterizzazione di LV-TCR

I geni TCR α 2.2 e TCR β 14 (nomenclatura Wei *et al.*²¹²), codificanti le catene TCR del clone SELA-A 64, sono stati identificati mediante RT-PCR utilizzando un pannello di *primer* specifici per sottofamiglie della porzione variabile delle due catene α e β . Sulla base delle sequenze di DNA, sono stati disegnati nuovi *primer* per permettere il clonaggio delle sequenze complete codificanti le catene TCR del clone CTL stesso. Successivamente, le sequenze di cDNA codificanti l'una o l'altra catena completa sono state inserite in due distinti vettori pCMV-EGFP, in sostituzione del transgene EGFP. I costrutti ottenuti (pCMV-TCR α e pCMV-TCR β) sono stati impiegati come vettori di trasferimento per la produzione delle corrispondenti particelle virali, pseudotipizzate con il VSV-G.

Allo scopo di verificare la funzionalità di tali vettori in termini di efficacia di trasferimento genico e di capacità di indurre l'espressione in membrana di un TCR funzionale, abbiamo trasdotto cellule della linea leucemica T umana Jurkat. Le cellule Jurkat da noi utilizzate sono facilmente trasducibili, esprimono bassi livelli di CD3 e TCR endogeni e modulano positivamente l'espressione in membrana della molecola CD3 in seguito al trasferimento di un TCR esogeno (dati non mostrati). L'analisi a 72 ore di cellule Jurkat cotrasdotte con surnatante virale a basso o elevato titolo dimostra che i vettori pCMV-TCR generati guidano un'efficiente espressione di superficie del TCR specifico per Melan-A (Fig. 15a). Da una delle popolazioni trasdotte è stato ottenuto, mediante diluizione limite, un clone Jurkat (J19) ad alta espressione del TCR transgenico (Fig. 15b). L'analisi citofluorimetrica condotta sulle cellule del clone J19 con tetramero Melan-A dimostra la stabilità di espressione nel tempo del TCR esogeno: infatti, a 4 mesi di coltura dalla trasduzione non si osservano significativi decrementi dell'espressione, imputabili a silenziamento genico o perdita del transgene (Fig. 15c). La funzionalità del TCR transgenico sulla membrana delle cellule trasdotte è stata dimostrata valutando la modulazione della concentrazione del calcio intracitoplasmatico, indotta dall'incubazione del clone J19 con anticorpi leganti molecole del complesso TCR (anti-CD3, anti-TCR, anti-V β 14) (Fig. 15d). Tale interazione, in caso di corretta trasduzione del segnale, comporta un aumento dei livelli intracellulari di calcio, dipendenti sia dalla mobilitazione da riserve intracitoplasmatiche, che da influsso tramite canali di membrana. I grafici relativi alle diverse prove condotte evidenziano chiaramente le risposte agli stimoli e quindi la funzionalità del

TCR. Questo risultato acquista maggiore valore se si considera che la linea Jurkat non esprime la molecola costimolatoria CD8, coinvolta nella stabilizzazione del complesso TCR/pMHC e nel processo di segnalazione intracellulare e necessaria per l'attivazione ottimale di cellule T trasdotte con TCR²²⁰

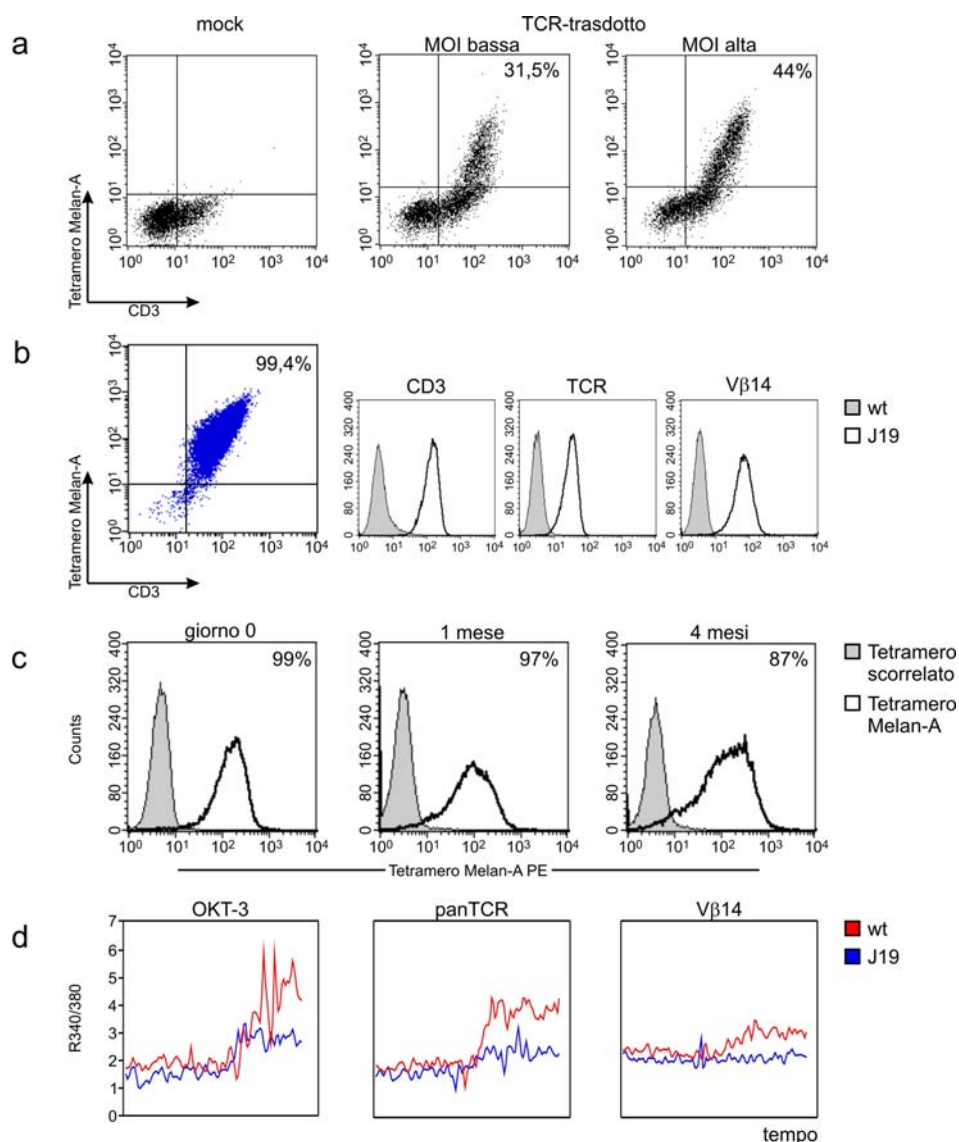


Figura 15. Analisi funzionale del TCR trasdotto. (a) Profili citofluorimetrici di cellule Jurkat co-trasdotte con produzioni virali standard (low MOI) e concentrate 1/40 (high MOI) dei vettori pCMV-TCR α e pCMV-TCR β . Le cellule sono state analizzate in doppia marcatura con CD3-FITC e tetramero Melan-A-PE. Il primo pannello da sinistra rappresenta la marcatura di cellule di controllo non trasdotte (mock); le percentuali di doppia positività sono indicate in alto a sinistra dei corrispondenti riquadri. (b) Caratterizzazione fenotipica rappresentativa di un clone Jurkat J19 ottenuto per diluizione limite di una delle popolazioni trasdotte rappresentate in (a). Gli istogrammi riportano il profilo citofluorimetrico dei marcatori CD3, TCR e V β 14. In ogni pannello l'espressione del clone J19 (profilo nero) è messa a confronto con il controllo wild type (grigio). (c) La stabilità di espressione nel tempo del TCR transgenico di membrana è dimostrata dalla positività alla marcatura con tetramero specifico in analisi condotte al giorno 0 dalla

caratterizzazione fenotipica del clone J19 e a 1 e 4 mesi. Tali citofluorimetrie sono rappresentative di differenti analisi condotte anche dopo congelamento e scongelamento del clone J19. **(d)** Segnalazione intracellulare Ca^{2+} -mediata, TCR-dipendente, indotta da anticorpi anti-CD3 (OKT-3), anti-TCR e anti-V β 14. Le variazioni dei livelli di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sono espresse come rapporto della luce emessa a 505nm dopo eccitazione a 340 e 380nm (R340/380).

2. VERIFICA DELLA TRADUCIBILITÀ DI PBMC E CTL CD4^+ ANTI-EBV UMANI E OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI DI INFEZIONE

Allo scopo di individuare un efficiente e riproducibile protocollo di trasduzione di cellule T in coltura, sono state condotte diverse prove di infezione su PBMC da sangue periferico di donatore sano e CTL CD4^+ anti-EBV, impiegando il vettore lentivirale pCMV-EGFP.

2.1 PBMC

I PBMC, attivati per 48 ore con IL-2 e fattori di stimolazione (PHA o OKT-3 e biglie magnetiche leganti mAb anti-CD3 e anti-CD28), sono suscettibili all'infezione di costrutti lentivirali con efficienza variabile in relazione al rapporto virioni infettanti/cellula (multiplicity of infection, MOI), ai cicli di trasduzione, al volume e ai tempi di incubazione. I pannelli della figura 16 riportano analisi citofluorimetriche rappresentative di prove di trasduzione condotte su PBMC attivati variando tali condizioni. Come si osserva, incrementando il numero di cicli di infezione, e/o il numero di unità trasducenti in relazione al numero di cellule, aumenta proporzionalmente il livello di espressione di EGFP (Fig. 16a, c). Inoltre, ridotti volumi e tempi prolungati di incubazione, a parità di preparazione virale, correlano positivamente con i livelli di espressione del transgene (Fig. 16b, d). In quest'ultimo caso tuttavia, le condizioni di coltura a cui le cellule sono sottoposte durante la trasduzione possono limitare la resa in termini di vitalità cellulare rendendo quindi difficoltosi cicli ripetuti di trasduzione. In generale, utilizzando preparazioni virali concentrate 1:40 e trasducendo ripetutamente i PBMC in coltura, è possibile raggiungere il 100% di positività per l'espressione del gene *reporter* a 72h dal termine dell'ultima infezione. Ristimolando le cellule trasdotte con PHA, la frazione positiva si riduce progressivamente, senza tuttavia scomparire, fino all'esaurimento delle cellule in coltura (Fig. 16d).

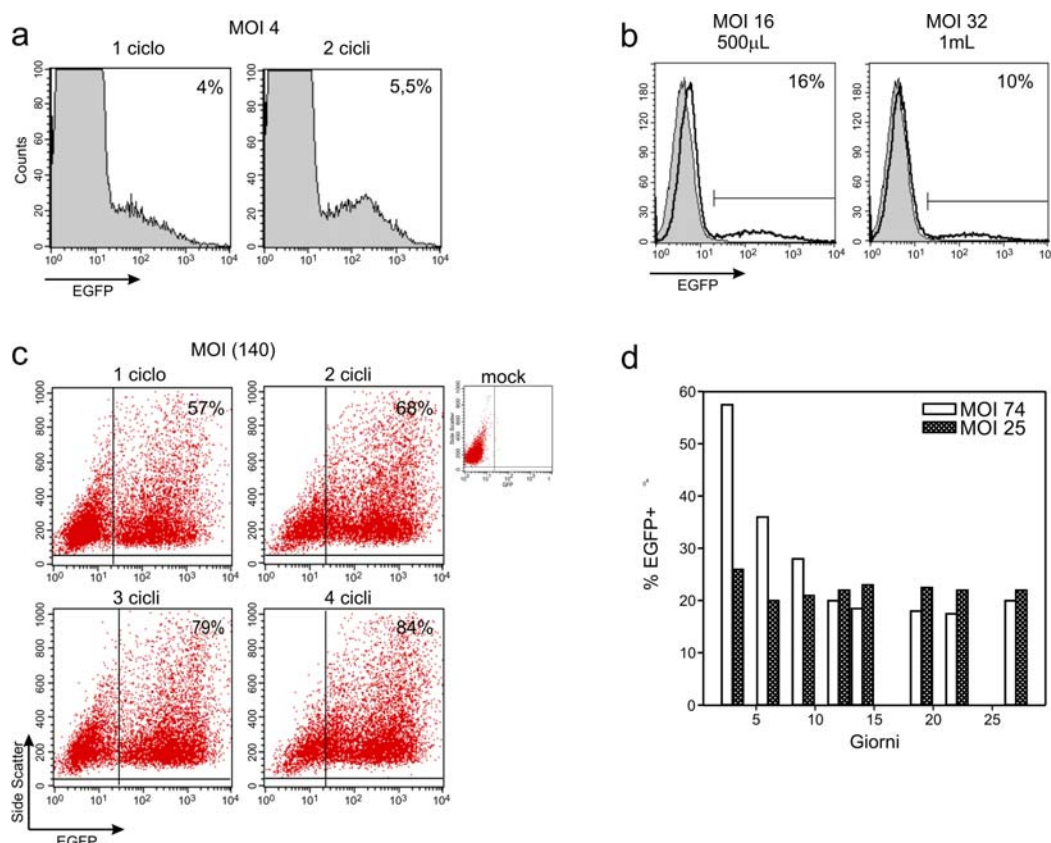


Figura 16. Analisi del trasferimento genico mediato da vettori lenti virali in PBMC umani. L'efficienza di trasferimento genico è stata valutata mediante trasduzione con il vettore pCMV-EGFP. In figura si riportano le analisi citofluorimetriche rappresentative di differenti prove condotte sui PBMC attivati per 48 ore. Per ciascun pannello è riportata la percentuale di cellule EGFP⁺ a 72 ore dal termine della trasduzione e sono descritte le differenti condizioni di infezione in termini di MOI, numero di cicli e volume di incubazione se diverso da 1 mL. **(a)** Trasduzione per 6 ore con vettore virale non concentrato (1 o 2 cicli rispettivamente). **(b)** Trasduzione per 72 ore di 1 milione di PBMC con 0,5 mL o 1 mL della medesima preparazione virale non concentrata. Le MOI risultanti sono rispettivamente 16 e 32. **(c)** Il surnatante virale è stato concentrato 1:40 e utilizzato per trasdurre i PBMC con 1, 2, 3 o 4 cicli di circa 6 ore ciascuno in successione. La percentuale di positività per ogni campione è indicata nei rispettivi pannelli. All'aumentare dei cicli, aumenta la positività. **(d)** L'istogramma rappresenta la cinetica di espressione di EGFP in PBMC incubati per 6 ore con 200 µL di vettore virale concentrato. Barre in diverso colore corrispondono a campioni trasdotti con MOI differenti. La riduzione dei livelli di espressione del transgene a partire da 72 ore è più marcata per cellule trasdotte a MOI 74. L'inserimento di un maggior numero di copie del vettore nel genoma delle cellule ospiti potrebbe fornire uno svantaggio selettivo e comportare la scomparsa di tali cellule dalla coltura.

2.2 CTL CD4⁺ anti-EBV

La suscettibilità all'infezione da parte di LV è risultata superiore per cellule CTL CD4⁺ anti-EBV mantenute in coltura mediante ristimolazione settimanale con LCL autologhe. La buona

vitalità cellulare ha consentito di fissare a 72 ore il periodo di incubazione con il virus, allo scopo di massimizzare le rese di trasduzione e il livello di espressione del transgene. In generale, è sufficiente un solo ciclo di trasduzione con vettore non concentrato per ottenere un'espressione media di EGFP di circa il 20% ($19 \pm 4\%$, $n=7$), mentre l'utilizzo di preparazioni virali concentrate risulta in una positività superiore al 70% ($69 \pm 19\%$, $n=4$) dopo un solo ciclo di trasduzione (figura 17). L'efficienza di trasferimento genico nei CTL CD4⁺ non aumenta significativamente utilizzando la metodica di *spinoculation* (cfr *materiali e metodi*), impiegata da altri gruppi di ricerca in esperimenti di trasduzione con LV. L'elevata espressione del transgene nei CTL CD4⁺ rispetto ai PBMC potrebbe dipendere dalle condizioni di coltura a lungo termine che garantiscono una buona vitalità e un'attivazione cellulare ideale al momento dell'infezione. Anche in questo caso, tuttavia, il mantenimento in coltura comporta la selezione progressiva della frazione cellulare non trasdotta.

In generale, i risultati ottenuti dimostrano che solamente l'utilizzo di preparazioni virali ad elevato titolo e/o trasduzioni ripetute in successione consentono di ottenere, in assenza di selezione, una frazione rilevante e facilmente identificabile di cellule esprimenti il transgene.

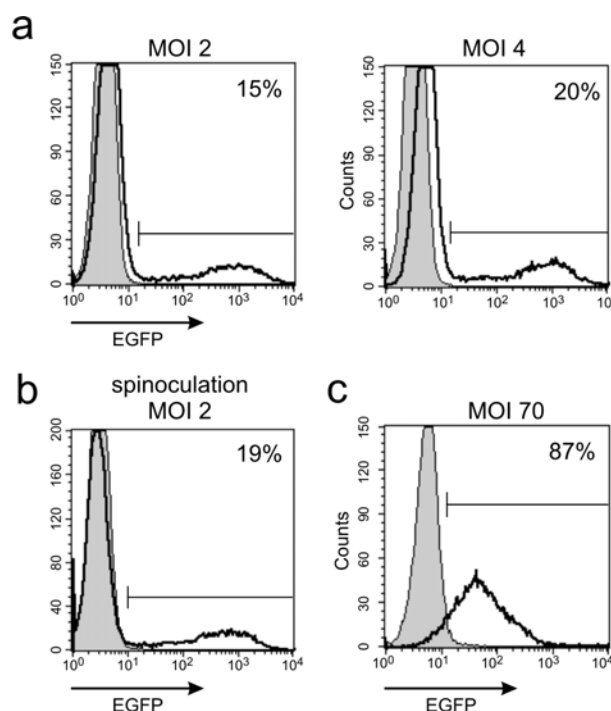


Figura 17. Analisi del trasferimento genico mediato da vettori lenti virali in CTL CD4⁺ anti-EBV umani. L'espressione di EGFP in cellule CTL CD4⁺, analizzate a 72 ore dalla trasduzione, varia in funzione delle preparazioni virali utilizzate (MOI bassa e MOI elevata), ma non in funzione del protocollo di infezione impiegato. **(a)** I primi due pannelli riportano i profili citofluorimetrici di cellule incubate per 72 ore in presenza di surnatante virale non concentrato: essendo il numero di cellule trasdotte di 1×10^6 per il pannello a sinistra e $0,5 \times 10^6$ per il pannello a destra, le MOI risultano rispettivamente di 2 e 4. **(b)** Cellule trasdotte secondo la metodica definita *spinoculation* e descritta in *materiali e metodi*. L'impiego di questa metodica, molto più laboriosa, non risulta in un significativo aumento della percentuale di positività per EGFP. **(c)**

L'impiego di un vettore concentrato garantisce elevati livelli di espressione (1×10^6 di CTL CD4⁺ trasdotti per 72 ore). Le analisi citofluorimetriche riportate sono rappresentative di una serie di prove condotte sui CTL CD4⁺.

3. TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR IN PBMC E CTL CD4⁺ ANTI-EBV

Nel corso di esperimenti successivi si è potuto verificare che condizioni identiche di trasduzione per vettori codificanti il TCR non garantiscono tuttavia risultati analoghi a quelli relativi al gene *reporter* EGFP. In questo caso infatti, l'espressione del TCR transgenico dipende dal simultaneo trasferimento di due differenti vettori genici, dall'espressione equimolare delle catene α e β codificate dagli stessi e dall'associazione proteica a costituire un complesso di membrana. Si è quindi ipotizzato che fosse necessario aumentare il numero di cicli di trasduzione o il titolo del vettore virale per ottenere valori di espressione del TCR comparabili a quelli del gene *reporter* dei precedenti esperimenti. Ciononostante, cotrasducendo i PBMC per 5 cicli consecutivi di 6 ore ciascuno con costrutti lentivirali esprimenti rispettivamente la catena α e la catena β del TCR anti-Melan-A, si sono osservati livelli di espressione del TCR specifico estremamente ridotti (circa 3% a 72 ore, Fig. 18a). L'utilizzo di preparazioni virali concentrate è risultato in valori medi di espressione del 1,5-2% su PBMC sottoposti a due cicli di trasduzione con i vettori codificanti ciascuna catena.

La cotrasduzione di CTL CD4⁺ anti-EBV ha dato risultati simili. In figura 18b è riportata la percentuale di positività per la catena β ottenuta cotrasducendo i CTL CD4⁺ con i vettori per le due catene e applicando per ogni ciclo di trasduzione il protocollo delle 72 ore descritto nel paragrafo precedente. La frazione inizialmente positiva si riduce all'1% a 13 giorni dalla prima valutazione citofluorimetrica, verisimilmente in seguito a selezione negativa in coltura di cellule stimulate con LCL autologhe e in assenza di stimolazione specifica con l'Ag Melan-A/MART-1.

In conclusione, la vitalità delle cellule sottoposte ad almeno due cicli successivi di trasduzione e la ridotta frazione cellulare in coltura esprime correttamente il TCR transgenico hanno impedito l'utilizzo delle popolazioni trasdotte in studi funzionali e di trasferimento *in vivo*.

