



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA

XXII ciclo

**Ingegnerizzazione di cellule T
con un recettore chimerico anti-hPSMA
per l'immunoterapia adottiva del carcinoma
prostatico**

Direttore della Scuola: *Ch.mo Prof. Paola Zanovello*
Supervisore: *Dott. Antonio Rosato*

Dottoranda: *Dott.ssa Maria Rondina*

A mia mamma

INDICE

RIASSUNTO	7
SUMMARY	9
INTRODUZIONE.....	11
1. SFIDE E PROSPETTIVE DELL'IMMUNOTERAPIA DEL CANCRO	11
2. VACCINAZIONE ANTI-TUMORALE.....	16
3. IMMUNOTERAPIA PASSIVA: ANTICORPI MONOCLONALI E ACT.....	18
3.1 Anticorpi monoclonali	18
3.2 ACT	18
4. INGEGNERIZZAZIONE DELLE CELLULE T.....	20
5. TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR	21
6. CAR: CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR.....	22
6.1 Struttura e caratteristiche	22
6.2 Validazione preclinica	28
6.3 Fattori che influenzano proliferazione, sopravvivenza e persistenza <i>in vivo</i> : quali cellule trasdurre?	29
6.4 Applicazioni cliniche.....	32
6.5 Vantaggi e problematiche.....	33
7. METODI PER L'INGEGNERIZZAZIONE DI CELLULE T: I VETTORI LENTIVIRALI ..	35
7.1 Vettori lentivirali	35
8. IMAGING DI BIOLUMINESCENZA PER IL MONITORAGGIO DELLA SOPRAVVIVENZA E DELL'HOMING DI LINFOCITI T	39
8.1 Imaging di bioluminescenza (BLI).....	39
8.2 T cell <i>tracking</i>	43
SCOPO DELLA TESI.....	45
MATERIALI E METODI	47
1. LINEE CELLULARI	47
1.1 Linee cellulari di carcinoma prostatico.....	47
1.2 Linee leucemiche	47
1.3 293T.....	47
2. PBMC	47
3. GENERAZIONE DEL COSTRUTTO CAR ANTI-hPSMA	48
4. VETTORI.....	49
5. TRASFERIMENTO GENICO DI CAR ANTI-hPSMA MEDIANTE TRASFEZIONE IN CELLULE 293T.....	51
6. WESTERN BLOTTING	51
7. GENERAZIONE DI COSTRUTTI LENTIVIRALI	52
7.1 Clonaggio di minCMV-Luciferasi in vettore lentivirale di trasferimento	52
7.2 Clonaggio di CAR anti-hPSMA in vettori lentivirali di trasferimento.....	53
7.3 Sequenziamento.....	54

8. PRODUZIONE VIRALE	54
8.1 Titolazione delle preparazioni virali	55
9. TRASFERIMENTO GENICO DI CAR ANTI-hPSMA IN CELLULE T JURKAT MEDIANTE TRASDUZIONE CON VETTORI LV	56
10. TRASFERIMENTO GENICO DI CAR ANTI-hPSMA IN LINFOCITI T PRIMARI MEDIANTE TRASDUZIONE CON VETTORI LV	57
11. STIMOLAZIONE ANTIGENICA DEI LINFOCITI T TRASDOTTI CON CAR ANTI- hPSMA	58
12. ANALISI CITOFLUORIMETRICHE	58
12.1 Valutazione dell'espressione di eGFP	58
12.2 Valutazione dell'espressione di superficie del CAR anti-hPSMA	58
12.3 Valutazione dell'espressione di molecole di superficie	59
12.4 Analisi intracitoplasmatica dell'IFN- γ	59
12.5 Valutazione dell'espressione di superficie dell'antigene hPSMA in cellule tumorali	60
13. SAGGIO DI RILASCIO DI ^{51}Cr	61
14. TOPI	61
15. WINN ASSAY	62
16. TRASFERIMENTO ADOTTIVO DEI LINFOCITI TRASDOTTI	62
17. IMAGING OTTICO (Bioluminescenza)	64
17.1 Bioluminescenza (BLI)	64
17.2 IVIS Lumina II	64
17.3 Analisi di cellule esprimenti <i>Firefly Luciferase</i>	64
17.4 Analisi degli animali	65
RISULTATI	67
1. COSTRUZIONE DEL CAR ANTI-hPSMA	67
2. TRASFERIMENTO GENICO DEL CAR ANTI-hPSMA MEDIANTE TRASFEZIONE	67
3. GENERAZIONE DI VETTORI LV BIDIREZIONALI CODIFICANTI IL CAR ANTI- hPSMA E UN GENE REPORTER	69
4. TRASFERIMENTO GENICO DEL CAR ANTI-hPSMA MEDIATO DA VETTORI LENTIVIRALI	70
4.1 Linea Jurkat	70
4.2 PBMC	71
5. GENERAZIONE DI LINFOCITI T TRASDOTTI CON CAR (T-BODY), PER STUDI DI TRASFERIMENTO ADOTTIVO	73
6. CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE E FENOTIPICA DELLA POPOLAZIONE T TRASDOTTA CON CAR	75
6.1 Caratterizzazione funzionale	75
6.2 Caratterizzazione fenotipica	79
7. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA TERAPEUTICA <i>IN VIVO</i>	81
7.1 Winn Assay	81
7.2 Somministrazione loco-regionale e sistemica di T-body-hPSMA	82
8. STUDIO DELLA DISTRIBUZIONE <i>IN VIVO</i> DEI T-BODY MEDIANTE IMAGING DI BIOLUMINESCENZA	86
DISCUSSIONE	89