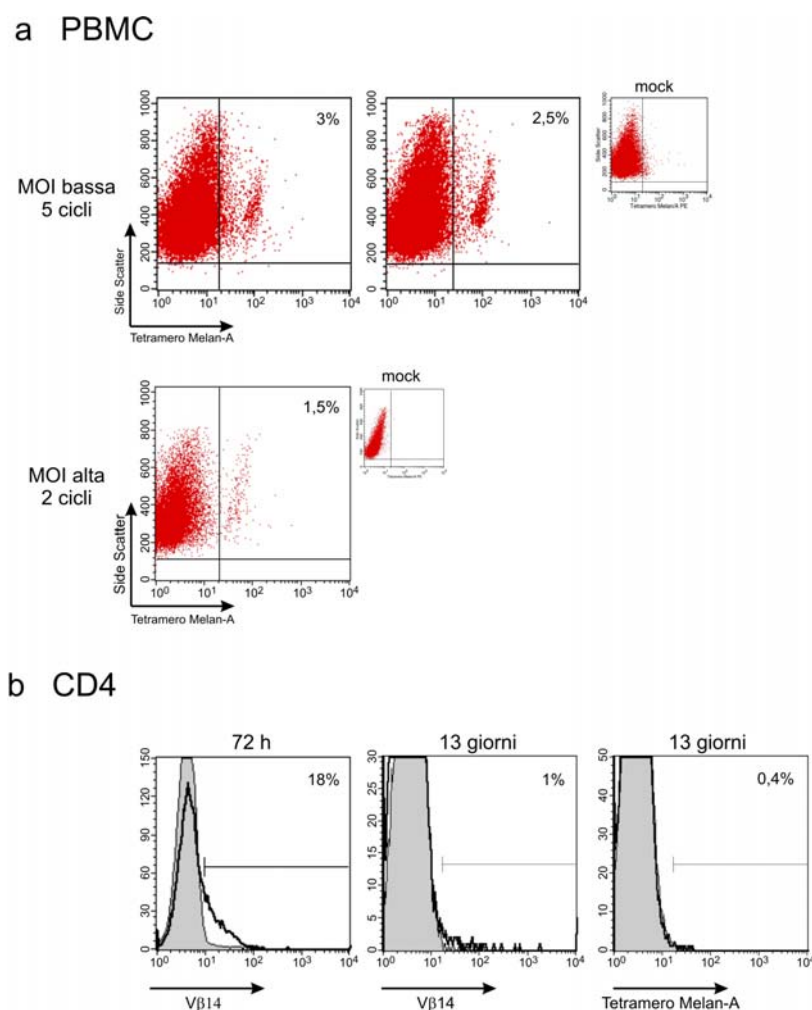


Figura 18. Profili di espressione di PBMC e CTL CD4⁺ trasdotti con LV-TCR. (a) I PBMC cotrasdotti con i vettori LV-TCR α e LV-TCR β sono stati marcati con tetramero specifico e analizzati in citofluorimetria a 72 ore dall'ultimo ciclo di trasduzione. Anche utilizzando preparazioni virali concentrate, l'efficienza di trasduzione risulta estremamente ridotta (pannelli in basso). In generale sono necessari diversi cicli di trasduzione per raggiungere livelli di espressione del TCR rilevabili dalla marcatura con tetramero. **(b)** Profilo di espressione citofluorimetrico di cellule CTL CD4⁺ cotrasdotte con vettori pCMV-TCR. L'espressione del TCR esogeno è stata analizzata mediante marcatura con mAb anti-V β 14. A 72 ore dal termine dell'infezione, i LV guidano l'espressione in superficie della catena β 14 nel 18% dei CTL trasdotti. Nel tempo si osserva una riduzione delle percentuali di positività per la catena specifica (secondo pannello). I dati riportati sono rappresentativi di diverse prove di trasduzione con un massimo di 5 cicli di trasduzione per catena.

4. GENERAZIONE DI VETTORI BIDIREZIONALI CODIFICANTI IL TCR

Trasferire due differenti transgeni mediante vettori separati implica che solamente una frazione delle cellule bersaglio risulti trasdotta da entrambi i vettori e che si generi una popolazione eterogenea di cellule esprimenti uno o due geni in rapporti diversi. Inoltre, la cotrasduzione con

costrutti codificanti ciascuno una sequenza aminoacidica di una molecola complessa (ad esempio il TCR), aumenta esponenzialmente il numero di fattori limitanti il livello di espressione della molecola finale. Si è quindi ritenuto di ottimizzare l'approccio di trasduzione del TCR mediante l'utilizzo di un unico LV dotato di un promotore bidirezionale²¹⁷

Il promotore bidirezionale da noi utilizzato è costituito da un frammento di 516 bp dal promotore della fosfoglicerato chinasi umana (PGK)¹⁸⁵ fuso ad elementi del promotore derivato dal citomegalovirus (minCMV), precedentemente sviluppato per accoppiare l'inizio della trascrizione eucariotica ad operatori tetraciclina-dipendenti²¹⁸ Il promotore bidirezionale è fiancheggiato da due cassette di espressione ottimizzate per il trasferimento LV-dipendente, comprendenti, la prima, il *constitutive transport element* (CTE)²¹⁹ del virus di Mason-Pfizer e un sito di poliadenilazione dal virus di scimmia SV40, la seconda, il *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element* (WPRE) e il sito di poliadenilazione SIN HIV-1 LTR¹⁸⁵ La generazione del vettore bidirezionale codificante le catene α e β del TCR ha richiesto diverse fasi di clonaggio e l'impiego di quattro diversi costrutti plasmidici (pRRLsin.PPTs.hCMV.TCR α pre; pRRLsin.PPTs.hCMV.TCR β pre; pBlu2KSM.minCMVPGK; #310.pCCLsin.cPPT.SV40polyA.CTE.tTA-S2.WPRE). La fase conclusiva del clonaggio, ossia l'inserimento della serie TCR α -PGK-minCMV-TCR β nel costrutto lentivirale #310 ha prodotto due vettori speculari per la posizione dei transgeni rispetto alle cassette di espressione (BD-I e BD-V). La produzione virale, del tutto analoga a quella dei vettori classici e descritta in dettaglio in *Materiali e Metodi*, ha generato particelle lentivirali non replicative, pseudotipizzate con la proteina VSV-G.

5. VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DI TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR MEDIATO DA VETTORI BIDIREZIONALI

5.1 Linea Jurkat

Al fine di valutare la funzionalità dei vettori bidirezionali, analogamente ai costrutti precedenti, cellule della linea Jurkat sono state trasdotte con differenti preparazioni virali e

analizzate con tecniche citofluorimetriche per l'espressione stabile in membrana del TCR transgenico. Trasducendo $0,2 \times 10^6$ cellule Jurkat con 1 ml di surnatante virale non concentrato si ottiene mediamente una positività per tetramero specifico superiore al 50% (dati non mostrati). In conclusione, l'efficienza di trasduzione non è inficiata dalle dimensioni del vettore (superiori per il vettore bidirezionale rispetto ai vettori classici), ma è unicamente correlabile alla bontà della produzione virale. Inoltre, i due vettori speculari non differiscono per l'efficienza di espressione del TCR transgenico in membrana, essendo la frazione cellulare positiva per tetramero e l'intensità media di fluorescenza comparabili in campioni trasdotti rispettivamente con i vettori BD-I e BD-V (Fig. 19). Nei successivi esperimenti di trasduzione con i vettori bidirezionali faremo riferimento indistintamente a uno o l'altro vettore definendoli genericamente BD-TCR.

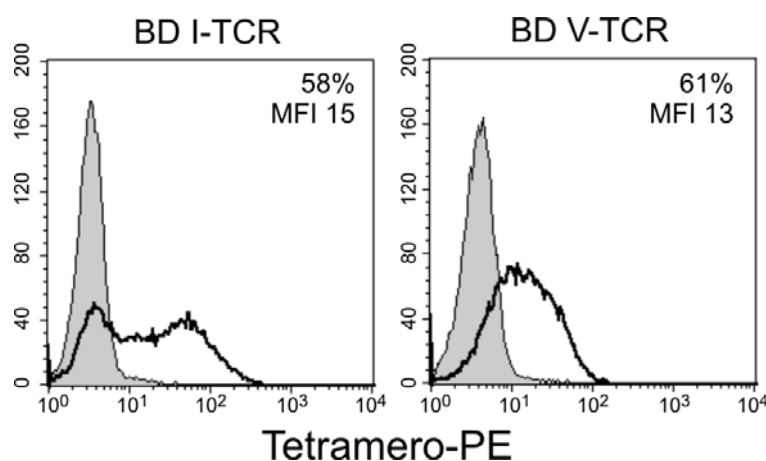


Figura 19.Analisi citofluorimetrica della linea Jurkat trasdotta con vettori bidirezionali. Cellule della linea Jurkat trasdotte con 1 mL di surnatante virale BD-I o BD-V rispettivamente, non concentrato (MOI 25). Nei singoli pannelli sono indicate la percentuale di cellule esprimenti il TCR transgenico e l'intensità media di fluorescenza (MFI) a 72 ore dalla trasduzione.

5.2 PBMC

Esperimenti pilota condotti su PBMC attivati con PHA e trasdotti secondo le metodiche già ottimizzate per LV classici, già descritte nei precedenti paragrafi, hanno confermato i livelli di espressione attesi sulla base dei dati di letteratura²¹⁷. In figura 20 si riporta la frazione di cellule positive per tetramero ottenuta traducendo i PBMC, in due cicli successivi, con il vettore BD-TCR concentrato 1:13. L'espressione risultante (7%) , confermata successivamente tra le migliori

riportate dall'analisi a 72 ore, è superiore a quella ottenuta in condizioni simili cotrasducendo i PBMC con vettori separati.

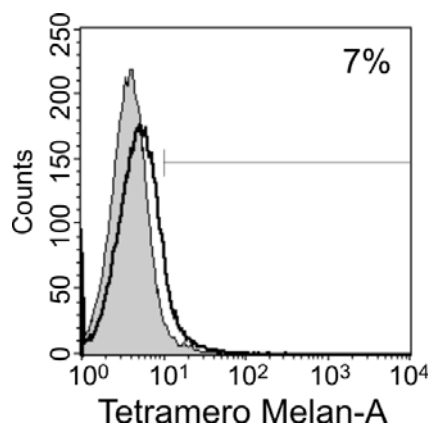


Figura 20. Espressione del TCR transgenico in PBMC umani attivati e trasdotti con vettori bidirezionali.

6. GENERAZIONE DI POPOLAZIONI CELLULARI T TRASDOTTE, PER STUDI DI TRASFERIMENTO ADOTTIVO

I dati fin qui riportati non supportano l'impiego della popolazione T trasdotta in studi di trasferimento *in vivo*. L'efficacia della terapia cellulare adottiva è infatti legata all'utilizzo di un numero elevato di linfociti T Ag-tumorale-specifici. Una metodica efficiente per generare tali cellule deve garantire rese elevate o prevedere un rapido sistema di espansione della frazione esprime il TCR specifico. Il protocollo standard definitivo di trasduzione dei PBMC, descritto in dettaglio in *materiali e metodi*, successivamente espansi *in vitro*, è il frutto della sintesi dei dati sovraesposti e del compromesso tra l'esigenza di un trasferimento genico efficiente e di un buono stato cellulare. In breve, i PBMC, attivati con PHA per 48 ore, venivano trasdotti per un'ora in un volume ridotto di sovrinatante virale (200µl) concentrato, quindi addizionati di terreno completo ed incubati per le successive 72 ore. Nel terzo giorno i PBMC venivano raccolti e stimolati.

Stimolazione non specifica. Ristimolando i PBMC non specificamente con PHA, immediatamente dopo la trasduzione, si è ottenuto un aumento progressivo dei livelli di espressione del TCR transgenico in membrana fino a circa il 50% di positività per tetramero specifico dopo due cicli di attivazione (Fig. 21b). Di questa frazione, il 70% esprimeva il marcatore CD8 e l'11% il CD4 (Fig.

21c). Il livello di espressione del transgene EGFP, utilizzato come gene *reporter* di controllo nel medesimo esperimento di trasduzione, è rimasto costante nel tempo (Fig. 21a). Quindi, l'attivazione delle cellule trasdotte induce l'espressione del TCR transgenico, elevando i livelli di eterodimero funzionale in membrana oltre i limiti di sensibilità dell'analisi citofluorimetrica con tetramero specifico. Inoltre, la presenza in coltura di una sottopopolazione di cellule doppie-positive $CD4^+$ /tetramero $^+$, a 20 giorni dalla trasduzione, indica che linfociti *helper* $CD4^+$ vengono trasdotti ed esprimono il TCR transgenico. Questo è un dato rilevante alla luce delle osservazioni che il trasferimento di una componente cellulare *helper*, di complemento a quella citotossica, potrebbe migliorare significativamente l'efficacia terapeutica dei linfociti anti-tumoral *in vivo*¹⁸⁸⁻¹⁹¹.

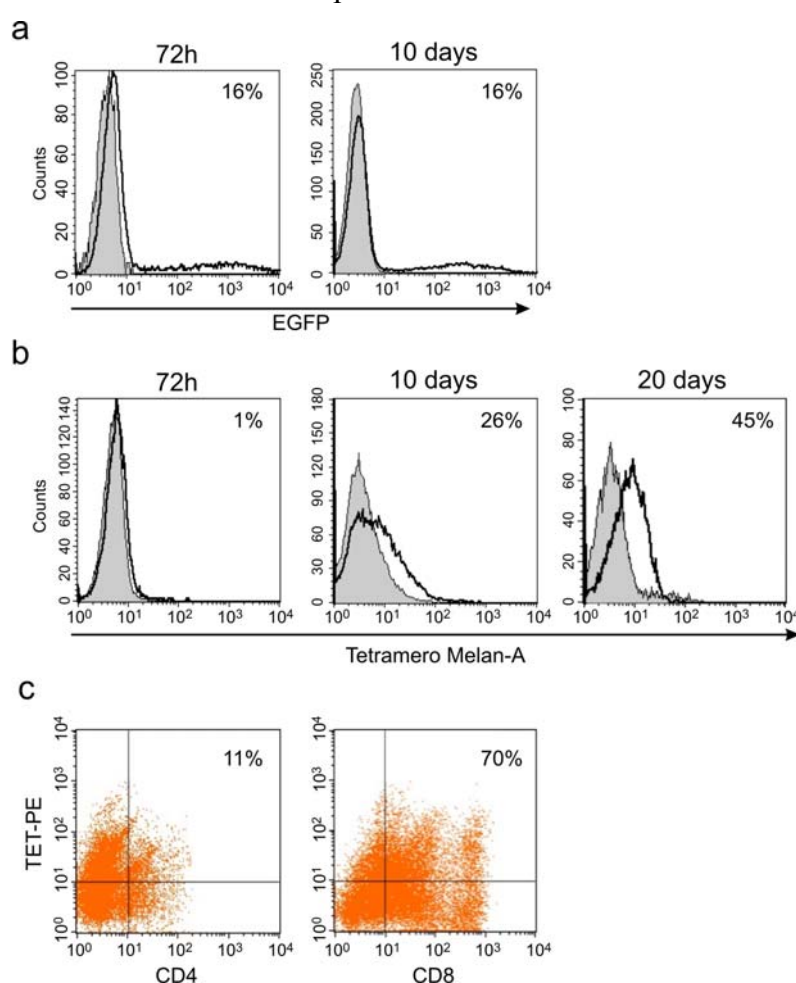


Figura 21. Espansione *in vitro* di una popolazione T PB TCR-trasdotta. PBMC attivati per 48 ore sono stati trasdotti con preparazioni virali concentrate, immediatamente ristimolati con PHA e analizzati nel tempo per l'espressione del/dei transgeni a partire da 72 ore dalla trasduzione. **(a)** Trasduzione con vettore pCMV-EGFP di controllo (1 ciclo). Ristimolando le cellule, il livello di espressione del gene *reporter* non muta nel tempo. **(b)** Cinetica di espressione del TCR transgenico in PBMC trasdotti mediante 2 cicli di incubazione con sovratanante virale concentrato. Immediatamente dopo la prima valutazione

citofluorimetrica, a 72 ore, i PBMC sono stati ristimolati con PHA e rianalizzati dopo 7 e 17 giorni. La frazione di cellule tetramero⁺ in coltura aumenta progressivamente. **(c)** Analisi citofluorimetrica dei PBMC descritti in (b) a 20 giorni dalla trasduzione. Le doppie marcature con CD4/tetramero e CD8/tetramero evidenziano la presenza di entrambe le sottopopolazioni in coltura. I valori percentuali indicati in alto a sinistra in ogni pannello sono relativi alla frazione tetramero positiva.

Stimolazione specifica. Questa fase del progetto è stata ulteriormente implementata dallo sviluppo di un sistema di ristimolazione specifica *in vitro*. Il protocollo attualmente impiegato risponde alla necessità di arricchire in tempi brevi la popolazione trasdotta e di ridurre, al contempo, il numero di ristimolazioni aspecifiche in coltura, consentendo cioè di selezionare ed espandere più velocemente esclusivamente le cellule dirette contro l'Ag Melan-A₂₆₋₃₅. Tale metodica genera, in maniera riproducibile, popolazioni caratterizzate da elevati livelli di espressione del TCR transgenico, da impiegare in esperimenti di trasferimento *in vivo*. In breve, i PBMC trasdotti vengono ristimolati settimanalmente con cellule della linea leucemica T T2 caricate con lo specifico peptide (Melan-A₂₆₋₃₅ modificato). La stimolazione ripetuta con peptide comporta l'accumulo selettivo di cellule T tetramero-positivo: l'espansione è rapida e consistente (fino a 100 volte in 30 giorni) e i livelli di espressione del TCR transgenico variano tra 60 e 80% (Fig. 22). In figura 11 sono riportate la cinetica di espressione del TCR e l'espansione numerica dei PBMC da donatore HLA-A2⁻, non trasdotti (mock), cotrasdotti con vettori singoli o trasdotti con il vettore bidirezionale. Osservando i due grafici, è evidente che durante i primi cicli di stimolazione con peptide entrambe le colture trasdotte con costrutti TCR cominciano ad accumulare una rilevabile componente tetramero-positiva. A partire dal terzo ciclo di stimolazione tale espansione diventa più consistente e rapida per la coltura trasdotta con il vettore bidirezionale, rispetto a quella cotrasdotta. D'altra parte, la selezione continua risulta infine nell'accumulo progressivo di un'elevata frazione di cellule tetramero-positive fino al raggiungimento di livelli massimi di espressione (intorno all'80%), indipendentemente dalla modalità di trasferimento iniziale del TCR. La cinetica di espansione sottolinea la rapidità con cui il protocollo descritto genera in coltura un elevato numero di cellule T specifiche. Tuttavia, in caso di donatori HLA-A2⁻, una reattività subliminale, ma costante, mediata dai TCR endogeni e diretta verso le molecole HLA-A2, potrebbe consentire la sopravvivenza in coltura di una frazione cellulare non trasdotta. Ciò spiegherebbe, per i grafici riportati, la mancata generazione di una coltura esprime il TCR transgenico nel 100% dei linfociti espansi.

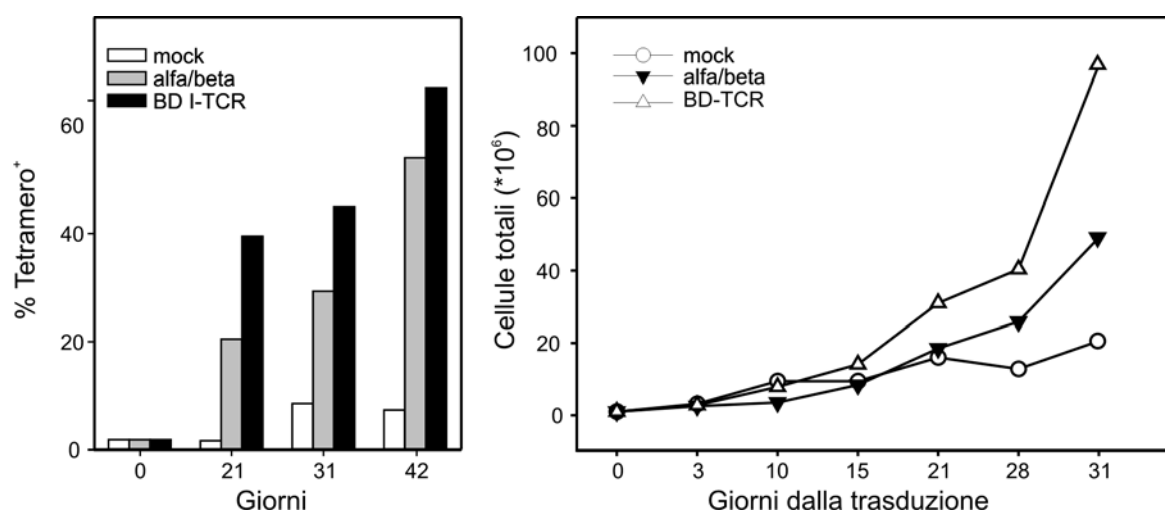


Figura 22. Cinetiche di espressione del TCR transgenico e dell'espansione della popolazione PBMC trasdotta e ristimolata con celluel T2 caricate con il peptide specifico. L'istogramma sulla sinistra descrive l'incremento progressivo della frazione tetramero⁺ in coltura, in funzione del tempo. La curva di crescita nel pannello a destra riporta l'espansione della coltura ristimolata specificamente con scadenza settimanale. E' inoltre possibile confrontare l'andamento nel tempo della coltura BD-TCR-trasdotta, sia in termini di espressione del TCR transgenico, che di espansione numerica, con una coltura di riferimento non trasdotta (mock) e una popolazione T ottenuta co-trasducendo i PBMC con vettori monocistronici codificanti le catene TCR, nelle stesse condizioni.

7.CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE E FENOTIPICA DELLA POPOLAZIONE T TRASDOTTA

7.1 Caratterizzazione funzionale

Sulla scorta dei dati di ottimizzazione di generazione della popolazione T transgenica, si è quindi valutato se una buona espressione del TCR correlasse con l'attività biologica desiderata, con particolare attenzione all'attività citotossica, che, da un punto di vista terapeutico, verisimilmente ricopre un ruolo importante tra le funzioni effettrici espletate dalle cellule T contro le cellule tumorali. La capacità di riconoscimento di bersagli cellulari esprimenti l'antigene di interesse è stata valutata mediante classici test di rilascio di ⁵¹Cr alle quattro ore e marcature intracitoplasmatiche per rilascio di IFN- γ . Il TCR transgenico conferisce alla popolazione trasdotta la capacità di riconoscimento dell'antigene Melan-A₂₆₋₃₅ in un contesto HLA-A2 ristretto, espresso sulla superficie di cellule caricate artificialmente (T2 pulsate), o presentato in condizioni fisiologiche (linea cellulare SK-23 MEL), mediando un'attività citotossica elevata e specifica (Fig. 23). Entrambe le popolazioni trasdotte analizzate (CTL BD e CTL α/β), ottenute da un donatore HLA-

A2⁻, sono in grado di mediare la lisi dei bersagli cellulari HLA-A2⁺ presentanti l'Ag. Tuttavia, la coltura BD mostra una citotossicità più efficace nei confronti della linea SK-23 MEL, rispetto alla coltura cotrasdotta. Per i PBMC mock non si rileva alcuna citotossicità specifica, sebbene l'efficienza di lisi nei confronti di cellule T2 pulsate appaia, per l'esperimento riportato in figura, tendenzialmente superiore. In questo caso, una ridotta componente linfocitaria Melan-A specifica si è espansa mediante ristimolazione con T2 pulsate a partire dal repertorio fisiologico del paziente donatore (Fig.23). Le linee di controllo T2 non pulsata e PDO-328 MEL (HLA-A2⁻/Melan-A⁻) non vengono riconosciute dalle popolazioni esprimenti il TCR transgenico. Monitorando le colture nel tempo si osserva una riduzione progressiva della lisi aspecifica e l'aumento dell'attività citotossica, comunque funzione della buona vitalità delle cellule in coltura.

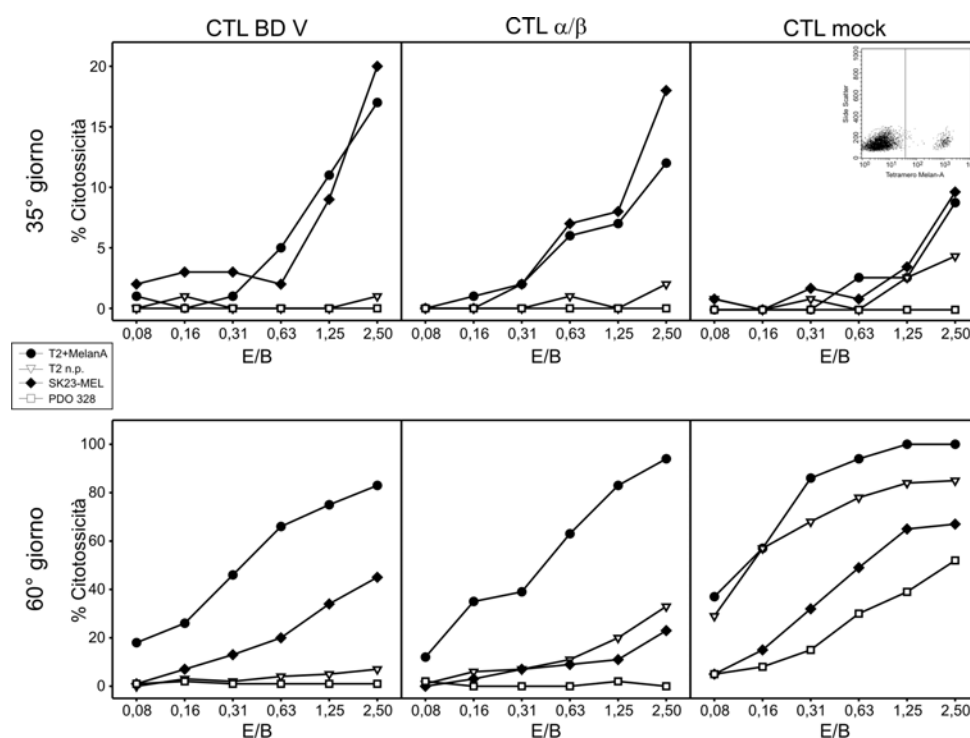


Figura 23. Attività citotossica della popolazione T trasdotta. I PBMC ottenuti mediante trasduzione e successiva stimolazione specifica, come descritto al punto 6 della sezione *Risultati*, sono stati valutati per l'attività citotossica nei confronti di diverse linee cellulari in un classico test di rilascio di ⁵¹Cr alle quattro ore. La figura riporta analisi rappresentative, condotte a 35 e 60 giorni dalla trasduzione su una popolazione BD-TCR, su una coltura co-trasdotta con vettori singoli e su una coltura mock di controllo. Il pannello del mock a 35 giorni riporta inoltre l'analisi citofluorimetrica di cellule marcate con il tetramero Melan-A. Tale analisi è rappresentativa anche della citofluorimetria eseguita a 60 giorni sulla stessa coltura ed evidenzia una componente specifica, espansa a partire dalla frazione tetramero⁺ fisiologica del paziente donatore.

In aggiunta, le linee cellulari che presentano l'Ag Melan-A₂₆₋₃₅ stimolano specificamente le colture trasdotte a secernere la citochina IFN- γ (Fig. 24). Per dimostrare che il riconoscimento dell'Ag e la reattività cellulare dipendono specificamente dalla frazione cellulare della coltura BD che esprime il TCR transgenico, si sono condotte prove di marcatura intracitoplasmatica per IFN- γ . Dopo un'incubazione di 12 ore in presenza di vari tipi di stimoli, le cellule sono state marcate con tetramero Melan-A per identificare le cellule trasdotte e con un anticorpo monoclonale anti-IFN- γ intracellulare per associarne un'eventuale attività funzionale. Tuttavia si è osservato, in tre esperimenti indipendenti, la modulazione negativa del TCR transgenico a seguito della cocoltura con cellule presentanti l'Ag Melan-A o dell'incubazione con PMA-ionomicina, che rappresenta una stimolazione massimale utilizzata come controllo positivo. L'internalizzazione del TCR transgenico, fenomeno fisiologico conseguente all'attivazione funzionale, risulta nella negativizzazione della marcatura per tetramero specifico. In conclusione, il test prescelto non può essere eseguito correttamente. Tuttavia, i campioni più attivi funzionalmente corrispondono ai campioni con livelli di positività per IFN- γ più elevati. Dai pannelli citofluorimetrici di figura emerge inoltre che la stimolazione con cellule T2 presentanti l'Ag specifico induce la produzione di citochina in quantità significativamente più elevata delle cellule T2 non caricate con l'Ag. Si può pertanto inferire che l'espressione del TCR transgenico conferisce alle cellule trasdotte la responsività al peptide Melan-A₂₆₋₃₅, e l'estrinsecarsi di un'attività funzionale specifica. Nuovi test verranno condotti per confermare tale assunzione. In particolare, la componente cellulare esprimente il TCR transgenico sarà selezionata, isolata e analizzata per la secrezione di citochine in test ELISA.

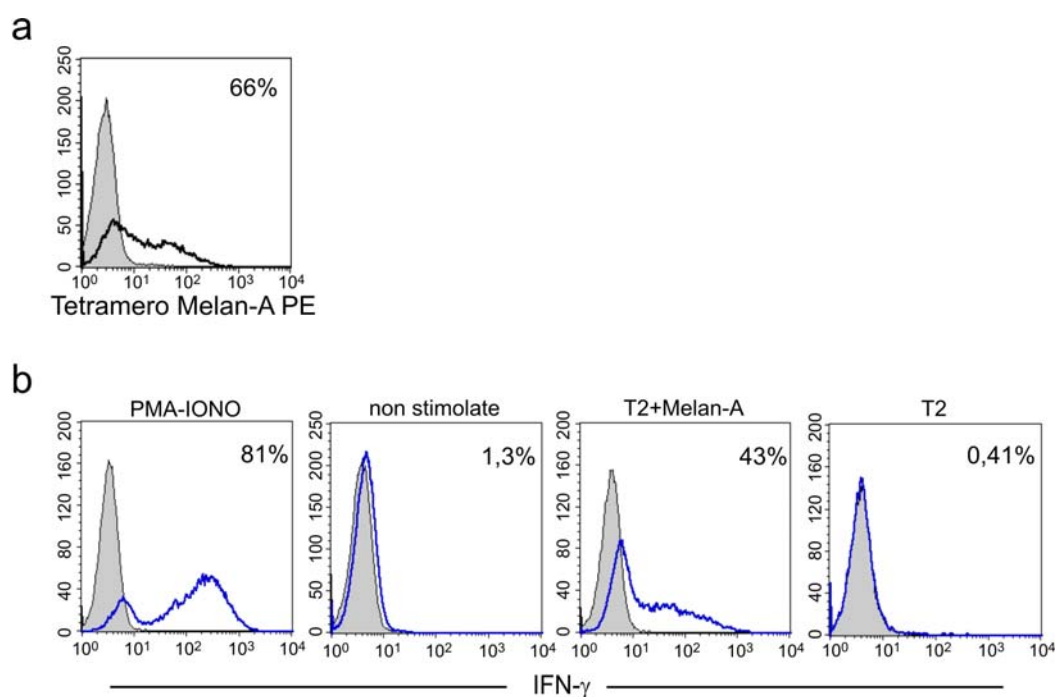


Figura 24. Marcatura intracitoplasmatica per IFN- γ . La caratterizzazione funzionale della popolazione BD-TCR trasdotta è stata eseguita mediante incubazione di 15 ore in diverse condizioni di stimolazione e successiva marcatura intracitoplasmatica per IFN- γ . **(a)** Campione di controllo dalla coltura BD-TCR, incubato in terreno completo, in assenza di ristimolazione e marcato con tetramero specifico. La percentuale indicata nel pannello indica la frazione di cellule tetramero⁺ in coltura al momento della valutazione funzionale. **(b)** Espressione di IFN- γ in cellule ristimate per 15 ore con PMA-IONO, T2 non caricate con il peptide, T2 caricate con Melan-A₂₆₋₃₅ e in cellule non ristimate. La marcatura è stata eseguita in singola con un mAb anti-IFN- γ (FITC).

Le potenzialità di espansione numerica e l'attività funzionale, sia in termini di citotossicità che di secrezione di citochine, si mantengono inalterate anche dopo fasi successive di congelamento e scongelamento delle cellule ingegnerizzate. Come si osserva in figura 25, dopo una breve fase iniziale di ripresa delle cellule in coltura, l'espansione ricomincia rapida e consistente. L'analisi di citotossicità a 30 giorni dallo scongelamento conferma i dati funzionali riportati precedentemente (Fig. 25)

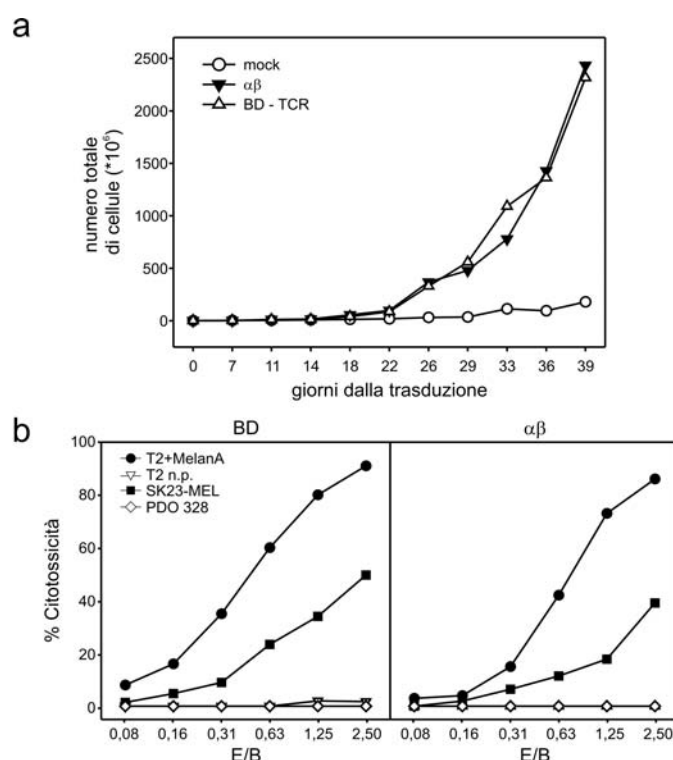


Figura 25. Espansione numerica e analisi di citotossicità della popolazione T BD-TCR trasdotta, dopo un ciclo di congelamento-scongelo. (a) Espansione numerica delle popolazioni BD-TCR, co-trasdotta $\alpha\beta$ e mock in condizioni di ristimolazione specifica settimanale. (b) Analisi di citotossicità a 30 giorni dallo scongelamento delle colture BD-TCR (sinistra) e co-trasdotta $\alpha\beta$ a destra.

7.2 Caratterizzazione fenotipica

L'analisi citofluorimetrica delle cellule T stimulate ripetutamente in coltura evidenzia l'esaurimento progressivo della componente linfocitaria $CD4^+$ a favore di quella $CD8^+$ (Fig 26a). La selezione osservata dipende dalla ristimolazione via TCR transgenico ristretto per MHC di classe I, meno efficiente per cellule trasdotte esprimenti il marcatore $CD4$, rispetto ai linfociti $CD8^+$ (crf paragrafo successivo). L'ulteriore caratterizzazione fenotipica di una coltura trasdotta ed espansa per circa 2 mesi, eseguita al momento dell'inoculo *in vivo*, descrive lo stato differenziativo dei linfociti T $CD8^+$ (Fig. 26b). Il profilo che emerge è di tipo effetore, ai limiti tra lo stadio intermedio e tardivo⁷⁵, come indicato in particolare dalla modulazione negativa dei marcatori $CD62L$, $IL-7R\alpha$ e $CD28$ e dai livelli di espressione elevati di $CD25$. Tuttavia, la molecola costimolatoria $CD27$, marcatore di uno stadio meno differenziato delle cellule T, rimane espressa ad alta intensità sulla quasi totalità della popolazione in coltura.

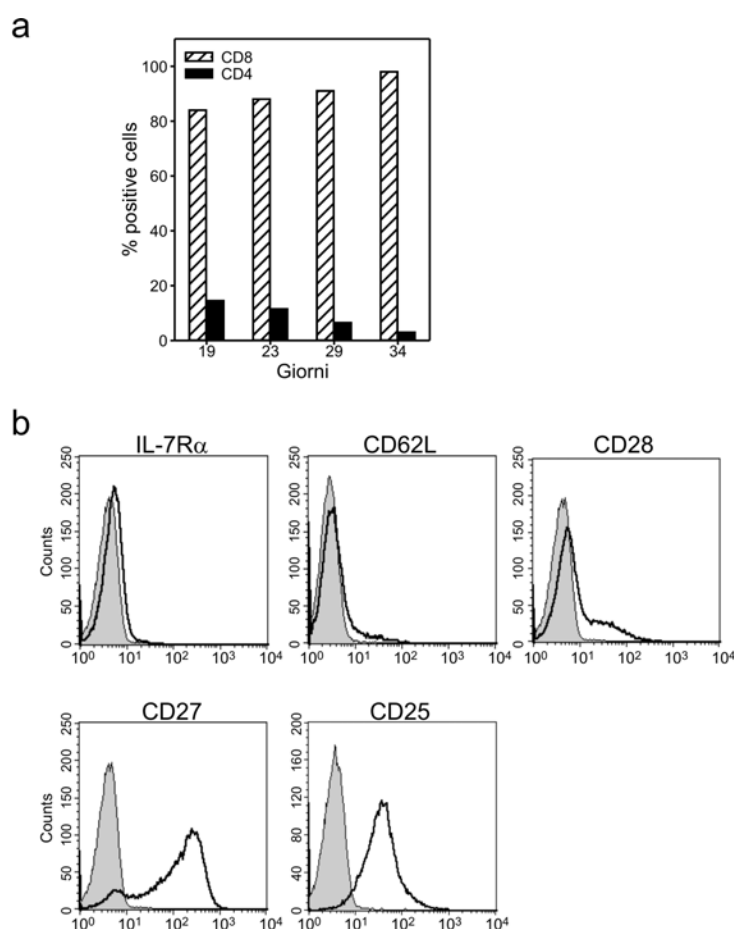


Figura 26. Caratterizzazione fenotipica della popolazione BD. (a) Analisi citofluorimetrica della popolazione BD espansa *in vitro*, marcata con mAb anti-CD4 o -CD8. La cinetica di espressione nel tempo indica l'alterazione della composizione in sottopopolazioni della coltura e la progressiva selezione ed espansione della frazione CD8⁺. **(b)** Analisi citofluorimetrica della popolazione BD marcata con mAb diretti contro i diversi marcatori di membrana indicati per ciascun pannello ed eseguita al momento degli inoculi *in vivo* per gli esperimenti di trasferimento adottivo.

8. ANALISI COMPARATIVA FUNZIONALE TRA IL CLONE SELA-A 64 E LA COLTURA TRASDOTTA

Dopo aver dimostrato che il trasferimento del recettore per l'antigene conferisce alle cellule T riceventi una nuova specificità, si sono studiati altri importanti aspetti dell'interazione cellula T trasdotta-cellula tumorale, potenzialmente in grado di condizionare *in vivo* le risposte T cellulari Ag-specifiche. L'avidità e l'affinità delle cellule T trasdotte sono state valutate e comparate a quelle del clone CTL SELA-A 64 mediante esperimenti di i) marcatura con tetramero specifico ii)

riconoscimento di APC caricate con basse concentrazioni di Ag, iii) riconoscimento di bersagli tumorali, iv) segnalazione intracellulare in assenza della molecola costimolatoria CD8.

8.1 Affinità

La coltura trasdotta utilizzata nell'analisi esprime al 100% il marcatore CD8 ed è positiva per tetramero al 70%. Inoltre, una componente della popolazione trasdotta ad alta espressione del TCR transgenico viene marcata dal tetramero con un valore di MFI superiore rispetto a quello della coltura clonale. L'MFI media della coltura BD è comunque paragonabile alla MFI del clone (18 e 23 rispettivamente, Fig. 27). Il legame dei tetrameri è generalmente accettato come misura dell'affinità del TCR per l'antigene, ossia della forza dell'interazione molecolare tra il recettore e il complesso pMHC. Inoltre, un buon livello di espressione del TCR sembra necessario per conferire ai linfociti T trasdotti un'avidità elevata, comparabile perlomeno con quella del clone T di origine e in grado di mediare una proporzionale attività funzionale¹¹⁴. Tuttavia, è stato dimostrato che il legame o meno del tetramero al TCR non è sempre un buon indice della funzione del TCR clonato o dell'avidità di una cellula T trasdotta con tale TCR²²⁰.

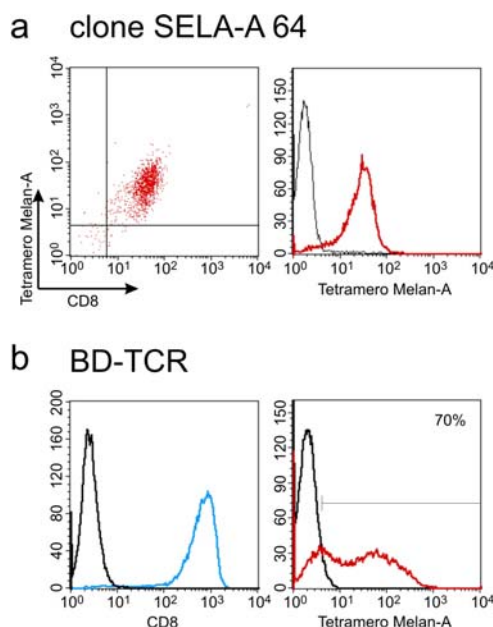


Figura 27. Analisi citofluorimetrica comparativa del clone SELA-A 64 e della popolazione BD per l'espressione della molecola costimolatoria CD8 e del TCR transgenico.

8.2 Avidità

L'avidità relativa del clone SELA-A 64 e della coltura BD è stata quindi valutata in citotossicità dopo incubazione con cellule T2 caricate con concentrazioni decrescenti di peptide Melan-A₂₆₋₃₅ (Fig. 28). In questi esperimenti, la quantità di peptide richiesta per ottenere il 50% della lisi massima specifica definisce l'avidità antigenica. Le curve ottenute forniscono valori di avidità comparabili per le due colture (rispettivamente 32 nM e 60 nM) e lisi significative per concentrazioni di peptide >10 nM. Si può pertanto concludere che il trasferimento del TCR del clone SELA-A 64 a effettori alternativi genera cellule T con capacità analoga di riconoscimento dell'Ag della cellula T parentale, ovvero che la soglia di induzione dell'attivazione è la medesima. Tuttavia, la coltura BD è molto eterogenea e risulta composta da linfociti T che esprimono il TCR transgenico a livelli diversi: l'avidità calcolata è quindi il risultato della media delle avidità funzionali delle singole cellule T.