ABBREVIAZIONI	97
BIBLIOGRAFIA	99
PUBBLICAZIONI.....	109
RINGRAZIAMENTI	111

RIASSUNTO

Nell'ambito dell'immunoterapia cellulare adottiva, l'ingegnerizzazione di linfociti T con recettori diretti contro antigeni tumorali rappresenta un'efficace strategia per generare in tempi rapidi un elevato numero di linfociti tumore-specifici. In alternativa al TCR fisiologico, la cellula T può essere ingegnerizzata con recettori chimerici per l'antigene (CAR) costituiti da un dominio di riconoscimento antigenico (derivato da anticorpi monoclonali) fuso a domini di trasduzione del segnale derivati dal complesso TCR: questo tipo di struttura combina la specificità del riconoscimento anticorpale (MHC-indipendente) con le potenzialità anti-tumorali dei linfociti T.

L'attività di ricerca svolta nel mio corso di Dottorato si è focalizzata sullo sviluppo di un protocollo per la generazione di linfociti T ingegnerizzati con un CAR di seconda generazione (scFv-CD28-CD3 ζ) diretto contro l'antigene hPSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) per il trattamento del carcinoma prostatico.

L'utilizzo di vettori lentivirali (LV) come alternativa ai più diffusi vettori oncoretrovirali, consente di trasdurre in modo efficace cellule T scarsamente differenziate, con positive implicazioni sulla loro funzionalità *in vivo*; in questo studio, inoltre, la presenza nel vettore LV di un promotore bidirezionale recentemente descritto ha permesso l'espressione coordinata del CAR e del gene reporter *Firefly Luciferase* con l'obiettivo di monitorare il destino biologico dei linfociti trasferiti adottivamente *in vivo*, mediante imaging di bioluminescenza (BLI).

La popolazione di PBMC ingegnerizzati con recettore chimerico (T-body) è caratterizzata da un'elevata percentuale di espressione del CAR anti-hPSMA (superiore al 50%), da un fenotipo di memoria e dalla capacità di riconoscere e lisare in modo specifico cellule esprimenti l'antigene. In un modello murino di tumore prostatico sottocutaneo i T-body si sono dimostrati efficaci solo se co-inoculati con cellule tumorali o se inoculati a livello locale, mentre il trasferimento adottivo per via sistemica non ha determinato alcun risultato terapeutico. Il monitoraggio della distribuzione *in vivo* dei linfociti mediante BLI ha indicato come la scarsa capacità di sopravvivenza e di *homing* al sito tumorale possano essere una potenziale causa del fallimento terapeutico.