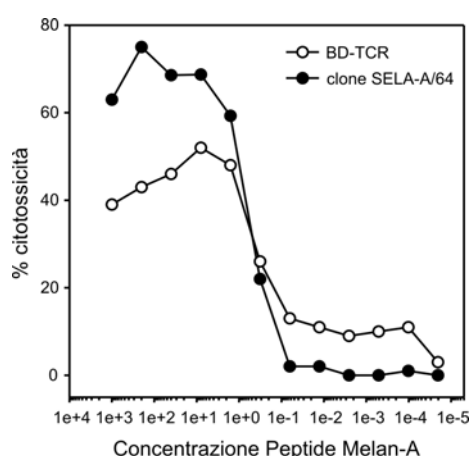


Figura 28. Analisi comparativa dell'avidità funzionale del clone SELA-A 64 e della coltura BD TCR-trasdotta, valutate mediante un classico test di citotossicità in presenza di concentrazioni scalari di peptide.

8.3 Riconoscimento di cellule tumorali esprimenti l'Ag Melan-A

A questo proposito, è stato riportato che l'avidità delle cellule T correla con la capacità di riconoscimento delle cellule tumorali^{221,222}. Questa ipotesi è stata vagliata in un classico test di rilascio di ⁵¹Cr alle 4 ore, condotto incubando in parallelo il clone SELA-A 64 e la coltura BD con linee cellulari di melanoma (Fig. 29). Come mostrato in figura, la lisi specifica contro la linea SK-23 MEL è elevata e comparabile per i due effettori analizzati. La linea melanocitaria MeWO, che esprime l'Ag a livelli inferiori (Fig. 29) viene debolmente lisata da entrambi gli effettori. Infine,

l'espressione di TCR endogeni nella coltura trsdotta si manifesta attraverso l'alloreattività nei confronti della linea T2 non pulsata e di una linea melanocitaria HLA-A2⁺/Melan-A⁻ (A375).

Complessivamente questi risultati dimostrano che, sebbene la coltura clonale contenga un numero significativamente superiore di cellule T CD8⁺ che legano il tetramero ad alta intensità rispetto alla coltura trsdotta, tale caratteristica non è associata ad un incremento misurabile dell'avidità funzionale complessiva della popolazione o dell'attività citotossica contro cellule tumorali esprimenti il peptide Melan-A.

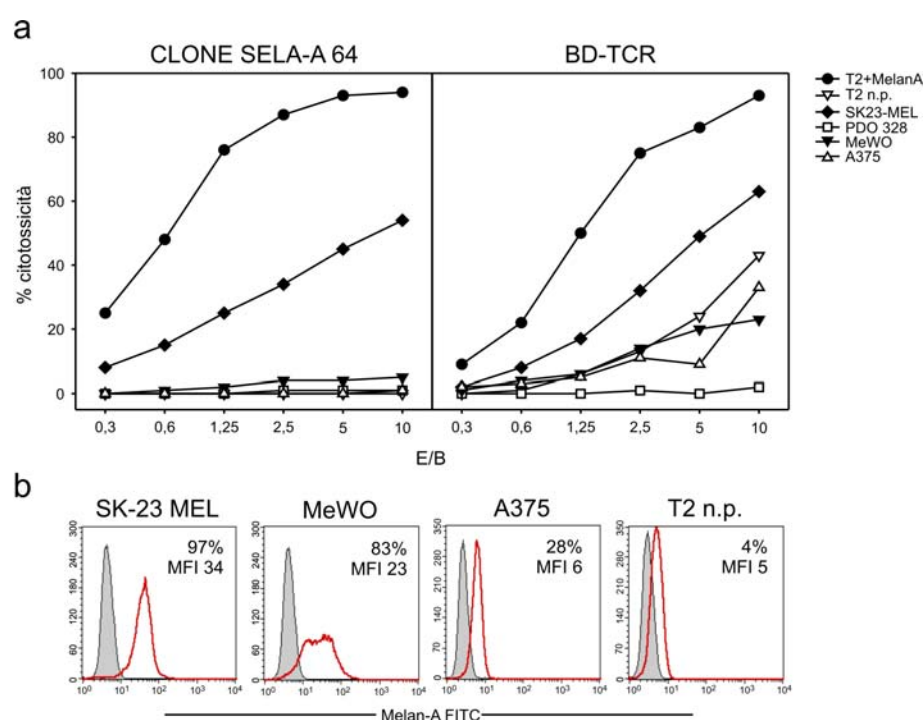


Figura 29. Analisi comparativa della capacità di riconoscimento dell'Ag specifico, presentato in un contesto fisiologico, del clone SELA-A 64 e della coltura BD TCR-trasdotta. (a) Test di rilascio di ⁵¹Cr alle 4 ore, eseguito con differenti linee melanocitarie come bersagli cellulari. **(b)** Analisi citofluorimetriche delle linee utilizzate come cellule bersaglio nel test di citotossicità riportato al punto (a): la marcatura intracitoplasmatica per l'Ag Melan-A evidenzia livelli di espressione differenti di tale Ag.

8.4 Dipendenza funzionale del TCR dalla molecola costimolatoria CD8

In particolare, il corecettore CD8 favorisce l'efficienza di un legame ad affinità sub-ottimale TCR/pMHC attraverso effetti sia sul tasso di associazione che di dissociazione dei complessi²²³. Stabilizzando il complesso TCR/pMHC, il CD8 incrementa l'efficienza del riconoscimento antigenico da parte delle cellule T e, in funzione della forza del TCR, permette il legame del tetramero e il riconoscimento delle cellule tumorali. Per verificare la dipendenza o meno da CD8

del TCR in analisi, abbiamo quindi valutato gli effetti di un anticorpo anti-CD8 sull'attività citotossica della coltura traspunta. L'anticorpo bloccante UCHT-4 è in grado di inibire l'attività citotossica verso cellule T2 pulsate con il peptide Melan-A₂₆₋₃₅ e dalla linea SK-23 MEL (Fig. 30). In particolare, descrivendo la citotossicità in termini di unità litiche 30 (UL30), si può osservare come l'anticorpo bloccante inibisca quasi completamente l'attivazione funzionale delle cellule T nei confronti della linea melanocitaria. Nello specifico, al rapporto 5:1 cellula T:cellula bersaglio, la percentuale di inibizione è del 61% per le cellule T2 pulsate e dell'87,5% per le cellule SK-23 MEL. La dimostrazione della dipendenza funzionale delle cellule trasdotte dalla molecola CD8 concordano con i dati relativi all'avidità funzionale ottenuti precedentemente. Possiamo quindi affermare che la coltura BD possiede un'avidità funzionale di tipo moderato (concentrazione dell'Ag presentato da una APC necessaria ad indurre attivazione cellulare compresa tra 1 e 100 nM²²⁴). È stato descritto che il riconoscimento CD8 indipendente è una proprietà del TCR e non della cellula T parentale²²⁵. A causa della mancata disponibilità del clone SELA-A 64 non è stato possibile verificarne la dipendenza funzionale dal CD8 e confermare tale assunto.

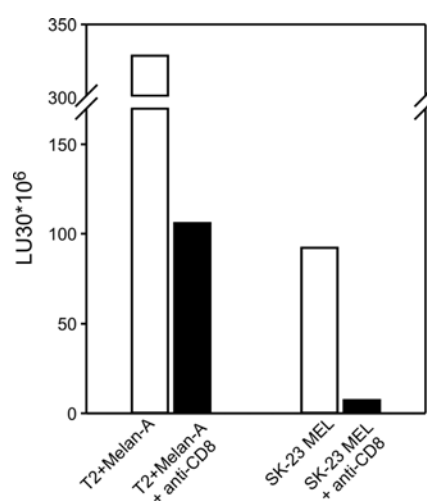


Figura 30. Dipendenza funzionale del TCR transgenico dalla molecola co-stimolatoria CD8 in cellule della coltura traspunta BD-TCR. L'attività litica dell'effettore (cellule BD-TCR) nei confronti di bersagli specifici (T2 caricate con il peptide e cellule SK-23 MEL) è inibita in presenza di un mAb anti-CD8 a concentrazione saturante. Nell'istogramma tale inibizione è descritta in funzione del numero di unità litiche per milione di cellule che inducono una lisi del 30% (UL30*10⁶).

9. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA TERAPEUTICA *IN VIVO*

9.1 Winn Assay

L'efficacia terapeutica *in vivo* di PBMC trasdotti ed espansi in coltura è stata inizialmente valutata in un esperimento di "Winn assay", inoculando s.c. sul fianco di topi SCID immunodeficienti 1×10^6 cellule tumorali e sul fianco contro-laterale degli stessi animali una sospensione di cellule tumorali mescolate a cellule T trasdotte, in rapporto 5:1 (Fig 31). Il tumore di controllo generato dalla linea melanocitaria SK-23 MEL comincia a svilupparsi nel 100% dei topi inoculati approssimativamente a partire dal quarto giorno dall'inoculo ed è facilmente identificabile per la caratteristica pigmentazione scura, dovuta alla produzione di melanina da parte delle cellule tumorali. Al sito di co-inoculo delle cellule SK-23 MEL e delle cellule T trasdotte, non si sono verificate formazione e/o crescita di alcuna massa tumorale durante tutto il periodo di osservazione (43 giorni). Allo scopo di dimostrare la specificità del trattamento, le cellule T trasdotte sono state inoculate anche in topi portatori di melanoma A375, secondo lo schema del test di Winn assay descritto per le cellule tumorali SK-23 MEL. Come emerge dal grafico di figura 31, la linea A375 origina tumori più aggressivi e caratterizzati da una cinetica di crescita più rapida. Il co-inoculo A375-cellule T trasdotte ha rallentato in maniera non significativa lo sviluppo del tumore, senza impedire la crescita progressiva della massa neoplastica. Come già evidenziato dagli studi di citotossicità *in vitro*, un certo grado di lisi delle cellule A375 dipende dalla reattività delle cellule T trasdotte verso la molecola HLA-A2. In conclusione, le cellule T trasdotte esplicano un'attività antitumorale specifica ed efficace anche in un contesto fisiologico.

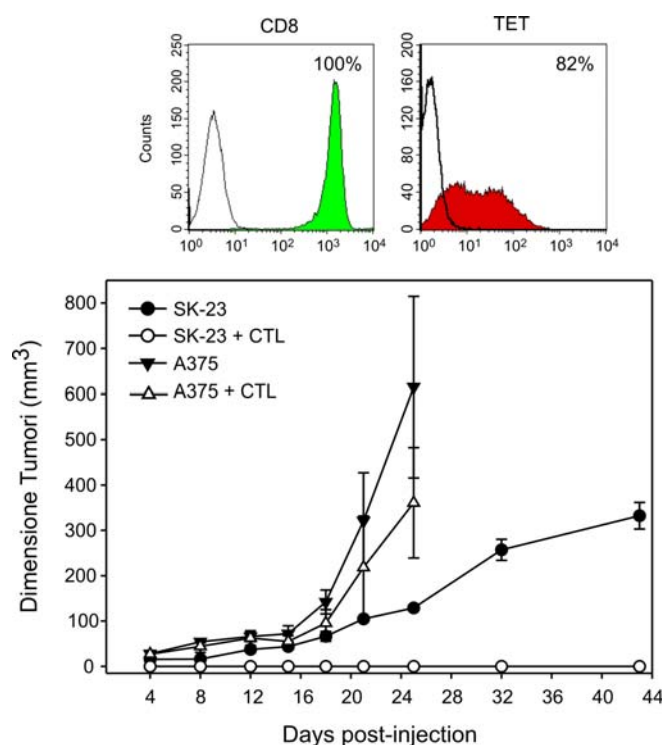


Figura 20. Attività anti-tumorale Ag-specifica *in vivo* delle cellule T trasdotte. Un totale di 1×10^6 di cellule melanocitarie SK-23 MEL o A375 sono state mescolate con 5×10^6 di cellule T trasdotte, e inoculate s.c. al giorno 0 in topi SCID. I tumori di controllo si sviluppano sul fianco controlaterale di ogni animale, inoculando cellule tumorali non miscelate a cellule T. Il grafico in figura riporta la media delle cinetiche di crescita dei tumori di controllo e dei tumori trattati. Sul fianco corrispondente all'inoculo di cellule SK-23 MEL e cellule T il tumore non cresce, in tutti gli altri casi (SK-23 MEL; A375; A375 + cellule T) la massa tumorale diviene evidente a partire dal quarto giorno dall'inoculo, e si sviluppa successivamente con progressione costante. Numero di topi per gruppo $n=3-8$. Le cellule T trasdotte utilizzate nell'esperimento sono state generate tarcludend i PBMC di un paziente HLA-A2- ed espanse specificamente per circa 2 mesi in coltura. Al momento dell'inoculo la caratterizzazione fenotipica descriveva una popolazione 100% CD8⁺ e 82% tetramero-specifico-positiva (pannelli citofluorimetrici).

9.2 Somministrazione loco-regionale in ambito terapeutico

Incoraggiati dai risultati positivi del test *in vivo* appena discusso, l'efficacia delle cellule T ingegnerizzate è stata verificata nell'ambito di modelli tumorali stabilizzati. A questo scopo, i topi SCID sono stati inoculati con 1×10^6 cellule SK-23 MEL s.c. al giorno 0, e successivamente con 10^7 cellule T localmente (s.c.), nello stesso sito di inoculo del tumore, o per via sistemica (e.v.). La crescita neoplastica è stata quindi registrata nel tempo e la sopravvivenza degli animali trattati valutata rispetto ai gruppi di controllo non trattati. E' stato condotto un primo esperimento iniettando negli animali una sola dose di cellule T al giorno 7 (Fig 32a). In tal caso, il ritardo nell'insorgenza del tumore, osservato nel gruppo sperimentale rispetto al gruppo di controllo, non è

significativo e le due curve di crescita hanno andamenti paralleli. Quindi, una sola somministrazione locale delle cellule trasdotte sembra non interferire con la crescita del tumore. Un secondo protocollo sperimentale ha previsto schemi di due o tre inoculi in successione, rispettivamente ai giorni 7 e 12 o 7, 12 e 17. Entrambi i tipi di trattamento hanno prodotto un significativo ritardo della crescita tumorale ($p < 0,01$), fino al giorno 25 dall'inoculo del tumore (Fig. 32b). L'effetto è particolarmente evidente nel gruppo di topi trattati con tre inoculi: nel caso specifico, la differenza di massa tra trattati e controlli si mantiene significativa fino alla conclusione dell'esperimento. Il rallentamento nella crescita del tumore si traduce in un incremento della sopravvivenza complessiva (definita come il periodo necessario a raggiungere un volume tumorale massimo) degli animali trattati rispetto ai controlli, pari a 13 e 29 giorni, rispettivamente per i trattati con 2 e 3 inoculi (Fig. 32b). Il terzo inoculo consente quindi di aumentare significativamente la sopravvivenza rispetto ai trattati con 2 inoculi per un totale di 16 giorni.

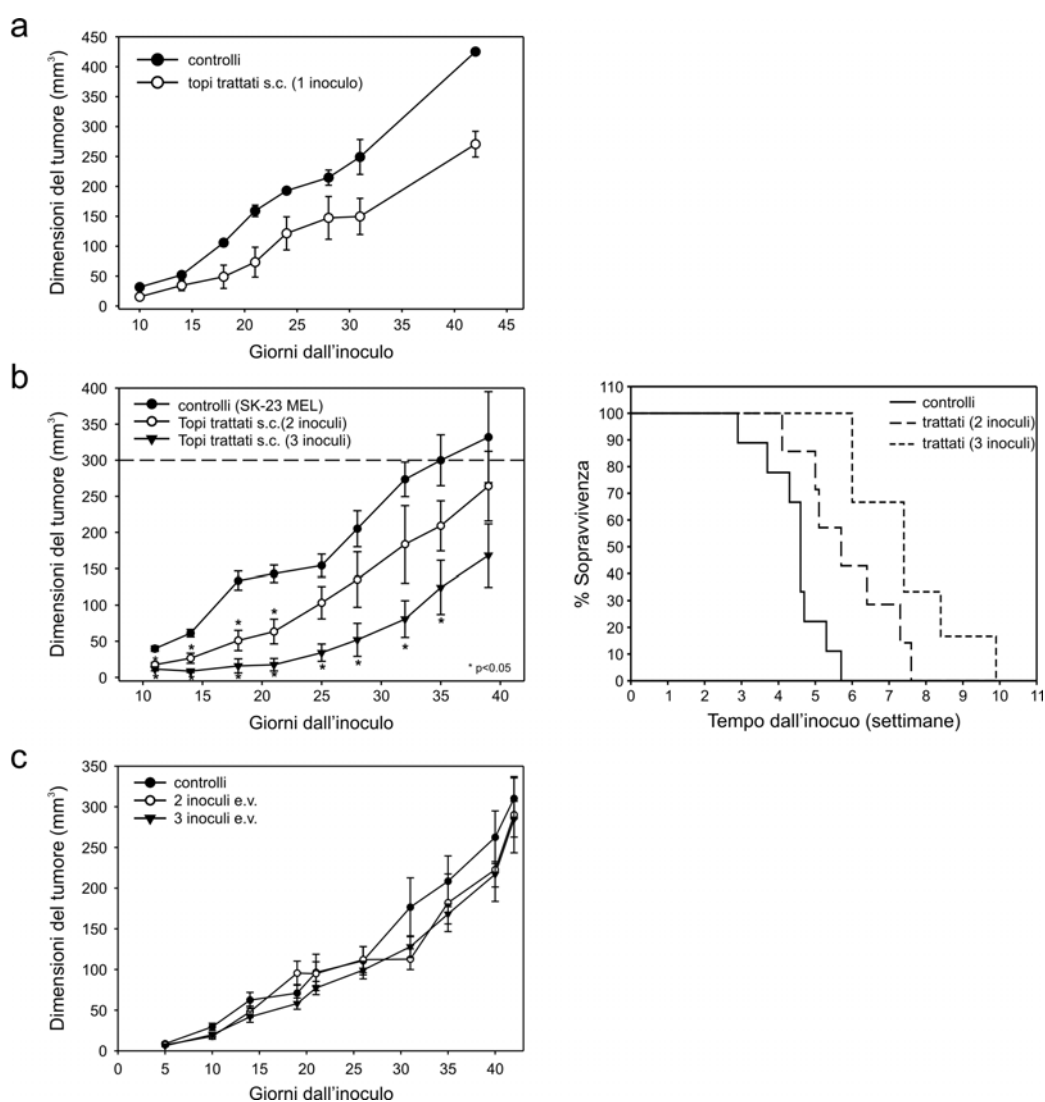


Figura 32. Valutazione dell'efficacia terapeutica *in vivo*. (a) 10×10^6 cellule della coltura trasdotta BD sono state inoculate al giorno 7 in topi Scid portatori di tumore SK-23 MEL. Il gruppo di animali di controllo comprende topi non trattati. I valori relativi alle aree dei tumori sono il risultato della media delle misurazioni di 4 animali per gruppo. A causa della scarsa numerosità dei gruppi sperimentali, il ritardo nella crescita dei tumori nei topi trattati non è significativa. (b) Usando lo stesso numero di cellule T dalla coltura trasdotta per ogni dose di inoculo (10×10^6), i topi sono stati trattati rispettivamente ai giorni 7 e 12 (2 inoculi) o 7, 12 e 17 (3 inoculi). Il ritardo nella crescita del tumore nei topi che hanno ricevuto 3 inoculi è significativo fino al termine dell'esperimento. ($p < 0,01$). Il pannello sulla destra riporta la sopravvivenza degli stessi gruppi di animali. Anche in questo caso, entrambi i trattamenti hanno un significativo effetto sull'aumento della sopravvivenza degli animali ($p < 0,01$). (c) Inoculi anche ripetuti e.v. della medesima dose di cellule trasdotte non risulta in alcun significativo ritardo nella crescita del tumore, rispetto al gruppo di controllo (animali non trattati).

9.3 Somministrazione sistemica in ambito terapeutico

L'attività terapeutica delle cellule ingegnerizzate è stata valutata anche mediante esperimenti di inoculo e.v. in topi SCID portatori di tumore SK-23 MEL, indotto dall'inoculo s.c. come

precedentemente descritto. In queste condizioni sperimentali, l'inoculo di 10^7 cellule T, somministrate per via sistemica, non ha indotto alcuna regressione significativa della crescita tumorale, anche dopo somministrazioni ripetute ai giorni 5, 10 e 14 (Fig.32c).

In conclusione, utilizzando un modello di melanoma altamente aggressivo, le cellule T ingegnerizzate si sono dimostrate efficaci se co-inoculate con le cellule tumorali (schema del Winn assay) o se iniettate ripetutamente e nelle vicinanze del sito tumorale. Tuttavia, in quest'ultimo caso, le cellule T non sono state in grado di indurre una sufficiente risposta immunitaria anti-tumorale a lungo termine. Il modello tumorale utilizzato non ha permesso lo studio dell'attività terapeutica nei confronti di metastasi: diverse prove di inoculo s.c. ed e.v. delle cellule SK-23 MEL non hanno infatti evidenziato alcuna proprietà metastatizzante della linea melanocitaria nei topi SCID.

10. VALUTAZIONE DELLA MODULAZIONE DELL'Ag MELAN-A MEDIANTE IMMUNOISTOCHEMICA

L'efficacia terapeutica delle cellule T trasdotte dipende, *in primis*, dal riconoscimento specifico dell'Ag Melan-A₂₆₋₃₅, contro cui il TCR transgenico è diretto. Si è quindi ritenuto necessario verificare l'espressione di tale Ag da parte della linea SK-23 MEL, utilizzata come modello tumorale negli esperimenti *in vivo*. Essendo stata descritta, per diverse linee melanocitarie, una modulazione negativa dell'Ag quando le cellule si trovano fortemente a confluenza in coltura (Ramirez-Montagut T *et al*, 2000), abbiamo inizialmente marcato *in vitro* cellule della linea SK-23 MEL con un anticorpo monoclonale diretto contro Melan-A. L'analisi citofluorimetrica di cellule ad alta o bassa confluenza in fiasca di coltura evidenzia una buona espressione dell'Ag (Fig. 33).

La conferma della presenza dell'Ag al momento dell'inoculo *in vivo* non esclude tuttavia la potenziale modulazione dell'espressione di Melan-A al sito tumorale. In questa sede, infatti, la pressione selettiva esercitata dalle cellule T trasdotte potrebbe favorire la sopravvivenza e l'espansione di una popolazione tumorale Melan-A⁺ (crf meccanismi di immunoevasione del tumore). Studi preliminari condotti mediante immunoistochimica su alcune masse tumorali asportate al momento del sacrificio dei topi dei gruppi sperimentali descritti precedentemente, dimostra che campioni da animali diversi esprimono l'Ag Melan-A a livelli differenti (Fig. 34).

In particolare, tutti e tre i tumori di controllo (topi non trattati) analizzati manifestano una robusta espressione dell'Ag Melan-A, mentre ben 2 su 3 dei tumori appartenenti a topi del gruppo trattato con tre inoculi mostrano al contrario livelli di espressione variabili e nettamente inferiori. Nel caso in cui tali osservazioni dovessero essere allargate ad una casistica più ampia, l'ipotesi di selezione positiva di cellule Melan-A⁺ al sito tumorale verrebbe confermata e darebbe spiegazione della regressione tumorale efficace, ma temporanea.

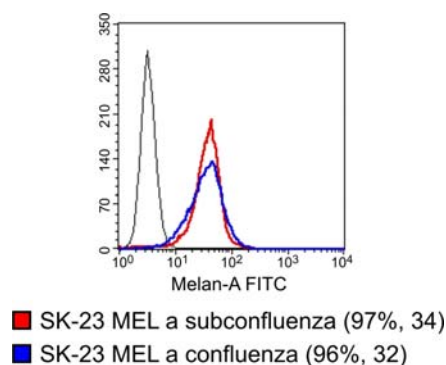


Figura 33. Analisi intracitoplasmatica dell'espressione di Melan-A in cellule della linea SK-23 MEL in coltura.

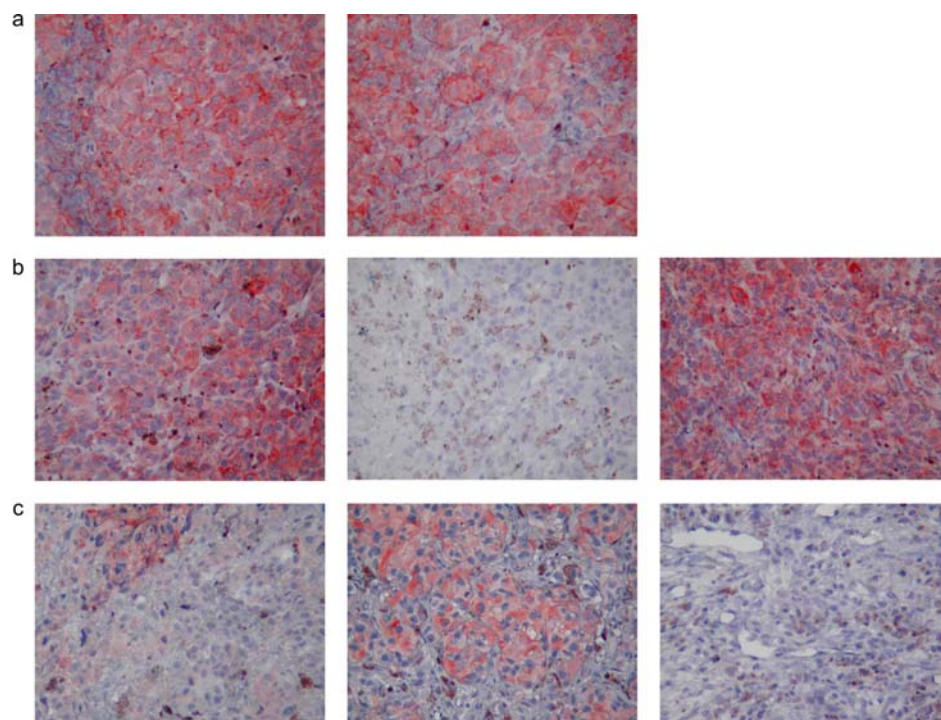


Figura 34. Analisi immunoistochimica per l'espressione dell'Ag Melan-A di sezioni di tumore asportato da topi trattati. In ogni pannello si riportano sezioni di campioni tumorali asportati da alcuni degli animali compresi negli esperimenti di trasferimento adottivo con cellule trasdotte. **(a)** animali non trattati. **(b)** animali trattati con 2 inoculi. **(c)** animali trattati con 3 inoculi.

11. VALUTAZIONE DELLE CAPACITÀ DI *HOMING* NEL

SITO TUMORALE: OTTIMIZZAZIONE DI UN SISTEMA DI *TRACKING* CELLULARE

In linea teorica, l'utilizzo di cellule tumorali e linfociti T fluorescenti o chemiluminescenti permette, mediante strumentazioni per l'imaging ottico,, di seguire lo sviluppo del tumore e l'eventuale risposta ad una terapia di trasferimento cellulare adottivo direttamente *in vivo*, fornendo informazioni critiche circa l'ottimizzazione dei modelli preclinici e la validazione di nuovi protocolli terapeutici. Al fine di visualizzare direttamente che i linfociti esprimenti il TCR transgenico sono in grado di raggiungere la sede neoplastica, i CTL trasdotti sono stati marcati *in vitro* con *cell tracker* fluorescenti con emissione nella banda del NIR, molecole in grado di intercalarsi nella membrana plasmatica o di accumularsi nel citoplasma delle cellule senza alterarne le funzionalità biologiche, e successivamente inoculati *in vivo* in topi SCID immunodeficienti portatori di melanoma SK-23-MEL. Prove preliminari di inoculo s.c. hanno dimostrato la validità di questo approccio. L'efficienza di marcatura dei CTL trasdotti con Qtracker 705 è stata preliminarmente valutata mediante citofluorimetria (94% di positività, dati non mostrati). Si è quindi proceduto alla visualizzazione delle cellule marcate mediante piattaforma eXplore Optix. Lo strumento rileva chiaramente il segnale di fluorescenza proveniente da $1,5 \times 10^6$ CTL-Qtracker in piastra; questa analisi preventiva consente inoltre di individuare la curva TPSF specifica del segnale Qtracker, da utilizzare poi come parametro di confronto per le successive analisi *in vivo*. Dopo inoculo in topi SCID non portatori di tumore si rileva un intenso segnale di fluorescenza proveniente dal sito di inoculo, e le curve TPSF che si ottengono da queste immagini, fino al 4 giorno, risultano sovrapponibili a quella inizialmente ottenuta dall'analisi *in vitro*, confermando che il segnale osservato è specifico delle cellule T marcate con Qtracker 705 (Fig. 35). Dopo il quarto giorno si osservano differenze significative nell'andamento delle curve TPSF, che ci inducono a ritenere il segnale non più specifico.

Tali marcatori consentiranno di verificare e quantificare la co-localizzazione dei linfociti transgenici (rossi) nel contesto di masse neoplastiche indotte dall'inoculo di cellule tumorali stabilmente esprimenti EGFP (verdi). A questo riguardo è necessario segnalare il riscontro di problematiche associate all'assorbimento del segnale fluorescente da parte della melanina, prodotta in quantità particolarmente abbondante nel modello tumorale SK-23 MEL.

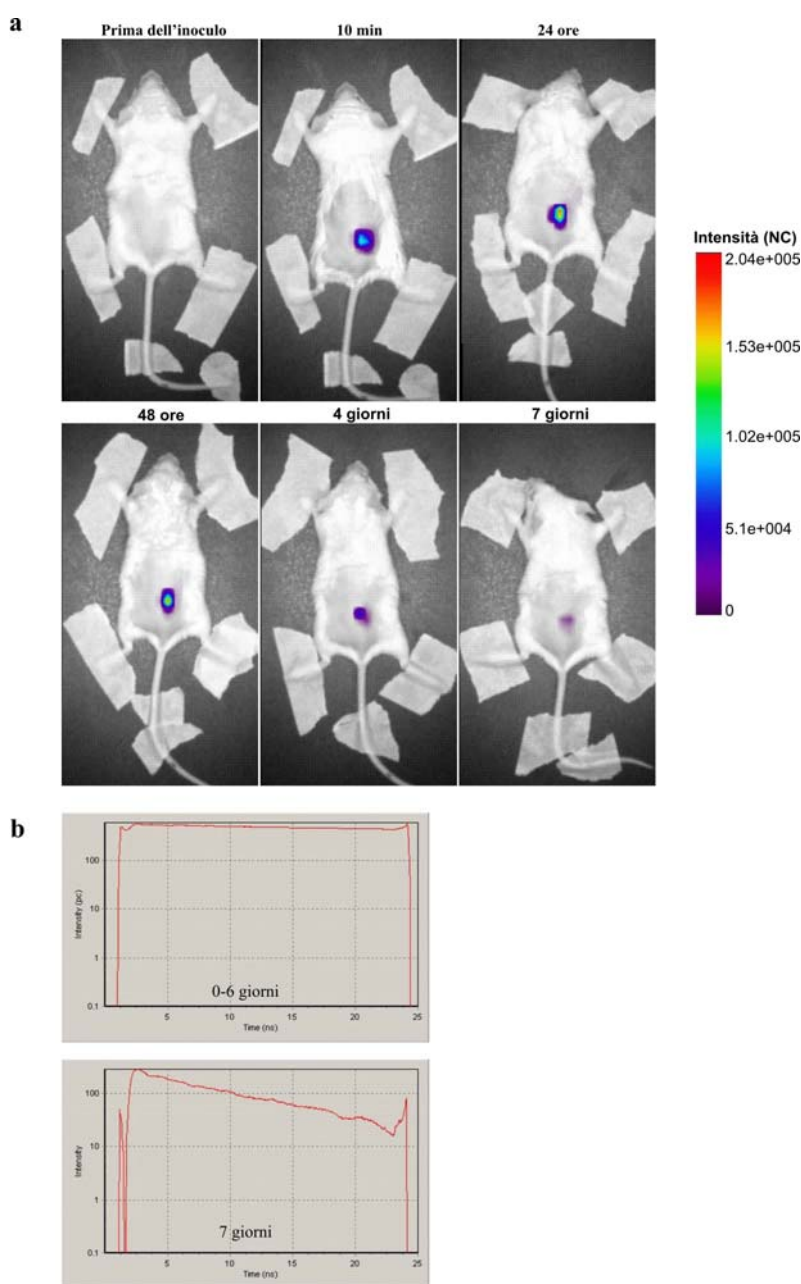


Figura 35. Analisi di fluorescenza di CTL trasdotti, marcati con Qtracker 705, eseguite con lo strumento per *imaging* ottico eXplore Optix. (a) Topi Scid, non portatori di tumore, sono stati inoculati s.c. nel dorso con 10×10^6 cellule T trasdotte e precedentemente marcate con Qtracker, come descritto in *Materiali e Metodi*. Le analisi di fluorescenza *in vivo* sono state effettuate mediante piattaforma eXplore Optix utilizzando il laser 470 nm e il filtro LP 693 nm, ai tempi indicati in ciascun pannello. Ogni immagine riporta il segnale di fluorescenza rilevato e normalizzato per i differenti giorni di acquisizione (NC, conte normalizzate). (b) Curve TPSF relative ai segnali registrati dalle cellule analizzate in piastra e dalle cellule analizzate *in vivo* dal primo al sesto giorno (pannello in alto) e al settimo giorno (pannello in basso). Sulla base dell'intensità del segnale localizzato al sito di inoculo e delle curve TPSF rappresentate al punto b) possiamo concludere che tale segnale è specifico dei linfociti T marcati con QTracker, ovvero che le cellule T persistono al sito di inoculo fino circa al settimo giorno.

12. COMPETIZIONE TRA CATENE

L'introduzione in cellule T di geni codificanti le sequenze complete non modificate delle catene TCR può risultare in un appaiamento delle catene α e β esogene rispettivamente con le catene β e α endogene. La formazione di TCR eterologhi in membrana comporta, a sua volta, la diluizione del numero di TCR transgenici funzionalmente espressi alla superficie cellulare e la generazione di nuove specificità, potenzialmente causa di autoimmunità *in vivo*. Inizialmente, l'ipotetica espressione di complessi TCR ibridi in membrana è stata inferita da analisi citofluorimetriche su differenti linee cellulari trasdotte. Successivamente, l'evidenza sperimentale di appaiamenti omo- o eterologhi è stata fornita mediante l'impiego della tecnologia *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) su linee trasdotte con catene TCR *wild type* o TCR chimeriche.

12.1 Espressione del TCR anti-Melan-A in differenti linee cellulari trasdotte con il vettore bidirezionale

A supporto dell'ipotesi che la competizione tra catene e la formazione di TCR ibridi possano limitare l'espressione di un TCR transgenico, vengono riportati alcuni dati preliminari ottenuti confrontando gli effetti della trasduzione su due linee cellulari T a bassa (Jurkat, 15-35% TCR⁺) ed alta (Molt, ~60% TCR⁺) espressione del TCR endogeno (Fig. 36a). Cellule della linea Jurkat e della linea Molt sono state inizialmente valutate per la suscettibilità all'infezione da parte di vettori lentivirali (vettore pCMV-EGFP) (Fig. 36b), risultando perfettamente equivalenti. Le medesime linee sono state quindi trasdotte con il vettore bidirezionale, utilizzando in ogni prova campioni da un unico stock virale e per diverse prove preparazioni virali a diverso titolo. Tutte le prove di trasduzione condotte hanno evidenziato per la linea Molt livelli inferiori di positività per tetrametro (Fig. 36c).

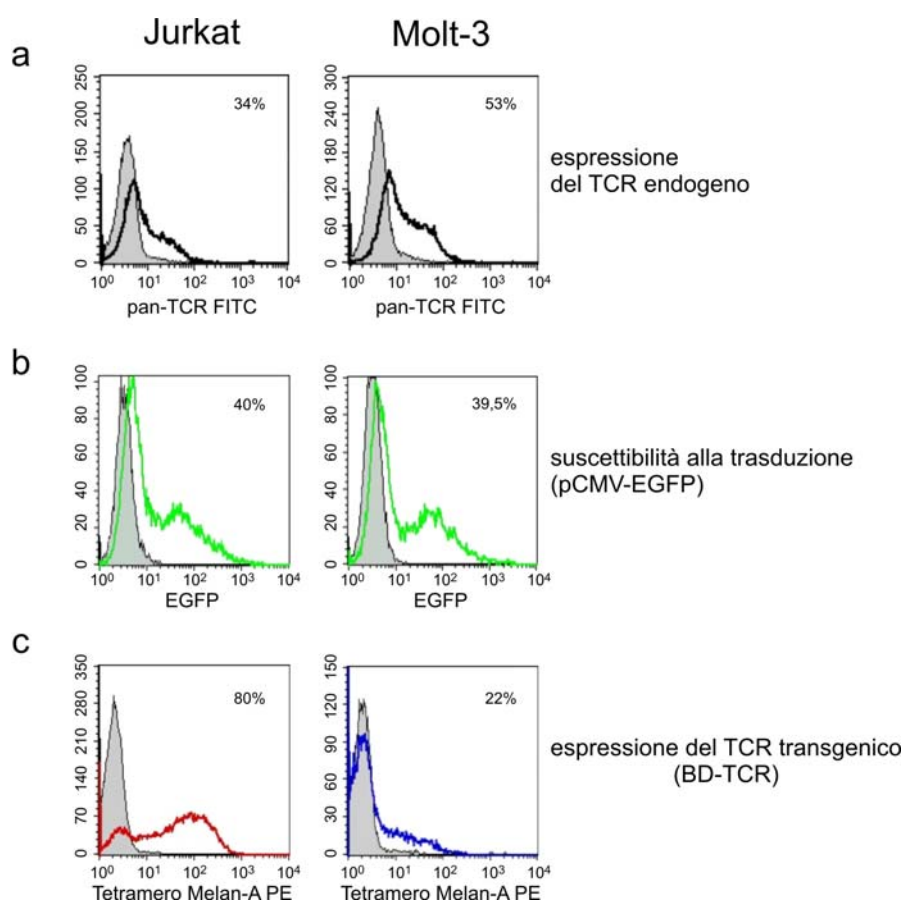


Fig. 36. Analisi citofluorimetriche delle linee melanocitarie Jukat e Molt, *wild type* e trasdotte. (a) Cellule della linea Jurkat e della linea Molt sono state analizzate per l'espressione del TCR fisiologico in membrana dopo marcatura con mAb anti-TCR. I valori percentuali riportati in ogni pannello sono rappresentativi di tre marcature indipendenti. (b) La suscettibilità all'infezione con costrutti lentivirali è comparabile per le due linee, come dimostrato dall'espressione di EGFP a 72 ore dall'infezione di $0,2 \times 10^6$ cellule con 1 mL di preparazione virale standard. (c) Espressione del TCR anti-Melan-A, rilevata mediante marcatura con tetramero specifico a 72 ore dalla trasduzione con costrutti bidirezionali secondo le condizioni descritte al punto (b). All'aumentare dell'espressione di TCR fisiologici in membrana decresce proporzionalmente l'espressione di un TCR introdotto esogenamente.

12.2 Conseguenze del trasferimento genico di $TCR\alpha\beta$ e $TCR\alpha\beta:CD3\zeta$ in un modello cellulare T a doppio TCR

Al fine di verificare in che modo il trasferimento genico di catene $TCR\alpha\beta$ complete e chimeriche $TCR\alpha\beta:CD3\zeta$ ($TCR\alpha\beta:\zeta$) influiscono sugli appaiamenti ibridi in membrana e sulla funzionalità dei TCR endogeni, si è utilizzato un sistema cellulare T a doppio TCR basato su cellule Jurkat. Tale modello è stato generato utilizzando le cellule clonali T J19 già discusse in questa sede (crf figura 15), esprimenti Melan-A/HLA-A2 (MelA/A2) $TCR\alpha 2\beta 14$ e successivamente trasdotte con costrutti retrovirali codificanti $TCR\alpha\beta$ o $TCR\alpha\beta:\zeta$ specifici per MAGE1/HLA-A1 (M1/A1),

gp100/HLA-A2 (gp100/A2) o EBNA4/HLA-A11 (EBNA4/A11) (Fig.37). Ci riferiremo quindi al TCR MelA/A2 della linea clonale Jurkat con primo TCR o TCR endogeno.

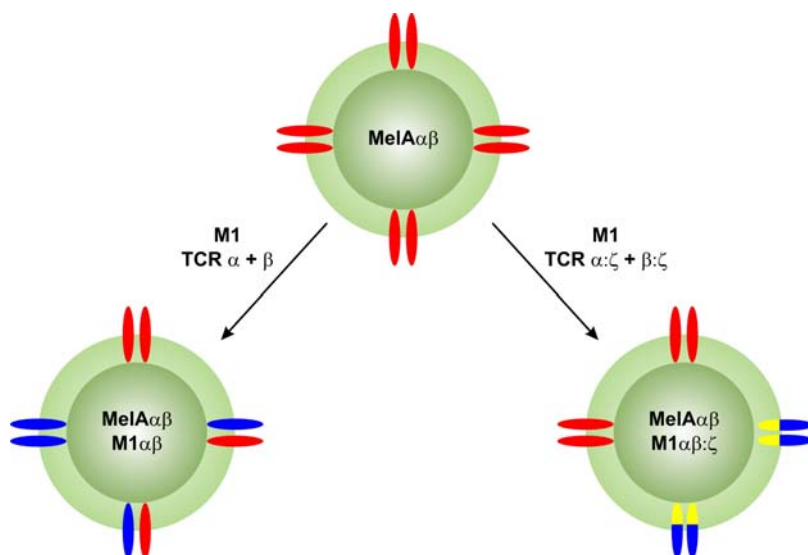


Figura 37. Schema del modello cellulare T Jurkat a doppio TCR. Un clone cellulare T Jurkat esprime il TCR MelA/A2 come primo TCR è stato ingegnerizzato per l'espressione di un secondo TCR con TCR $\alpha + \text{TCR}\beta$ o TCR $\alpha:\zeta + \text{TCR}\beta:\zeta$. Il secondo TCR era specifico per MAGE-A1/HLA-A1 (M1/A1), come indicato in figura, gp100/HLA-A2 o EBNA4/HLA-A11.

In un primo esperimento è stata valutata l'espressione delle catene introdotte esogenamente sulla membrana di cellule T Jurkat MelA/A2 TCR⁺ dopo trasferimento genico o della catena α o della catena β di un secondo TCR. In questo caso, una marcatura citofluorimetrica positiva per le catene α o β codificate dai costrutti retrovirali può dipendere esclusivamente dall'appaiamento con le corrispettive catene del TCR MelA/A2, ossia dalla formazione di eterodimeri. Come ipotizzabile, l'introduzione della catena $\beta 9$ del TCR M1/A1 risulta in un decremento dei livelli di espressione della catena $\beta 14$ del TCR MelA/A2, come risultato della competizione tra le due catene TCR β per la catena $\alpha 2$ endogena disponibile (Fig. 38a). Al contrario, l'introduzione di una singola catena TCR: ζ non comporta l'espressione in superficie di alcuna catena chimerica, né la modulazione negativa dell'espressione della catena endogena TCR $\beta 14$ (Fig. 38b). Ad esempio, la percentuale di cellule positive per MelA/A2 TCR $\alpha\beta$ si riduce di quasi il 50% (le cellule T TCR $\beta 14^+$ passano da 94% a 49%) dopo il trasferimento genico di M1/A1 TCR $\alpha\beta$, ma non è influenzata dal trasferimento di M1/A1 TCR $\alpha\beta:\zeta$. L'analisi citofluorimetrica dopo marcatura con il tetramero specifico per Melan-A conferma che l'espressione del TCR MelA/A2 non è modificata dal trasferimento di geni

TCR $\alpha\beta$:CD3 ζ (Fig. 38c). Queste osservazioni sono estendibili a tutte e tre le specificità testate (Fig. 39).