I risultati positivi ottenuti in questo lavoro, in particolare lo sviluppo di un recettore chimerico anti-hPSMA di seconda generazione, l'utilizzo di vettori LV e la generazione di T-body funzionali *in vitro* e *in vivo*, costituiscono il razionale per ulteriori studi e per future applicazioni cliniche di questo tipo di approccio in pazienti con carcinoma prostatico; rimane tuttavia fondamentale chiarire le dinamiche di ricircolazione e distribuzione delle cellule T con

l'obiettivo di implementarne la capacità di sopravvivere, ricircolare e raggiungere il sito tumorale, fattori indispensabili per mediare l'effettiva regressione della neoplasia.

SUMMARY

The genetic transfer of antigen receptors is a powerful approach to rapidly generate tumor-specific T lymphocytes to be employed in adoptive cell therapy (ACT) protocols. Differently from the physiological T-cell receptor, chimeric antigen receptors (CARs) encompass antigen recognition moieties, mainly derived from immunoglobulin variable regions, and activating domains derived from the TCR complex. This artificial structure combines the effector functions of T lymphocytes with the ability of antibodies to recognize surface antigens with high specificity and independently of antigen processing or MHC-restricted presentation.

During my Ph.D., I developed a second generation CAR containing both TCR and CD28 signalling moieties fused to a scFv targeting the human Prostate Specific Membrane Antigen (hPSMA), to engineer human PBMCs for the immunotherapy of prostate cancer. Instead of the most widely used oncoretroviral vectors we propose lentiviral vectors (LV) as an alternative gene transfer method, because of the ability to efficiently transduce even less activated or nondividing T cells. Moreover, the presence of a synthetic bidirectional promoter in the vector design for the coordinate expression of both CAR and *Firefly Luciferase*, enabled the *in vivo* monitoring of distribution and homing properties of adoptively transferred T cells with bioluminescence imaging (BLI).

The resulting population of CAR-engineered T cells (T-bodies) showed high level of CAR expression (more than 50% of cells), together with a memory phenotype and the ability to efficiently kill PSMA-expressing cells. The *in vivo* transfer in a subcutaneous model of prostate carcinoma demonstrated the T-bodies' anti-tumor efficacy upon local delivery, but highlighted the therapeutic failure of their systemic infusion. Data from BLI revealed the limited persistence of transferred T cells and their inability to efficiently reach the tumor.

Our findings support the feasibility of LV vectors as a valid and safe tool to engineer T cells with chimeric antigen receptors; the anti-tumor efficacy of lymphocytes endowed with second generation CARs constitutes a rationale for further studies and potential clinical application of the approach, but there is still the absolute need to improve persistence, survival and homing properties of infused T cells in order to get positive therapeutic results.

INTRODUZIONE

1. SFIDE E PROSPETTIVE DELL'IMMUNOTERAPIA DEL CANCRO

E' ormai noto che la trasformazione cellulare in senso neoplastico, primo stadio dello sviluppo di un tumore, è determinata da un accumulo di mutazioni che attivano oncogeni e inattivano meccanismi intrinseci o estrinseci soppressivi della crescita cellulare; eventi genetici ed epigenetici sono inoltre responsabili della generazione di un elevato numero di nuovi antigeni (Ag) tumore-associati (TAA) costantemente prodotti da una massa neoplastica in crescita^{1, 2}.

A lungo considerato come semplice spettatore nella battaglia tra segnali pro- e anti-oncogenici, il sistema immunitario è oggi invece ritenuto un giocatore fondamentale nella lunga serie di eventi che porta allo sviluppo di un tumore².

L'idea originaria che il sistema immunitario fosse in grado di proteggere l'organismo dalla comparsa di carcinomi, proposta da Paul Ehrlich nel 1909, trovò conferme sperimentali negli anni '50 del secolo scorso, quando fu chiarito il ruolo critico dell'immunità cellulare nel mediare il rigetto di tumori trapiantati tra ceppi outbred: il meccanismo alla base del rigetto era però imputabile più al riconoscimento di alloantigeni che di specifici antigeni tumorali; fu quindi necessario attendere la disponibilità di ceppi inbred per provare l'esistenza di antigeni tumore-specifici³: questo permise di accettare pienamente l'idea originaria di Ehrlich che fu incorporata prima in un'ipotesi formale (Burnet e Thomas, 1957)⁴ e successivamente nel concetto della "*cancer immunosurveillance*" (Burnet, 1970)^{5, 6}.