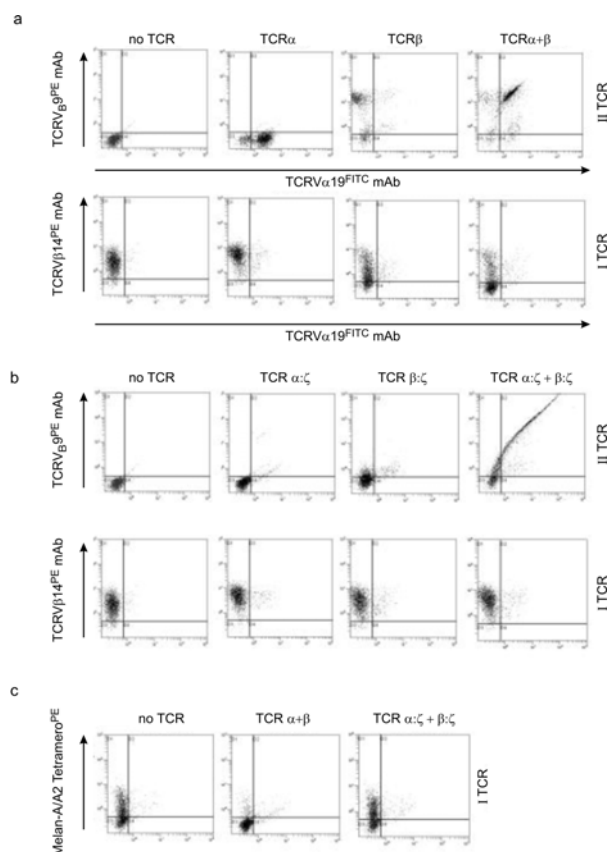


Figura 38. TCR $\alpha\beta$: ζ M1/A1 non si appaiano con TCR $\alpha\beta$ MelA/A2 e si esprimono a livelli elevati sulle cellule T. (a) Cellule clonali T Jurkat esprimenti il TCR $\alpha\beta$ 14 specifico per Melan-A/A2 sono state trasdotte con un secondo TCR α 19 β 9 specifico per MAGE-1/HLA-A1 o con le catene singole TCR α 1 o TCR β 9. I TCR introdotti sono stati quindi analizzati mediante test citofluorimetrici condotti su campioni cellulari marcati con mAb anti-TCR α 19 e -TCR β 9 (pannelli in alto, secondo TCR). L'espressione del TCR anti-Melan-A è stata valutata utilizzando mAb anti TCR β 14 (pannelli in basso, primo TCR). **(b)** Cellule T Jurkat trasdotte come in A), ma impiegando catene TCR α 19 β 9: ζ anti-MAGE-1. L'analisi citofluorimetrica è stata condotta come in A). Le cellule T trasdotte e marcate con i corrispondenti anticorpi anti-TCR α 19 e -TCR β 9 mostrano, in questo caso, un'unica e definita diagonale in dot-plot, indicativa di un preferenziale appaiamento e di una favorita espressione di superficie di TCR $\alpha\beta$: ζ . **(c)** Cellule T Jurkat trasdotte con TCR $\alpha\beta$ o TCR $\alpha\beta$: ζ specifici per M1/A1 sono state monitorate mediante marcatura con il tetramero Melan-A e analisi citofluorimetrica. I dati rappresentano uno di quattro esperimenti indipendenti con risultati simili.

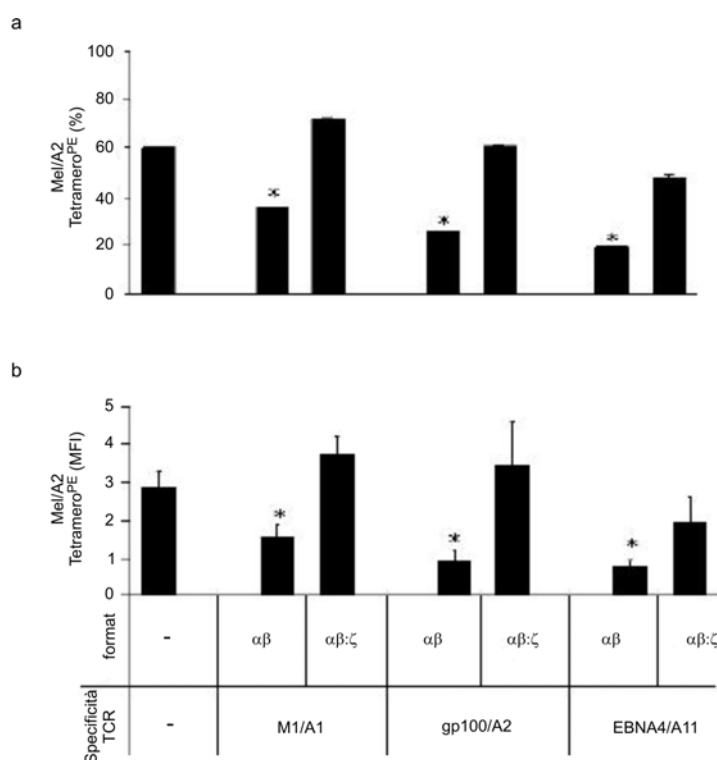


Figura 39. Le catene TCRαβ:ζ non si appaiano con catene TCRαβ, indipendentemente dalla specificità pMHC. Cellule Jurkat Mela2/A2-TCR⁺ sono state trasdotte con TCRαβ o TCRαβ:ζ specifici per gli Ag M1/A1, gp100/A2 o EBNA4/A11 e i livelli di espressione di superficie del TCR Mela/A2 sono stati monitorati mediante analisi citofluorimetrica utilizzando tetrameri Mela/A2. Le barre rappresentano la % (a) e la MFI (b) ± SEM di tre misurazioni indipendenti. * rappresenta un decremento statisticamente significativo rispetto all'espressione di Mela/A2-TCR in cellule T Jurkat non trasdotte con il secondo TCR (prima barra).

12.3 Appaiamento esclusivo tra TCRα:ζ e TCRβ:ζ, ma non tra TCRα e TCRβ in cellule T a doppio TCR

Per poter fornire un'evidenza diretta dell'appaiamento corretto tra le catene TCRα:ζ e TCRβ:ζ, si è utilizzata la tecnica della *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) come misura della distanza molecolare (grado di appaiamento) tra le catene M1A1 TCRα e TCRβ. Cellule Jurkat Mela/A2 TCRαβ⁺ sono state trasdotte con M1/A1 TCRαβ o M1/A1 TCRαβ:ζ e marcate con coppie di mAb coniugati, corrispondenti rispettivamente a transgeni TCR appaiati correttamente (TCRα19 e β9) o TCR appaiati in maniera eterologa (TCRα19 e β14). I valori di FRET relativi a cellule Jurkat esprimenti solamente M1/A1 TCRαβ o TCRαβ:ζ sono stati usati come riferimento di un corretto appaiamento. In un contesto di duplice espressione del TCR, l'appaiamento delle catene M1/A1 TCRαβ è risultato ridotto; al contrario, l'introduzione di TCRαβ:ζ comporta livelli di appaiamento corretto simili al controllo positivo (Fig. 40b). Di conseguenza, la formazione di TCR

eterologhi è evidente solamente tra M1/A1 TCR α e MelA/A1 TCR β , ma non tra M1/A1 TCR α : ζ e MelA/A2 TCR β , cui corrispondono bassi segnali di fondo (Fig. 40a). La prova diretta dell'assenza di appaiamenti TCR α 19: ζ / β 14 conferma l'osservazione che l'espressione di superficie di TCR β 14 non è influenzata dal trasferimento genico di TCR α β : ζ e rappresenta un marcatore sostitutivo di appaiamenti eterologhi tra TCR α 2/ β 9: ζ .

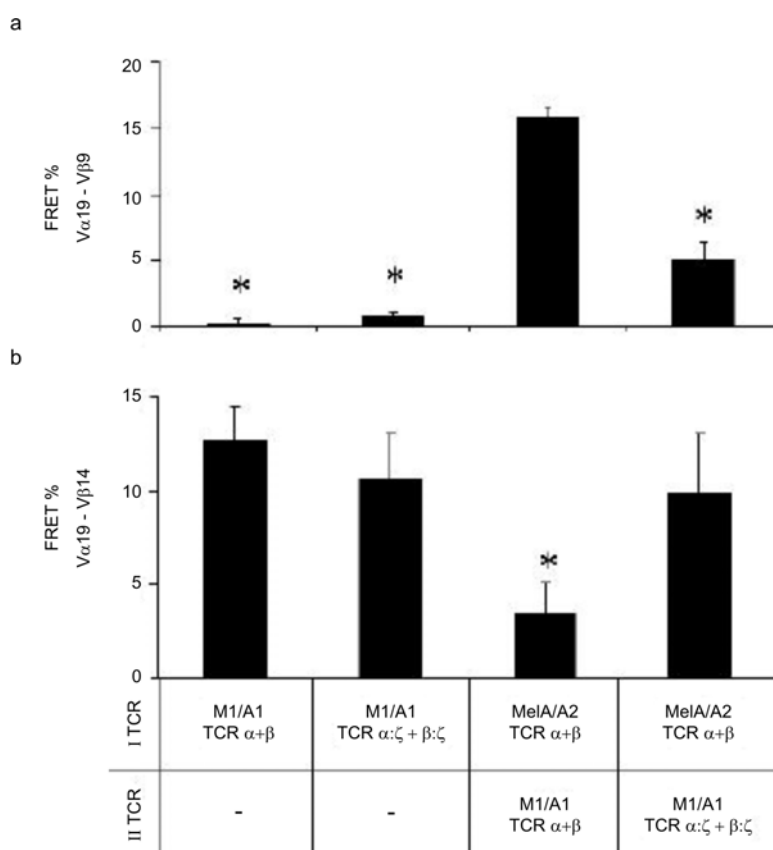


Figura 40. Appaiamento esclusivo tra TCR α : ζ e TCR β : ζ , ma non tra TCR α e TCR β in cellule T a doppio TCR. Cellule T Jurkat esprimenti o M1/A1 TCR $\alpha\beta$ o TCR $\alpha\beta$: ζ , in assenza o in presenza di MelA/A2 TCR $\alpha\beta$, sono state marcate con gli Ab donatore- e accettore-coniugati anti-TCR α e β ed analizzate mediante la tecnologia FRET utilizzando un citofluorimetro a doppio laser FACSCalibur come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. Le cellule T sono state marcate con mAb **(a)** anti-TCR α 19 e anti-TCR β 14, per la misurazione di eterodimeri TCR, o **(b)** anti-TCR α 19 e anti-TCR β 9, per la valutazione di un corretto appaiamento. Questi dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti con risultati simili. *rappresenta un decremento statisticamente significativo rispetto alle cellule Jurkat M1/A1-TCR sulla base del test di Student ($p < 0,01$).

DISCUSSIONE

La vaccinazione anti-tumorale rappresenta attualmente un approccio controverso per la cura del cancro, anche se è ancora oggetto di attiva investigazione preclinica e clinica. Tuttavia, ad oggi, l'immunoterapia attiva non ha ancora soddisfatto le incoraggianti iniziali promesse e nessun vaccino anti-tumorale terapeutico è stato approvato dalla FDA. Se da un lato la valutazione oggettiva degli effetti della vaccinazione anti-tumorale ha evidenziato complessivamente una scarsa efficacia, nonostante gli enormi sforzi fatti e la molteplicità di approcci utilizzati, dall'altro le ragioni del suo fallimento cominciano ad essere chiarite. La presenza di linfociti in grado di riconoscere specificamente gli Ag tumorali è cruciale per il successo dell'immunoterapia, ma la scarsa immunogenicità dei TAA e la tolleranza al *self* limitano, in primo luogo, l'induzione di una consistente espansione di cellule T vaccino-specifiche e quindi tumore-reattive.

L'idea di utilizzare protocolli di trasferimento cellulare adottivo come soluzione alla problematica esposta è sperimentalmente e clinicamente supportata dai brillanti successi ottenuti, sia in profilassi che in terapia, nel controllo delle PTLD associate ad infezione da EBV, che insorgono in pazienti sottoposti a trapianti solidi o di midollo osseo. In questo caso, il trasferimento adottivo di CTL EBV-specifici previene l'insorgenza della neoplasia o addirittura ne induce la regressione, dimostrando che livelli adeguati di linfociti tumore-reattivi possono mediare importanti effetti terapeutici. Ancora, la DLI, in particolare mediata da linfociti diretti contro mHag del ricevente, si è rivelata uno strumento efficace per il trattamento di malattia residua o ricaduta dopo HSCT o per bloccare il rigetto del trapianto. Gli Ag virus-associati e mHag rappresentano Ag fortemente immunogenici e sono in grado di indurre una consistente espansione di cellule T specifiche. Al contrario, i TAA generalmente riscontrati nelle neoplasie più comuni non possiedono caratteristiche analoghe.

Il tentativo di superare l'ostacolo della scarsa immunogenicità dei TAA ha spinto verso la messa a punto di un approccio che combinasse la generazione di elevate quantità di cellule T con il trasferimento di specificità di riconoscimento antigenico con caratteristiche note. Tale approccio consiste nell'ingegnerizzazione dei linfociti T trasferiti nel paziente con un TCR Ag tumorale-specifico. Attualmente, il trasferimento genico del TCR rappresenta un settore di ricerca affascinante e promettente, come dimostrato dalle numerose pubblicazioni apparse negli ultimi anni e dalle prime autorizzazioni per la valutazione in ambito clinico. Essenzialmente, questo approccio

risponderebbe alla richiesta di produrre, a breve termine, grandi quantità di cellule T tumore-specifiche, ottenute in un ambiente non condizionato dal controllo omeostatico di meccanismi soppressivi basati su citochine o cellule T regolatorie. Obiettivamente, questo ambito di ricerca è ancora agli albori e molti studi saranno necessari per ottimizzare la metodica. Ad esempio, è sorprendente che la sperimentazione clinica sia cominciata in assenza di una valida valutazione preclinica su modelli animali. In effetti, rispetto alla grande varietà di studi *in vitro* sul trasferimento del TCR, solamente alcuni hanno validato l'approccio *in vivo* in modelli sperimentali preclinici e hanno dimostrato in questi sistemi un reale beneficio terapeutico del trattamento. Inoltre, molti degli Ag bersaglio impiegati per la sperimentazione preclinica sono di origine virale, ricadono cioè in quella categoria di Ag con caratteristiche favorevoli allo sviluppo di un'efficace risposta immunitaria, senza considerare che i tumori indotti da virus rendono conto complessivamente solo del 10% circa dei tumori umani.

In anni recenti sono emerse importanti differenze nella biologia delle cellule T tra roditori e esseri umani e, ad oggi, nessun modello tumorale murino è stato un buon predittore di una risposta positiva all'immunoterapia nell'uomo²²⁶. I limiti critici dei modelli murini consistono nel fatto che molti Ag tumorali dei topi non sono rappresentativi degli Ag tumorali umani²²⁷ e in fondamentali differenze riguardanti i meccanismi di immunosenescenza²²⁸⁻²³⁰. In particolare, nell'uomo ma non nel topo, vanno accumulandosi cellule T CD8⁺CD28⁻ nel sangue periferico in maniera proporzionale all'età e alla durata delle colture *ex vivo*²³¹. Ab agonisti CD28-specifici sono stati usati per la ristimolazione *ex vivo* delle cellule T umane da impiegare per trasferimento adottivo²³². Tuttavia, per ragioni ancora da chiarire, la somministrazione *in vivo* di tali Ab, sebbene sia ben tollerata dai roditori, risulta particolarmente tossica nell'uomo²³³. Concludendo, solo lo sviluppo di modelli murini umanizzati permetterà di superare queste problematiche²³⁴. Come molti modelli murini singenici hanno già dimostrato²³⁵, un'analisi preclinica accurata consentirebbe di definire le caratteristiche cellulari ottimali in grado di mediare l'efficacia terapeutica dei linfociti T trasferiti adottivamente.

Attualmente sappiamo che l'efficacia delle cellule T anti-tumorali è legata a proprietà che garantiscono i) l'attivazione *in vivo*, ii) l'espansione a livelli sufficienti per distruggere il tumore, iii) la sopravvivenza necessaria ad eradicare tutte le cellule tumorali. A nostro parere, l'approccio di ACT basato sul trasferimento genico del TCR consentirà di disporre di linfociti con proprietà desiderate e di superare molti dei limiti delle attuali strategie, a patto che si operino particolari

scelte riguardanti a) l'identità dell'Ag, b) le caratteristiche del TCR, c) le proprietà della cellula ricevente.

a) La scelta dell'Ag bersaglio. La rilevanza di questo aspetto è sottolineata dai risultati di uno dei recenti studi clinici che impiegano cellule T ingegnerizzate per l'espressione di un CAR anti-tumorale¹²⁶. Il trattamento di pazienti con tumore ovarico mediante cellule dirette contro l'Ag di superficie FR dimostra che questa categoria di Ag può limitare l'efficacia dei linfociti specifici trasferiti adottivamente. Infatti, proteine della superficie cellulare come FR possono liberarsi dalla superficie stessa e alti livelli di Ag libero circolante possono impedire l'attività delle cellule T redirette, bloccandone l'interazione con l'Ag presente sulle cellule tumorali. D'altra parte, molti TCR utilizzati fino ad oggi in studi preclinici e clinici derivano da cloni CTL già disponibili nei laboratori di origine e precedentemente ottenuti per altri scopi. La maggior parte dei TCR studiati e disponibili sono quindi diretti contro Ag melanocitari, dal momento che il melanoma ha rappresentato un modello storico e immunogenico molto importante per lo sviluppo dell'immunoterapia dei tumori. Non va dimenticato però che il melanoma rappresenta solamente circa l'1% delle neoplasie umane. A tal riguardo, un importante avanzamento nel settore dipenderà dallo sviluppo di cloni cellulari T donatori del TCR diretti contro Ag tumorali universali, come survivina, telomerasi, MDM2 e CYP1B1, che sono consistentemente espressi in una grande varietà di tumori²³⁶.

Un altro concetto emergente della biologia del cancro riguarda l'organizzazione gerarchica dei tumori come tessuti anormali che originano e vengono mantenuti da cellule staminali tumorali (CSC) trasformate. CSC sono state isolate da leucemie umane, neuroblastomi, glioblastomi, tumori del polmone e della mammella²³⁷. E' stato dimostrato che DC caricate con cellule di glioma con proprietà staminali-simili sono molto più efficienti delle DC caricate con cellule tumorali proliferanti nell'inibizione della crescita del glioma nel topo²³⁸. In quest'ottica, gli Ag specifici delle CSC rappresenterebbero in assoluto gli Ag ideali contro cui indurre potenti reazioni effettrici. Tali bersagli consentirebbero inoltre di selezionare un ristretto gruppo di TCR con caratteristiche ottimali per il trasferimento genico e la costruzione di una banca TCR caratterizzata dalla restrizione per diversi alleli MHC e specificità per un gruppo ristretto di TAA altamente rilevanti. Inoltre, il raggiungimento di questo obiettivo favorirebbe lo scambio di reagenti e l'analisi comparativa dei dati tra laboratori diversi, facilitando in ultima analisi la realizzazione di trial multicentrici che accelererebbero enormemente la produzione di dati statisticamente significativi.

b) La scelta del TCR da trasferire. Anche questo aspetto ha generato nel tempo pareri contraddittori, soprattutto a causa della disponibilità di cloni CTL già generati e usati principalmente come *proof of the concept* anziché sulla base di un razionale specifico. In particolare, due punti appaiono critici: l'affinità/avidità del TCR e la sua dipendenza dalle molecole costimolatrici CD4/CD8. L'avidità descrive la forza dell'interazione tra la cellula T e il bersaglio antigenico ed è il risultato di diversi fattori, quali i livelli di espressione del TCR, l'affinità di legame TCR/peptide-MHC, l'espressione di molecole di adesione e costimolatorie. L'avidità esercita un fine controllo sulla risposta di una cellula T attivata, influenzando il legame e la segnalazione dei complessi TCR della superficie cellulare ²²⁴. Nell'ambito dell'ACT, si ritiene che cellule T con avidità più elevata siano preferibili al fine di massimizzare i risultati terapeutici. Tuttavia, questa scelta può comportare dei potenziali svantaggi: è stato osservato che i linfociti T caratterizzati da un'avidità molto elevata per l'Ag, in presenza di un carico antigenico e virale crescente, possono andare incontro a fenomeni di iperattivazione e AICD (*apoptosis induced cell death*) seguita da morte cellulare e scomparsa della popolazione effettrice. Quindi, una valida pre-selezione e la conduzione di appropriati esperimenti preclinici aiuterà ad identificare i migliori candidati per il trasferimento.