Abbandonata poco dopo (per insufficienti prove a favore, in generale determinate dall'utilizzo di modelli sperimentali non adeguati)⁷, la teoria dell'immunosorveglianza è stata infine definitivamente confermata negli anni '90 del secolo scorso, grazie alle scoperte del ruolo dell'IFN- γ ⁸, della perforina⁹⁻¹¹ e all'utilizzo di ceppi murini deficitari di linfociti T, B e cellule T NK (ma con intatti meccanismi di riparo del DNA); le prove sperimentali confermarono in questo caso il ruolo dei linfociti quali cellule capaci di proteggere l'ospite dalla comparsa di tumori sia indotti chimicamente, sia spontanei¹².

Gli studi sull'uomo hanno infine evidenziato una maggiore probabilità di sviluppare neoplasie (di origine virale e non) in pazienti immunocompromessi e la correlazione positiva tra la presenza di linfociti nel tumore e l'aumentata sopravvivenza del paziente in vari tipi di neoplasia (melanoma, mammario, colon, prostata, ovaio, retto).

In conclusione, sono state accettate dalla comunità scientifica l'esistenza e la rilevanza fisiologica della teoria dell'*immunosorveglianza dei tumori*: un sistema immunitario competente

è in grado di riconoscere ed eliminare neoplasie primarie, principalmente grazie all'azione dei linfociti e alla produzione di citochine da parte degli stessi, funzionando quindi come un meccanismo estrinseco di soppressione tumorale^{2, 7}.

Nonostante il sistema immunitario sia capace di rilevare la presenza del tumore e di attuare risposte umorali e cellulari anti-tumoral, lo sviluppo progressivo della neoplasia anche in ospiti immunocompetenti dimostra che, in ultimo, il tumore ha eluso le risposte immunitarie dell'ospite.

Molte sperimentazioni su animali indicano l'esistenza di varianti tumorali insorte in seguito alla perdita di espressione dell'antigene, capaci di evadere la risposta immunitaria: in particolare, tumori sviluppatasi in assenza di un sistema immunitario competente sono più immunogenici (e incapaci di crescere in ospiti immunocompetenti), rispetto a tumori sviluppatasi in ospiti immunocompetenti, che crescono progressivamente se impiantati in animali normali. Ciò suggerisce che l'evoluzione del tumore in ospiti con sistema immunitario competente sia associato alla selezione di cellule scarsamente immunogeniche e/o in grado di sfuggire ai meccanismi effettori immuno-mediati che ne consentirebbero il rigetto.

Queste osservazioni indicano quindi che il sistema immunitario svolge un ruolo molto più complesso di quello finora prospettato: attraverso la pressione immunologica dell'immunosorveglianza esso contribuisce a "modellare" e "scolpire" il tumore in modo continuativo durante lo sviluppo della neoplasia, determinando una sorta di "imprinting" che risulta nella selezione di varianti meno immunogeniche (ridotta espressione/capacità di presentazione antigenica, alterati meccanismi di trasduzione del segnale in risposta ad IFN- γ o altri meccanismi di evasione della risposta immunitaria)⁷.

Alla luce di queste considerazioni il concetto di *immunosurveillance*, seppur corretto, risulta riduttivo nel definire il duplice ruolo del sistema immunitario, non più solamente protettivo, ma anche di "*tumor sculpting*": una nuova teoria è stata quindi proposta per la prima volta da GP Dunn, LJ Old e RD Schreiber nel 2002 con il nome di *immunoediting* del tumore⁷. Si tratta di un processo dinamico che si articola in tre fasi (indicate come le tre "E", Figura 1):

- **Eliminazione**: classico concetto dell'immunosorveglianza, in cui le cellule del sistema immunitario sono in grado di eliminare cellule ai primissimi stadi di trasformazione neoplastica;
- **Equilibrio**: periodo di latenza dopo un'incompleta eliminazione delle cellule tumorali; in questa fase il sistema immunitario seleziona e/o promuove la generazione di varianti cellulari tumorali (grazie anche all'instabilità genetica) con aumentate capacità di sopravvivenza. Questa fase può durare anni;

- **Evasione (*escape*)**: proliferazione incontrollata delle cellule tumorali che hanno superato la pressione immunologica e che determinano lo sviluppo clinico della neoplasia nell'ospite immunocompetente.