Ad oggi, molti studi hanno analizzato le implicazioni della presenza di due diversi TCR nella stessa cellula T, tuttavia i dati sono ancora discordanti. In alcuni studi, le cellule T esprimono entrambi i TCR simultaneamente alla superficie ^{144,239}. In altri, solamente un TCR viene espresso, sebbene siano presenti le proteine per entrambi i TCR a livello intracellulare. Un recente studio ha mostrato che, per motivi ancora sconosciuti, un TCR trasdotto può essere efficientemente espresso in alcuni cloni T, ma non in altri ¹¹⁵. Infine, è stato dimostrato che i TCR “forti” in termini di espressione in superficie, possono rimpiazzare TCR “deboli”, risultando nello scambio di specificità antigenica; inoltre, due TCR “forti” possono essere co-espressi. Queste osservazioni rivoluzioneranno presto i criteri di valutazione dei TCR da impiegare per trasferimento adottivo.

Per quanto riguarda la dipendenza del TCR dai co-recettori CD4 e CD8, è stato osservato che tale proprietà può portare una funzionalità piena o solo parziale del TCR dopo il trasferimento, dato che TCR derivati da cellule T CD8⁺ potrebbero essere operativi solo in linfociti T CD8⁺, ma non in CD4⁺. Un fenomeno simile sarà osservabile per il trasferimento di un TCR derivato da una cellula T CD4⁺. A questo proposito, i dati dal nostro laboratorio indicano che dopo il trasferimento LV-mediato di un TCR CD8-dipendente nei PBMC e successiva stimolazione con bersagli cellulari che esprimono solo molecole MHC-I, la popolazione CD4 trasdotta non si espande e va

progressivamente scomparendo. Va tuttavia ricordato che il *pattern* di espressione dei TCR in membrana, in cellule con duplice specificità, è dinamico ed è condizionato dalla ristimolazione specifica. Alla luce di ciò, la coltura dei CTL CD4⁺ anti-EBV con LCL autologhe, anche quando caricate con l'Ag Melan-A, ha probabilmente indotto la selezione progressiva di cellule ad alta espressione del TCR fisiologico e/o la modulazione negativa del TCR esogeno (dati non mostrati). Concludendo, anche in questo caso, un'accurata fase analitica *in vitro* è necessaria per selezionare i migliori candidati TCR prima di procedere con il *cloning* e la trasduzione.

c) La scelta dei vettori virali per il trasferimento. I vettori usati fino ad oggi risultano ancora insufficienti per efficienza di trasduzione/trascrizione e sicurezza. I problemi più importanti riguardano il silenziamento del transgene, responsabile dello spegnimento dell'espressione del TCR, e la bassa efficienza di trascrizione che risulta nella co-esistenza di mRNA per le catene di entrambi i TCR, esogeno ed endogeno. L'appaiamento tra catene fisiologiche e transgeniche comporta l'esposizione in membrana di TCR ibridi, con specificità non determinate, potenzialmente responsabili di reazioni autoimmunitarie. Tuttavia, la conseguenza principale della competizione per l'assemblaggio tra le catene TCR e della formazione degli eterodimeri chimerici, specie in caso di bassa efficienza di trascrizione, è la diluizione dei TCR funzionali in membrana specifici per Ag tumorali e la conseguente insufficiente responsività al tumore da parte delle cellule trasdotte. La disponibilità di un vettore ad alta efficienza di trascrizione consentirebbe la produzione di elevati livelli di mRNA di catene TCR esogene. Questo risulterebbe in un rapporto fra trascritti a favore dell'assemblaggio e dell'espressione dei soli TCR esogeni e a una sorta di spegnimento funzionale dell'espressione del TCR endogeno, risolvendo al contempo i problemi di autoimmunità. Lo sviluppo futuro di nuovi vettori caratterizzati da promotori forti sintetici e ottimizzati supererà probabilmente i limiti attuali.

Il secondo aspetto, la sicurezza, è importante ma deve essere considerato in un contesto di un ragionevole bilanciamento tra rischi e benefici. A causa della bassa efficienza di trasduzione/trascrizione, gli attuali protocolli di trasduzione vengono condotti ad alte MOI, aumentando il rischio di integrazione di copie provirali multiple nel genoma cellulare e quindi di fenomeni di mutagenesi inserzionale e trasformazione neoplastica. Altri due aspetti relativi all'impiego di vettori virali per il trasferimento genico meritano un commento. A causa della scarsa efficienza di tali vettori (sia in termini di trasduzione che di trascrizione), gli attuali protocolli di espansione *in vitro* dei linfociti trasdotti prevedono ripetuti cicli di stimolazione antigenica. Ciò comporta l'alterazione delle caratteristiche fenotipiche e funzionali delle cellule T stesse in coltura e

il conseguente trasferimento di una popolazione non ottimale per il raggiungimento del sito tumorale e la circolazione *in vivo*. Inoltre, fasi ripetute di espansione *in vitro* delle cellule T per uso clinico richiedono particolari competenze tecniche del personale esecutore e ambienti GMP che innalzano pesantemente il costo della terapia e al contempo riducono la diffusione di questi approcci a pochi centri altamente specializzati. Lo sviluppo di vettori altamente efficienti consentirebbe di mettere a punto sistemi di coltura completamente sigillati, analoghi alle sacche per la raccolta del sangue o plasma, in cui cellule T ottenute dai pazienti o da donatori sani per leucaferesi vanno incontro ad una minima attivazione citochinica e ad un solo ciclo di trasduzione con un vettore in grado di bersagliare la maggioranza delle cellule. Nel futuro si auspica che queste procedure preserveranno la componente T vergine e rapporti fisiologici tra le diverse sottopopolazioni T, massimizzando così il potenziale successo terapeutico.

In conclusione, protocolli di manipolazione cellulare ideali dovrebbero considerare condizioni di attivazione cellulare appropriate e la scelta del migliore metodo di trasferimento in dipendenza del transgene, della cellula bersaglio e dello scopo terapeutico, aspetti che, se soddisfatti, possono garantire un futuro di successo per l'ACT.

All'inizio di questo studio, la necessità di disporre di un modello tumorale già sufficientemente analizzato e descritto ha fatto ricadere la nostra scelta sul melanoma. Per questo istotipo tumorale disponevamo di un pannello di cloni CTL la cui specificità e funzionalità erano note. L'Ag Melan-A, espresso nella maggioranza dei pazienti con melanoma^{240,241}, è stato selezionato come bersaglio di una strategia di immunoterapia adottiva basata sul trasferimento del TCR. Il complesso rapporto tra fenotipo cellulare T, funzionalità *in vitro* e attività terapeutica *in vivo* era ancora lontano da una verosimile chiarificazione e la scelta del clone CTL SELA-A 64 come donatore di un TCR ad alta affinità si è essenzialmente fondata sulle proprietà citotossiche del clone stesso nei confronti di cellule melanocitarie. Il trasferimento del TCR a linfociti T riceventi si è successivamente confermato un evento sufficiente a riprodurre le caratteristiche del clone di origine in termini di affinità/avidità e mediazione di risposte effettrici contro cellule melanocitarie. In effetti, un'elevata attività funzionale nelle fasi di espansione e caratterizzazione *ex vivo* dei linfociti si conferma ancora oggi il principale criterio di selezione delle cellule T da trasferire nei pazienti durante gli studi clinici di ACT. A tal proposito, i recenti trial clinici offrono l'opportunità potenziale di correlare l'efficacia terapeutica delle cellule T trasferite, sia non modificate che ingegnerizzate, con altre numerose caratteristiche fenotipiche/funzionali di tali popolazioni. In particolare, i risultati clinici riportati fino ad oggi descrivono con precisione i fattori associati

all'inefficacia terapeutica del trattamento (ad esempio scarsa persistenza *in vivo* delle cellule T trasferite), ma non hanno ancora individuato proprietà uniche che accomunano le cellule trasferite nei vari pazienti responsivi. Ad esempio, la composizione in termini di sottopopolazioni T delle colture ottenute da pazienti trattati con cellule T esprimenti un TCR transgenico anti-Melan-A, varia enormemente tra i pazienti, inclusi i 2 soggetti regressori¹²⁷. Inoltre, uno dei pazienti con regressione persistente è stato inoculato con una popolazione T praticamente priva di cellule Th CD4⁺ specifiche. Le caratteristiche che apparentemente appaiono maggiormente favorevoli per il successo della terapia riguardano la buona espansione *in vivo* dei linfociti T nei pazienti regressori e la ridotta presenza di TCR ibridi sulla superficie delle cellule trasdotte, come dimostrato dalle analisi citofluorimetriche condotte marcando i linfociti con mAb anti-V β e tetramero specifico. In conclusione, è molto probabile che l'attività funzionale *ex vivo* continuerà, con le dovute cautele, ad essere considerata come criterio predittivo dell'attività *in vivo*, fino allo sviluppo di metodologie per la generazione di popolazioni cellulari scarsamente differenziate di tipo *central memory*, indicate come cellule ideali per l'impiego in ACT.

Nonostante siano stati riportati dati sperimentali interessanti circa il trasferimento di TCR in popolazioni staminali, rimaniamo convinti del fatto che le cellule destinatarie al trasferimento genico del TCR debbano essere linfociti T maturi. La prova delle potenzialità terapeutiche del trasferimento adottivo di tali cellule è fornita dal successo clinico nell'ambito delle PTLT. Il limite rappresentato dalla scarsa immunogenicità dei TAA sembra più facilmente affrontabile (ad esempio grazie all'ottimizzazione dell'ingegnerizzazione dei linfociti T per il conferimento di elevata avidità) rispetto ai temibilissimi rischi che la trasduzione di cellule staminali ematopoietiche comporta in termini di sicurezza.

La metodica di espansione proposta in questo studio consente la rapida generazione di una numerosa popolazione di cellule T esprimenti il TCR transgenico: il trasferimento *in vivo* di colture caratterizzate da livelli elevati di specificità (valutata mediante positività per tetramero) aumenta proporzionalmente la probabilità di successo terapeutico, a causa di una ridotta competizione per le citochine disponibili e per le APC²⁴². Permane anche nel nostro caso il problema dell'"invecchiamento" cellulare in coltura, ossia dell'impiego di linfociti T allo stadio di cellule effettrici "late" per esperimenti di trasferimento *in vivo*. La messa a punto di una metodica che prevede la trasduzione mediata da LV rappresenta probabilmente la chiave per la soluzione di questa problematica. In effetti, la stimolazione dei linfociti da trasdurre è ancora necessaria, come dimostrato dai dati ottenuti anche nel nostro laboratorio in esperimenti di infezione di PBMC

attivati o meno. Tuttavia, l'ottimizzazione di vettori di questo tipo, in termini di efficienza di trasduzione e di espressione, consentirà di limitare al massimo l'utilizzo di fattori in coltura responsabili del progressivo differenziamento dei linfociti T. L'impiego di RV non sembra offrire spazio a soluzioni di questo tipo.

Il dato forse più preoccupante emerso dalle sperimentazioni basate sul trasferimento adottivo di CTL in pazienti con tumore è l'insorgenza di varianti antigeniche negative (*escape mutants*) come meccanismo di evasione del tumore, che sembra essere più frequente per i tumori umani che nei modelli tumorali murini singenici^{243,244}. I dati preliminari presentati in questo lavoro sembrano confermare questa possibilità. Tuttavia, è stato descritto per il trasferimento dei CTL nei pazienti con melanoma un effetto simile a quello dei vaccini, ossia l'induzione di uno *spreading* antigenico, nel senso che la risposta anti-tumorale correlerebbe con la comparsa di cloni cellulari T con avidità superiore per l'Ag tumorale e con un repertorio di specificità antigenica più vasto rispetto a quello rilevato al momento dell'infusione. Quindi, è possibile che il problema dell'immuno-evasione determinata dall'espressione di varianti antigeniche negative possa essere affrontato infondendo CTL ingegnerizzati ad esprimere TCR con differenti specificità o diretti contro Ag essenziali per la sopravvivenza delle cellule neoplastiche, come survivina o telomerasi.

Gli ultimi 20 anni di ricerca nel campo dell'immunoterapia ci hanno insegnato che il potenziamento dell'immunità Ag-specifica non è sufficiente ad eradicare il cancro dato che i tumori hanno evoluto delle strategie per eludere la risposta immunitaria. Lo sviluppo di protocolli immunoterapeutici efficaci di seconda generazione consisterà nell'identificare le modalità con cui interferire nella regolazione negativa della risposta immunitaria, fornendo al contempo una stimolazione antigenica adeguata..

ABBREVIAZIONI

Ab: anticorpi
 ACT: terapia cellulare adottiva
 ADCC: citotossicità cellulare Ab-dipendente
 Ag: antigeni
 Allo-SCT: allogeneic stem cell transplantation
 APC: cellule presentanti l'Ag
 CMV: cytomegalovirus
 CNS: sistema nervoso centrale
 CTL: linfociti T citotossici
 DC: cellule dendritiche
 DLI: *donor lymphocyte infusion*
 EBV: virus di Epstein-Barr
 FDA: Food and Drug Administration
 FR: recettore dell' α -folato
 GVHD: *graft versus host disease*
 HIV-1: virus umano dell'immunodeficienza di tipo 1
 HSC: cellule staminali ematopoietiche
 HSV-TK: gene timidina chinasi del virus herpes simplex
 IFN- γ : interferone γ
 Ig: immunoglobuline
 IL: interleuchina
 LAK: *lymphokine-activated killer cells*
 LPS: lipopolisaccaridi
 LTR: ripetizione terminale lunga
 LV: vettori lentivirali
 mAb: anticorpi monoclonali
 mHag: Ag minore di istocompatibilità
 MHC: complesso maggiore di istocompatibilità
 MHC-I: MHC di I classe
 MHC-II: MHC di classe II
 MSC: cellule mieloidi soppressorie
 NKT: cellule T *natural killer*
 NK: cellule *natural killer*
 PB: *peripheral blood*
 PBL: linfociti del sangue periferico
 PBMC: cellule mononucleate di sangue periferico
 PHA: fitoemoagglutinina
 PTLT: *post-transplant lymphoproliferative disease*
 RECIST: *response evaluation criteria in solid tumours*
 RV: vettore retro virale
 SCT: *stem cell transplantation*
 SIN: vettori self-inattivanti
 TAA: Ag tumore-associati
 TBI: *total body irradiation*

TCR: *T-cell receptor*

Th: cellule T helper

TIL: linfociti infiltranti il tumore

TSA: Ag tumore-specifici

VSV-G: proteina G del virus della stomatite vescicolare

WPRES: *woodchuck post-transcriptional regulatory element*

BIBLIOGRAFIA

1. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27 (1970).
2. Swann, J. B. & Smyth, M. J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117, 1137-46 (2007).
3. Shankaran, V. et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-11 (2001).
4. Southam, C. M., Brunschwig, A., Levin, A. G. & Dizon, Q. S. Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. *Cancer* 19, 1743-53 (1966).
5. Galon, J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-4 (2006).
6. Zhang, L. et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 203-13 (2003).
7. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-8 (2002).
8. Zippelius, A. et al. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res* 64, 2865-73 (2004).
9. Bottino, C., Moretta, L. & Moretta, A. NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 298, 175-82 (2006).
10. Pardoll, D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21, 807-39 (2003).
11. Porgador, A., Mandelboim, O., Restifo, N. P. & Strominger, J. L. Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13140-5 (1997).
12. Medema, J. P. et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11515-20 (2001).
13. Smyth, M. J. et al. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18, 1-6 (2003).
14. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6, 715-27 (2006).
15. Khong, H. T. & Restifo, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3, 999-1005 (2002).
16. Rubinstein, N. et al. 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, 241-51 (2004).
17. Uyttenhove, C. et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-74 (2003).
18. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-5 (2002).
19. Curiel, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 117, 1167-74 (2007).
20. Miyara, M. & Sakaguchi, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13, 108-16 (2007).
21. van der Bruggen, P. et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-7 (1991).

22. Therasse, P. et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92, 205-16 (2000).
23. Mocellin, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., Lise, M. & Nitti, D. Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncol* 5, 681-9 (2004).
24. Mocellin, S., Semenzato, G., Mandruzzato, S. & Riccardo Rossi, C. Part II: Vaccines for haematological malignant disorders. *Lancet Oncol* 5, 727-37 (2004).
25. Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D. M. & Chen, L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 7, 95-106 (2007).
26. Rescigno, M., Avogadri, F. & Curigliano, G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 1776, 108-23 (2007).
27. Mitchison, N. A. Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. I. The role of lymph node cells in conferring immunity by adoptive transfer. *J Exp Med* 102, 157-77 (1955).
28. Peng, L. et al. Tumor-induced L-selectinhigh suppressor T cells mediate potent effector T cell blockade and cause failure of otherwise curative adoptive immunotherapy. *J Immunol* 169, 4811-21 (2002).
29. Woo, E. Y. et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61, 4766-72 (2001).
30. June, C. H. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 117, 1204-12 (2007).
31. Hoos, A. et al. A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. *J Immunother* (1997) 30, 1-15 (2007).
32. Kolb, H. J. et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76, 2462-5 (1990).
33. Porter, D. L. et al. Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. *Blood* 95, 1214-21 (2000).
34. Walter, E. A. et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 333, 1038-44 (1995).
35. Cobbold, M. et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* 202, 379-86 (2005).
36. Haque, T. et al. Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet* 360, 436-42 (2002).
37. Rooney, C. M. et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549-55 (1998).
38. Lum, L. G., LeFever, A. V., Treisman, J. S., Garlie, N. K. & Hanson, J. P., Jr. Immune modulation in cancer patients after adoptive transfer of anti-CD3/anti-CD28-costimulated T cells-phase I clinical trial. *J Immunother* (1997) 24, 408-19 (2001).
39. Rosenberg, S. A. et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 313, 1485-92 (1985).
40. Gilboa, E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* 11, 263-70 (1999).
41. Dudley, M. E. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-4 (2002).

42. Powell, D. J., Jr., Dudley, M. E., Hogan, K. A., Wunderlich, J. R. & Rosenberg, S. A. Adoptive transfer of vaccine-induced peripheral blood mononuclear cells to patients with metastatic melanoma following lymphodepletion. *J Immunol* 177, 6527-39 (2006).
43. Mackensen, A. et al. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24, 5060-9 (2006).
44. Yee, C. et al. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med* 192, 1637-44 (2000).
45. Rosenberg, S. A. et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323, 570-8 (1990).
46. Rosenberg, S. A. et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 86, 1159-66 (1994).
47. Wang, L. X. et al. Adoptive immunotherapy of cancer with polyclonal, 108-fold hyperexpanded, CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Transl Med* 2, 41 (2004).
48. June, C. H. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* 117, 1466-76 (2007).
49. Cheever, M. A., Greenberg, P. D. & Fefer, A. Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors. *J Immunol* 125, 711-4 (1980).
50. Dudley, M. E. et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23, 2346-57 (2005).
51. Paulos, C. M. et al. Toll-like receptors in tumor immunotherapy. *Clin Cancer Res* 13, 5280-9 (2007).
52. Liston, A. & Rudensky, A. Y. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 19, 176-85 (2007).
53. Shevach, E. M. et al. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev* 212, 60-73 (2006).
54. Lizee, G., Radvanyi, L. G., Overwijk, W. W. & Hwu, P. Improving antitumor immune responses by circumventing immunoregulatory cells and mechanisms. *Clin Cancer Res* 12, 4794-803 (2006).
55. Lizee, G., Radvanyi, L. G., Overwijk, W. W. & Hwu, P. Immunosuppression in melanoma immunotherapy: potential opportunities for intervention. *Clin Cancer Res* 12, 2359s-2365s (2006).
56. Viguier, M. et al. Foxp3 expressing CD4⁺CD25^(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173, 1444-53 (2004).
57. Wang, R. F., Peng, G. & Wang, H. Y. Regulatory T cells and Toll-like receptors in tumor immunity. *Semin Immunol* 18, 136-42 (2006).
58. Bronte, V., Serafini, P., Apolloni, E. & Zanovello, P. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. *J Immunother* (1997) 24, 431-46 (2001).
59. Rodriguez, P. C. et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 64, 5839-49 (2004).
60. Lou, Y. et al. Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of adoptively transferred T cells in vivo. *Cancer Res* 64, 6783-90 (2004).

61. Poltorak, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-8 (1998).
62. Takeda, K. & Akira, S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* 34, 73-82 (2004).
63. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-3 (1990).
64. Yamamoto, M. et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 1144-50 (2003).
65. Muranski, P. et al. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol* 3, 668-81 (2006).
66. Wrzesinski, C. et al. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells. *J Clin Invest* 117, 492-501 (2007).
67. Wrzesinski, C. & Restifo, N. P. Less is more: lymphodepletion followed by hematopoietic stem cell transplant augments adoptive T-cell-based anti-tumor immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 17, 195-201 (2005).
68. Robbins, P. F. et al. Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol* 173, 7125-30 (2004).
69. Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 666-75 (2003).
70. Dudley, M. E. et al. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24, 363-73 (2001).
71. Yee, C. et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16168-73 (2002).
72. Appay, V. et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8, 379-85 (2002).
73. Papagno, L. et al. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol* 2, E20 (2004).
74. Gattinoni, L. et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest* 115, 1616-26 (2005).
75. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2, 982-7 (2002).
76. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-12 (1999).
77. Wherry, E. J. et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4, 225-34 (2003).
78. Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-19 (2004).
79. Degli Esposti, M. et al. Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem* 278, 15749-57 (2003).
80. Hildeman, D. A., Mitchell, T., Kappler, J. & Marrack, P. T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J Clin Invest* 111, 575-81 (2003).