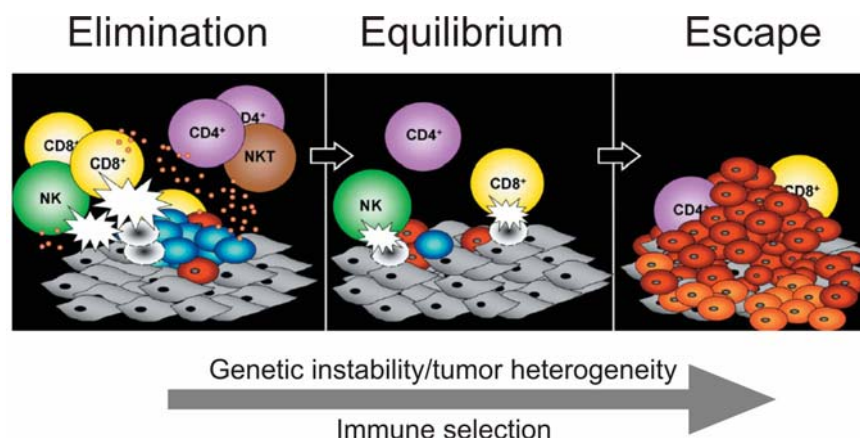


Figura 1. Immunoediting del tumore: le tre fasi. Rappresentazione schematica delle tre fasi del processo di *immunoediting* del tumore. In blu: cellule tumorali, in rosso: cellule tumorali varianti, in grigio: stroma e tessuto sano. Tratto e modificato da⁷.

L'intero processo di *immunoediting* può concludersi con la prima fase nel caso in cui il sistema immunitario riesca ad eradicare completamente la nascente massa neoplastica.

In particolare, il modello proposto da Dunn per la fase di eliminazione (Figura 2) prevede: a) reazione infiammatoria ed inizio della risposta anti-tumorale da parte di componenti dell'immunità innata come cellule natural killer (NK), cellule T NK (NK T), o linfociti T $\gamma\delta$, con produzione di IFN- γ ; b) effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico di IFN- γ sulle cellule tumorali; attivazione della cascata di trasduzione del segnale di IFN- γ con produzione di chemochine angiostatiche; ulteriore reclutamento di cellule NK e macrofagi ed esplicazione della loro azione citocida; parziale distruzione delle cellule tumorali con conseguente cattura da parte di cellule dendritiche (DC) e trasporto ai linfonodi drenanti il tumore; c) presentazione antigenica e sviluppo di popolazioni T CD4⁺ e CD8⁺ specifiche per gli antigeni tumorali; d) *homing* di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ tumore-specifiche al sito tumorale ed eliminazione delle cellule neoplastiche.

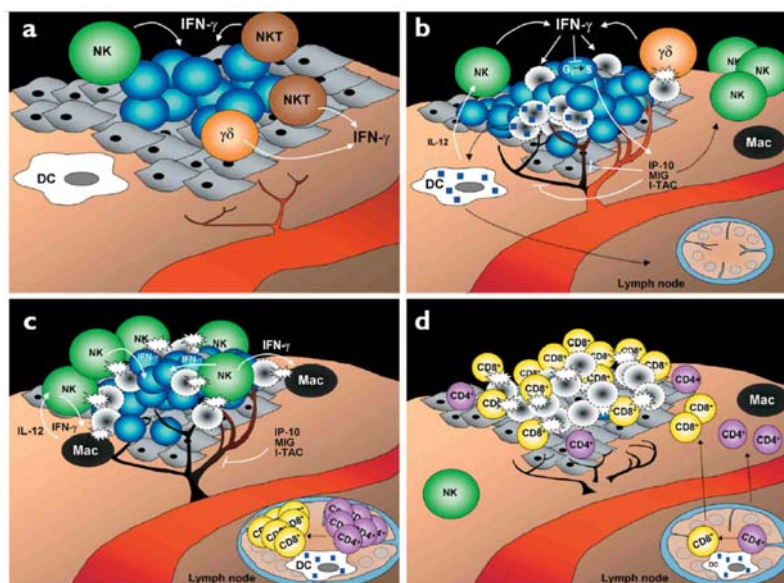


Figura 2. Modello proposto per la fase di eliminazione nel processo di *immunoediting* del tumore. Tratto e modificato da⁷.

Nonostante le sue enormi potenzialità, spesso il sistema immunitario non è in grado di eradicare un tumore, poichè quest'ultimo mette in atto molteplici meccanismi di immuno-evasione, che comprendono l'acquisizione da parte delle cellule tumorali della capacità di resistere all'attacco immunologico e/o alterazioni dei meccanismi effettori del sistema immunitario. Tra i principali meccanismi che riguardano in modo diretto le cellule tumorali si possono individuare: i) perdita di espressione degli antigeni tumorali, specie quelli maggiormente immunogenici; ii) modulazione negativa delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) con conseguente diminuzione della capacità di presentazione antigenica¹³; (iii) insensibilità ad IFN- γ ¹⁴; (iv) *signaling* difettivo dei recettori di morte, che contribuisce alla sopravvivenza della cellula tumorale^{15, 16}; (v) capacità di indurre la morte dei linfociti attraverso la via del recettore di morte Fas¹⁷; (v) iper-espressione di molecole inibitorie dell'attività citotossica dei linfociti (es. PI-9 inattiva Granzima B; molecola costimolatoria B7-H1 che può inibire cellule T effettrici attivate^{18, 19}; (vi) capacità del tumore di modulare la funzione di popolazioni specifiche del sistema immunitario, attraverso fattori o cellule immunosoppressivi. In particolare, il tumore potrebbe alterare la funzionalità di DC non fornendo adeguati segnali di pericolo tali da indurne l'attivazione o potrebbe sopprimerne direttamente l'attività mediante produzione di chemochine e citochine (PG-E2, IL-10, TGF- β)^{20, 21}; il tumore induce anche lo sviluppo di cellule mieloidi soppressorie (MDSC) capaci di sopprimere la proliferazione di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺^{22, 23} e di supportare la crescita neoplastica promuovendo la neovascolarizzazione del tumore²⁴. Esistono infine altre popolazioni di cellule soppressorie della risposta immunitaria, che possono essere reclutate dal tumore (mediante produzione di chemochine): cellule T regolatorie (Treg,

CD4⁺CD25⁺) che potrebbero impedire la generazione e l'attivazione di cellule T effettrici dirette contro cellule tumorali autologhe²⁵⁻²⁷, e le stesse cellule NKT che, pur avendo un ruolo di tipo anti-tumorale, sono anche in grado di inibire l'attività dei linfociti T citotossici (CTL) mediante produzione di IL-13²⁸.

Infine le stesse cellule T Ag-specifiche potrebbero essere funzionalmente deficienti (incapacità di rispondere ad interferoni di tipo I o di rilasciare citochine Th1 necessarie per una risposta anti-tumorale ottimale), incapaci di migrare al sito tumorale e di infiltrare il tumore, anergiche, non responsive o incapaci di differenziare completamente nell'ambiente tumorale²⁹⁻³².

L'espressione di antigeni TAA da parte dei tumori umani (esistono più di 1000 TAA, l'elenco è disponibile nel sito <http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/>), e la consapevolezza che il sistema immunitario ha le potenzialità per riconoscere ed eliminare le cellule tumorali (immunosorveglianza del tumore) costituiscono il razionale dello sviluppo di strategie immunoterapeutiche per mediare la regressione di tumori stabilizzati.

I requisiti per un'immunoterapia di successo sono fondamentalmente tre: i) presenza, nell'ospite, di un numero sufficiente di linfociti tumore-reattivi, ad elevata avidità; ii) capacità dei linfociti di migrare al sito tumorale ed infiltrare la massa neoplastica; iii) capacità dei linfociti di esplicare pienamente la loro funzione effettrice per eliminare le cellule tumorali³³. Un'immunoterapia "ideale" dovrebbe inoltre essere specifica (capace di discriminare tra cellule normali e tumorali), sensibile (capace di eliminare anche una singola cellula tumorale residua), duratura (capace di fornire protezione contro l'eventuale recidiva)³⁴.