81. Voehringer, D., Koschella, M. & Pircher, H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). *Blood* 100, 3698-702 (2002).
82. Bertram, M. J. et al. Identification of a gene that reverses the immortal phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor-like genes. *Mol Cell Biol* 19, 1479-85 (1999).
83. Gattinoni, L., Powell, D. J., Jr., Rosenberg, S. A. & Restifo, N. P. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6, 383-93 (2006).
84. Bondanza, A. et al. Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood* 107, 1828-36 (2006).
85. Chen, B. J., Cui, X., Sempowski, G. D., Domen, J. & Chao, N. J. Hematopoietic stem cell dose correlates with the speed of immune reconstitution after stem cell transplantation. *Blood* 103, 4344-52 (2004).
86. Powell, D. J., Jr., Dudley, M. E., Robbins, P. F. & Rosenberg, S. A. 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, 241-50 (2005).
87. Acuto, O. & Michel, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3, 939-51 (2003).
88. Hintzen, R. Q. et al. Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J Immunol* 154, 2612-23 (1995).
89. Zhou, J. et al. Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol* 175, 7046-52 (2005).
90. Hendriks, J. et al. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 1, 433-40 (2000).
91. Hintzen, R. Q., de Jong, R., Lens, S. M. & van Lier, R. A. CD27: marker and mediator of T-cell activation? *Immunol Today* 15, 307-11 (1994).
92. Lake, R. A., O'Hehir, R. E., Verhoef, A. & Lamb, J. R. CD28 mRNA rapidly decays when activated T cells are functionally anergized with specific peptide. *Int Immunol* 5, 461-6 (1993).
93. Gattinoni, L. et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 202, 907-12 (2005).
94. Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. & Lefrancois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, 426-32 (2000).
95. Tuma, R. A. & Pamer, E. G. Homeostasis of naive, effector and memory CD8 T cells. *Curr Opin Immunol* 14, 348-53 (2002).
96. Hollatz, G. et al. T cells for suicide gene therapy: Activation, functionality and clinical relevance. *J Immunol Methods* (2007).
97. Quasim, T. et al. Lower concentrations of carotenoids in the critically ill patient are related to a systemic inflammatory response and increased lipid peroxidation. *Clin Nutr* 22, 459-62 (2003).
98. Helene, M., Lake-Bullock, V., Bryson, J. S., Jennings, C. D. & Kaplan, A. M. Inhibition of graft-versus-host disease. Use of a T cell-controlled suicide gene. *J Immunol* 158, 5079-82 (1997).
99. Bonini, C. et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276, 1719-24 (1997).

100. Ciceri, F. et al. Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 109, 4698-707 (2007).
101. Evans, L. S. et al. Expression of chimeric granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin 2 receptors in human cytotoxic T lymphocyte clones results in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent growth. *Hum Gene Ther* 10, 1941-51 (1999).
102. Hsu, C. et al. Primary human T lymphocytes engineered with a codon-optimized IL-15 gene resist cytokine withdrawal-induced apoptosis and persist long-term in the absence of exogenous cytokine. *J Immunol* 175, 7226-34 (2005).
103. Liu, K. & Rosenberg, S. A. Interleukin-2-independent proliferation of human melanoma-reactive T lymphocytes transduced with an exogenous IL-2 gene is stimulation dependent. *J Immunother* (1997) 26, 190-201 (2003).
104. Topp, M. S. et al. Restoration of CD28 expression in CD28- CD8+ memory effector T cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production. *J Exp Med* 198, 947-55 (2003).
105. Rufer, N. et al. Transfer of the human telomerase reverse transcriptase (TERT) gene into T lymphocytes results in extension of replicative potential. *Blood* 98, 597-603 (2001).
106. Charo, J. et al. Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T-cell survival. *Cancer Res* 65, 2001-8 (2005).
107. Crowley, N. J., Slingluff, C. L., Jr., Darrow, T. L. & Seigler, H. F. Generation of human autologous melanoma-specific cytotoxic T-cells using HLA-A2-matched allogeneic melanomas. *Cancer Res* 50, 492-8 (1990).
108. Mandruzzato, S. et al. Large and dissimilar repertoire of Melan-A/MART-1-specific CTL in metastatic lesions and blood of a melanoma patient. *J Immunol* 169, 4017-24 (2002).
109. Stevens, E. J. et al. Generation of tumor-specific CTLs from melanoma patients by using peripheral blood stimulated with allogeneic melanoma tumor cell lines. Fine specificity and MART-1 melanoma antigen recognition. *J Immunol* 154, 762-71 (1995).
110. Dutoit, V. et al. Degeneracy of antigen recognition as the molecular basis for the high frequency of naive A2/Melan-a peptide multimer(+) CD8(+) T cells in humans. *J Exp Med* 196, 207-16 (2002).
111. Dembic, Z. et al. Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* 320, 232-8 (1986).
112. Clay, T. M. et al. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol* 163, 507-13 (1999).
113. Clay, T. M., Custer, M. C., Spiess, P. J. & Nishimura, M. I. Potential use of T cell receptor genes to modify hematopoietic stem cells for the gene therapy of cancer. *Pathol Oncol Res* 5, 3-15 (1999).
114. Roszkowski, J. J. et al. Simultaneous generation of CD8+ and CD4+ melanoma-reactive T cells by retroviral-mediated transfer of a single T-cell receptor. *Cancer Res* 65, 1570-6 (2005).
115. Heemskerk, M. H. et al. Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J Exp Med* 199, 885-94 (2004).
116. Schaft, N. et al. Peptide fine specificity of anti-glycoprotein 100 CTL is preserved following transfer of engineered TCR alpha beta genes into primary human T lymphocytes. *J Immunol* 170, 2186-94 (2003).
117. Cohen, C. J., Zhao, Y., Zheng, Z., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res* 66, 8878-86 (2006).

118. Cohen, C. J. et al. 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, 5799-808 (2005).
119. Fujio, K. et al. Functional reconstitution of class II MHC-restricted T cell immunity mediated by retroviral transfer of the alpha beta TCR complex. *J Immunol* 165, 528-32 (2000).
120. Stanislawski, T. et al. Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat Immunol* 2, 962-70 (2001).
121. Zhao, Y. et al. High-affinity TCRs generated by phage display provide CD4+ T cells with the ability to recognize and kill tumor cell lines. *J Immunol* 179, 5845-54 (2007).
122. Schumacher, T. N. T-cell-receptor gene therapy. *Nat Rev Immunol* 2, 512-9 (2002).
123. Sadelain, M., Riviere, I. & Brentjens, R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 3, 35-45 (2003).
124. Schumacher, T. N. T-Cell-Receptor gene transfer. *Nat Rev Immunol* 2 (2002).
125. Thistlethwaite, F., Mansoor, W., Gilham, D. E. & Hawkins, R. E. Engineering T-cells with antibody-based chimeric receptors for effective cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 7, 48-55 (2005).
126. Kershaw, M. H. et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 12, 6106-15 (2006).
127. Morgan, R. A. et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314, 126-9 (2006).
128. Xue, S. A. et al. Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells. *Blood* 106, 3062-7 (2005).
129. Kuball, J. et al. 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, 117-29 (2005).
130. Zhao, Y., Zheng, Z., Khong, H. T., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. Transduction of an HLA-DP4-restricted NY-ESO-1-specific TCR into primary human CD4+ lymphocytes. *J Immunother* 29, 398-406 (2006).
131. Kessels, H. W., Wolkers, M. C., van den Boom, M. D., van der Valk, M. A. & Schumacher, T. N. Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat Immunol* 2, 957-61 (2001).
132. Chamoto, K. et al. Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells. *Cancer Res* 64, 386-90 (2004).
133. de Witte, M. A. et al. Targeting self-antigens through allogeneic TCR gene transfer. *Blood* 108, 870-7 (2006).
134. Tahara, H. et al. Reconstitution of CD8+ T cells by retroviral transfer of the TCR alpha beta-chain genes isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte. *J Immunol* 171, 2154-60 (2003).
135. Morgan, R. A. et al. High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. *J Immunol* 171, 3287-95 (2003).
136. Orentas, R. J., Roskopf, S. J., Nolan, G. P. & Nishimura, M. I. Retroviral transduction of a T cell receptor specific for an Epstein-Barr virus-encoded peptide. *Clin Immunol* 98, 220-8 (2001).
137. Tsuji, T. et al. Generation of tumor-specific, HLA class I-restricted human Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T-cell receptor genes. *Blood* 106, 470-6 (2005).

138. Zhao, Y. et al. Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines. *J Immunol* 174, 4415-23 (2005).
139. Ivanov, R., Hol, S., Aarts, T. I., Hagenbeek, A. & Ebeling, S. B. T cell receptor-transgenic primary T cells as a tool for discovery of leukaemia-associated antigens. *Clin Exp Immunol* 143, 78-84 (2006).
140. Kershaw, M. H., Westwood, J. A. & Hwu, P. Dual-specific T cells combine proliferation and antitumor activity. *Nat Biotechnol* 20, 1221-7 (2002).
141. Rossig, C., Bollard, C. M., Nuchtern, J. G., Rooney, C. M. & Brenner, M. K. Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy. *Blood* 99, 2009-16 (2002).
142. Spaapen, R. et al. Rebuilding human leukocyte antigen class II-restricted minor histocompatibility antigen specificity in recall antigen-specific T cells by adoptive T cell receptor transfer: implications for adoptive immunotherapy. *Clin Cancer Res* 13, 4009-15 (2007).
143. Cooper, L. J. et al. Enhanced antilymphoma efficacy of CD19-redirected influenza MP1-specific CTLs by cotransfer of T cells modified to present influenza MP1. *Blood* 105, 1622-31 (2005).
144. Gladow, M., Uckert, W. & Blankenstein, T. Dual T cell receptor T cells with two defined specificities mediate tumor suppression via both receptors. *Eur J Immunol* 34, 1882-91 (2004).
145. Rosenberg, S. A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10, 281-7 (1999).
146. Mineev, B. et al. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4796-801 (2000).
147. Aiuti, A. et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-3 (2002).
148. Hacein-Bey-Abina, S. et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346, 1185-93 (2002).
149. Follenzi, A. et al. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 103, 3700-9 (2004).
150. Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H. & Verma, I. M. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 17, 314-7 (1997).
151. Kordower, J. H. et al. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290, 767-73 (2000).
152. Miyoshi, H., Smith, K. A., Mosier, D. E., Verma, I. M. & Torbett, B. E. Transduction of human CD34⁺ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283, 682-6 (1999).
153. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-7 (1996).
154. Nguyen, T. H. et al. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther* 6, 199-209 (2002).
155. Vigna, E. & Naldini, L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2, 308-16 (2000).

156. Hematti, P. et al. Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS Biol* 2, e423 (2004).
157. Laufs, S. et al. Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood* 101, 2191-8 (2003).
158. Mitchell, R. S. et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2, E234 (2004).
159. Schroder, A. R. et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-9 (2002).
160. Hacein-Bey-Abina, S. et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-9 (2003).
161. Zaiss, A. K., Son, S. & Chang, L. J. RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J Virol* 76, 7209-19 (2002).
162. Chun, T. W. et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-8 (1997).
163. Herndier, B. G. et al. Acquired immunodeficiency syndrome-associated T-cell lymphoma: evidence for human immunodeficiency virus type 1-associated T-cell transformation. *Blood* 79, 1768-74 (1992).
164. Rouzine, I. M. a. C., J.M. Search for the Mechanism of Genetic Variation in the pro Gene of Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology* 73, 8167-8178 (1999).
165. Montini, E. et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* 24, 687-96 (2006).
166. MacGregor, R. R. Clinical protocol. A phase 1 open-label clinical trial of the safety and tolerability of single escalating doses of autologous CD4 T cells transduced with VRX496 in HIV-positive subjects. *Hum Gene Ther* 12, 2028-9 (2001).
167. Lu, X. et al. Safe two-plasmid production for the first clinical lentivirus vector that achieves >99% transduction in primary cells using a one-step protocol. *J Gene Med* 6, 963-73 (2004).
168. Humeau, L. M. et al. Efficient lentiviral vector-mediated control of HIV-1 replication in CD4 lymphocytes from diverse HIV+ infected patients grouped according to CD4 count and viral load. *Mol Ther* 9, 902-13 (2004).
169. Levine, B. L. et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17372-7 (2006).
170. Gao, Z. et al. High levels of transgene expression following transduction of long-term NOD/SCID-repopulating human cells with a modified lentiviral vector. *Stem Cells* 19, 247-59 (2001).
171. Costello, E. et al. Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther* 7, 596-604 (2000).
172. Zhou, X. et al. Lentivirus-mediated gene transfer and expression in established human tumor antigen-specific cytotoxic T cells and primary unstimulated T cells. *Hum Gene Ther* 14, 1089-105 (2003).
173. Lotti, F. et al. Transcriptional targeting of lentiviral vectors by long terminal repeat enhancer replacement. *J Virol* 76, 3996-4007 (2002).
174. Vigna, E. et al. Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. *Mol Ther* 5, 252-61 (2002).
175. Auten, J., Agarwal, M., Chen, J., Sutton, R. & Plavec, I. Effect of scaffold attachment region on transgene expression in retrovirus vector-transduced primary T cells and macrophages. *Hum Gene Ther* 10, 1389-99 (1999).

176. Parkman, R. et al. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Annu Rev Med* 51, 33-47 (2000).
177. Plavec, I. et al. High transdominant RevM10 protein levels are required to inhibit HIV-1 replication in cell lines and primary T cells: implication for gene therapy of AIDS. *Gene Ther* 4, 128-39 (1997).
178. Tong-Starksen SE, W. T., Peterlin BM Differences in transcriptional enhancers of HIV-1 and HIV-2. Response to T cell activation signals. *J Immunol* 15, 4348-54 (1990).
179. Dupre, L. et al. Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol Ther* 10, 903-15 (2004).
180. Cavalieri, S. et al. Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence. *Blood* 102, 497-505 (2003).
181. Stauss, H. J. et al. WT1-specific T cell receptor gene therapy: Improving TCR function in transduced T cells. *Blood Cells Mol Dis* 40, 113-6 (2008).
182. Kohn, D. B. et al. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 4, 775-80 (1998).
183. Ferrand, C. et al. Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes: influence of the transduction/selection process and of ex vivo expansion on the T cell receptor beta chain hypervariable region repertoire. *Hum Gene Ther* 11, 1151-64 (2000).
184. Sauce, D. et al. Retrovirus-mediated gene transfer in polyclonal T cells results in lower apoptosis and enhanced ex vivo cell expansion of CMV-reactive CD8 T cells as compared with EBV-reactive CD8 T cells. *Blood* 102, 1241-8 (2003).
185. Follenzi, A., Ailles, L.E., Bakovic, S., Geuna, M., and Naldini, L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat. Genet.* 25, 217-222 (2000).
186. Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D. & Hope, T. J. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73, 2886-92 (1999).
187. Sinn, P. L., Sauter, S. L. & McCray, P. B., Jr. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther* 12, 1089-98 (2005).
188. Baxevanis, C. N. et al. Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol* 164, 3902-12 (2000).
189. Ho, W. Y., Yee, C. & Greenberg, P. D. Adoptive therapy with CD8(+) T cells: it may get by with a little help from its friends. *J Clin Invest* 110, 1415-7 (2002).
190. Shedlock, D. J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-9 (2003).
191. Surman, D. R., Dudley, M. E., Overwijk, W. W. & Restifo, N. P. Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen. *J Immunol* 164, 562-5 (2000).
192. Rosenberg, S. A. & Dudley, M. E. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14639-45 (2004).
193. Phan, G. Q. et al. Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J Immunother* 26, 349-56 (2003).

194. van der Veken, L. T. et al. Alphabeta T-cell receptor engineered gammadelta T cells mediate effective antileukemic reactivity. *Cancer Res* 66, 3331-7 (2006).
195. Bollard, C. M., Kuehnle, I., Leen, A., Rooney, C. M. & Heslop, H. E. Adoptive immunotherapy for posttransplantation viral infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 10, 143-55 (2004).
196. Berger, C. et al. Pharmacologically regulated Fas-mediated death of adoptively transferred T cells in a nonhuman primate model. *Blood* 103, 1261-9 (2004).
197. Straathof, K. C. et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 105, 4247-54 (2005).
198. Becker, P. S. The current status of gene therapy in autologous transplantation. *Acta Haematol* 114, 188-97 (2005).
199. Bonini, C. et al. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med* 9, 367-9 (2003).
200. Recchia, A. et al. Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1457-62 (2006).
201. Labrecque, N. et al. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15, 71-82 (2001).
202. Viola, A. & Lanzavecchia, A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273, 104-6 (1996).
203. De Smedt, M., Hoebeke, I. & Plum, J. Human bone marrow CD34+ progenitor cells mature to T cells on OP9-DL1 stromal cell line without thymus microenvironment. *Blood Cells Mol Dis* 33, 227-32 (2004).
204. La Motte-Mohs, R. N., Herer, E. & Zuniga-Pflucker, J. C. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* 105, 1431-9 (2005).
205. van Lent, A. U. et al. Functional human antigen-specific T cells produced in vitro using retroviral T cell receptor transfer into hematopoietic progenitors. *J Immunol* 179, 4959-68 (2007).
206. Willemsen, R. A. et al. Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR. *Gene Ther* 7, 1369-77 (2000).
207. Cohen, C. J. et al. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res* 67, 3898-903 (2007).
208. Kuball, J. et al. Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood* 109, 2331-8 (2007).
209. Thomas, S. et al. Targeting the Wilms tumor antigen 1 by TCR gene transfer: TCR variants improve tetramer binding but not the function of gene modified human T cells. *J Immunol* 179, 5803-10 (2007).
210. Dull, T. et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-71 (1998).
211. Yee, J. K., Friedmann, T. & Burns, J. C. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 43 Pt A, 99-112 (1994).
212. Wei, S. *Immunogenetics* (1995).
213. Valmori, D. et al. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160, 1750-8 (1998).
214. Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R. & Mattoussi, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater* 4, 435-46 (2005).

215. Sebestyen, Z. et al. Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry* 48, 124-35 (2002).
216. Szentesi, G. et al. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput Methods Programs Biomed* 75, 201-11 (2004).
217. Amendola, M., Venneri, M.A., Biffi, A., Vigna, E., Naldini, L. Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nat Biotechnol* 23, 108-16 (2005).
218. Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M. & Bujard, H. Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* 23, 3605-6 (1995).
219. Bray, M. et al. A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1256-60 (1994).
220. Lyons, G. E. et al. T-cell receptor tetramer binding or the lack thereof does not necessitate antigen reactivity in T-cell receptor transduced T cells. *Cancer Immunol Immunother* 55, 1142-50 (2006).
221. Alexander-Miller, M. A., Leggatt, G. R. & Berzofsky, J. A. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4102-7 (1996).
222. Zeh, H. J., 3rd, Perry-Lalley, D., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A. & Yang, J. C. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* 162, 989-94 (1999).
223. Laugel, B. et al. Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties. *J Biol Chem* 282, 23799-810 (2007).
224. Snyder, J. T., Alexander-Miller, M. A., Berzofsky, J. A. & Belyakov, I. M. Molecular mechanisms and biological significance of CTL avidity. *Curr HIV Res* 1, 287-94 (2003).
225. Roszkowski, J. J. et al. CD8-independent tumor cell recognition is a property of the T cell receptor and not the T cell. *J Immunol* 170, 2582-9 (2003).
226. Mestas, J. & Hughes, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172, 2731-8 (2004).
227. Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12, 337-65 (1994).
228. Blackburn, E. H., Greider, C. W. & Szostak, J. W. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 12, 1133-8 (2006).
229. Forsyth, N. R., Wright, W. E. & Shay, J. W. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69, 188-97 (2002).
230. Horikawa, I. et al. Differential cis-regulation of human versus mouse TERT gene expression in vivo: identification of a human-specific repressive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18437-42 (2005).
231. Azuma, M., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol* 150, 1147-59 (1993).
232. Laport, G. G. et al. Adoptive transfer of costimulated T cells induces lymphocytosis in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma following CD34+-selected hematopoietic cell transplantation. *Blood* 102, 2004-13 (2003).

233. Suntharalingam, G. et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 355, 1018-28 (2006).
234. Traggiai, E. et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304, 104-7 (2004).
235. Greenberg, P. D. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 49, 281-355 (1991).
236. Gordon, J. D., Vonderheide, R.H. Universal Tumor Antigens as Targets for Immunotherapy. *Cytotherapy* 4, 317-27 (2002).
237. Dontu, G. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17, 1253-70 (2003).
238. Pellegatta, S. et al. Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. *Cancer Res* 66, 10247-52 (2006).
239. Zal, T., Weiss, S., Mellor, A. & Stockinger, B. Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9102-7 (1996).
240. Coulie, P. G. et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180, 35-42 (1994).
241. Kawakami, Y. et al. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6458-62 (1994).
242. Abad, J. D. et al. T-cell receptor gene therapy of established tumors in a murine melanoma model. *J Immunother* (1997) 31, 1-6 (2008).
243. Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J. & Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74, 181-273 (2000).
244. Norell, H. et al. Frequent loss of HLA-A2 expression in metastasizing ovarian carcinomas associated with genomic haplotype loss and HLA-A2-restricted HER-2/neu-specific immunity. *Cancer Res* 66, 6387-94 (2006).

Ringrazio il Prof. Chieco Bianchi, la Prof. Zanovello e il Prof. Amadori
per avermi dato l'opportunità di svolgere l'attività di ricerca presso il Dipartimento di Scienze
Oncologiche e Chirurgiche dell'Università di Padova.

Un ringraziamento particolare al Dott. Antonio Rosato,
per il contributo teorico, professionale e umano a questo progetto