Con questi presupposti, varie strategie immunoterapeutiche sono state sperimentate ad oggi sull'uomo e gli approcci utilizzati possono essere classificati in due categorie: immunoterapia attiva (che ha lo scopo di indurre nell'ospite una risposta anti-tumorale) e immunoterapia passiva (che consiste nel trasferimento, nell'ospite, di effettori cellulari o umorali diretti contro cellule tumorali) (Figura 3).

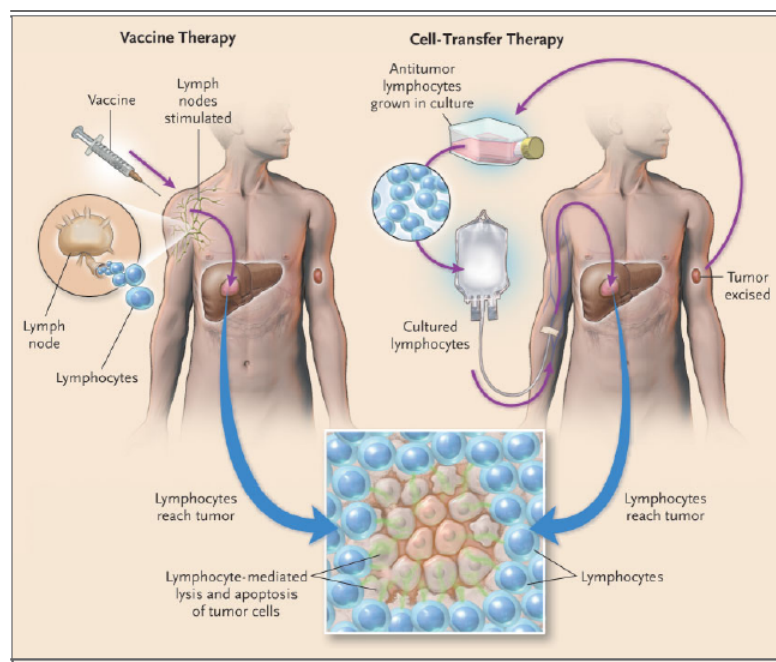


Figura 3. I due approcci di immunoterapia. Tratto da³³.

2. VACCINAZIONE ANTI-TUMORALE

L'immunoterapia attiva si propone di attivare il sistema immunitario del paziente attraverso la somministrazione di vaccini, preventivi o terapeutici; tale strategia ha il principale vantaggio di indurre, nel caso di successo terapeutico, una memoria immunologica duratura in grado di proteggere l'ospite contro malattia residua minima o recidive¹.

In analogia con quanto accade nella vaccinazione contro agenti infettivi, in linea teorica è possibile sviluppare vaccini anti-tumoralis da somministrare ad individui sani con predisposizione allo sviluppo di neoplasie; alcuni studi preclinici hanno dimostrato la fattibilità di questo tipo di approccio, indicando la capacità di un vaccino di impedire la successiva comparsa di neoplasie in animali transgenici³⁵⁻³⁸.

Un elemento chiave nello sviluppo di un vaccino è sicuramente la scelta dell'antigene capace di evocare la risposta immunitaria; sono da preferire gli onco-antigeni (molecole chiave nel processo di crescita neoplastica, raramente downregolati dal tumore), o antigeni di membrana (accessibili ad anticorpi anche in caso di evasione della risposta immunitaria dovuta a modulazione negativa delle molecole MHC).

Nonostante queste considerazioni rendano i vaccini preventivi un'applicazione molto interessante e di potenziale utilità, ci sono una serie di limitazioni associate a questo tipo di strategia: i) scelta dei criteri che permettono di definire un individuo come "a rischio"; ii) certezza che il tumore sviluppato dall'individuo a rischio esprimerà effettivamente l'antigene

verso cui il paziente è stato immunizzato; iii) definizione dei possibili rischi associati alla vaccinazione preventiva (es. autoimmunità). Alla luce di queste considerazioni, la vaccinazione preventiva non è facilmente applicabile per proteggere individui sani da tumori potenzialmente sviluppati, ma realisticamente utilizzabile contro tumori indotti da infezioni virali^{39, 40}.

Diversa è invece la situazione per gli approcci di vaccinazione anti-tumorale terapeutica, che mira a generare una risposta immunitaria in presenza di malattia conclamata; solitamente i vaccini terapeutici sono applicati nei casi di malattia metastatica con lo scopo di rafforzare il sistema immunitario. Esistono vari approcci di vaccinazione contro TAA: cellule tumorali intere irradiate, lisati cellulari, vaccini a subunità, vaccini a DNA, vaccinazione con vettori virali, con DC caricate con peptidi antigenici o lisati cellulari, o trasfettate con DNA e RNA^{34, 41, 42}; l'utilizzo di DC come adiuvante sembra essere, tra tutti gli approcci di vaccinazione, quello più promettente^{43, 44}. L'immunizzazione contro un singolo antigene potrebbe essere rischiosa, considerata la possibile perdita di espressione dello stesso da parte del tumore, fenomeno questo che vanificherebbe la strategia immunoterapeutica: protocolli di vaccinazione basati sull'utilizzo di cellule tumorali intere (autologhe o allogeniche) potrebbero avere, in linea teorica, un certo beneficio in termini di risposta clinica⁴⁵.

L'utilizzo di diversi approcci di vaccinazione è in corso di sperimentazione in vari studi clinici di fase I, II e III per casi di malattia metastatica (un elenco è consultabile al sito <http://www.cancer.gov> o <http://www.cancerhelp.org.uk>), ma i risultati sono stati sino ad ora poco incoraggianti: nonostante il vaccino anti-tumorale sia effettivamente in grado di indurre l'espansione di una popolazione di linfociti T Ag-tumorale-specifici, tali cellule sono probabilmente in numero insufficiente, caratterizzate da scarsa avidità o anergiche, quindi incapaci di mediare una risposta clinica oggettiva; altri fattori che possono determinare il fallimento/successo di questo approccio sono rappresentati dalla scelta dell'antigene contro cui immunizzare, dal protocollo di vaccinazione, dalla scelta degli adiuvanti e dalla via di somministrazione utilizzata.

Vari sono purtroppo gli esempi di fallimento dei protocolli di vaccinazione anti-tumorale: nel 2004 la frequenza complessiva di risposte cliniche oggettive (sulla base di una classificazione convenzionale) nei trial clinici di vaccinazione (per un totale di 1306 pazienti coinvolti) era del 3,3%^{33, 46}; una review del 2005 riporta una risposta clinica inferiore al 10% in pazienti (più di 700) con melanoma⁴⁴; anche l'utilizzo di cellule tumorali intere non ha dimostrato effetti terapeutici significativi^{47, 48}.

La scarsa efficacia terapeutica della vaccinazione anti-tumorale in casi di tumore stabilizzato è in qualche modo controbalanciata dai benefici nei casi di carico tumorale limitato⁴⁹ o per i protocolli di vaccinazione anti-idiotipo nei casi di linfoma a cellule B o linfomi di Hodgkin^{50, 51}. Complessivamente, tuttavia, le basse frequenze di successo e la conoscenza dei numerosi meccanismi di immunoevasione attuati dal tumore impongono una rivalutazione dell'immunoterapia (in realtà non solo attiva), per arrivare a protocolli terapeutici di "seconda generazione", caratterizzati dalla combinazione di diverse strategie terapeutiche, che intervengono sia sul sistema immunitario, che sull'ospite. Gli obiettivi principali sono rappresentati dal potenziamento dell'immunità tumore-specifica, dall'aumentato reclutamento di cellule effettrici nel sito tumorale e dal tentativo di bloccare o limitare i meccanismi di immunoevasione tumorale^{1, 45}.

3. IMMUNOTERAPIA PASSIVA: ANTICORPI MONOCLONALI E ACT

L'immunoterapia passiva si basa sul trasferimento, nel paziente neoplastico, di immunomodulatori (citochine comprese), anticorpi tumore-specifici o cellule del sistema immunitario attivate *ex vivo*¹.

3.1 Anticorpi monoclonali

Anche se generalmente non associate allo sviluppo di una memoria immunologica, fino ad oggi le terapie basate sul trasferimento di anticorpi monoclonali (mAb) diretti contro antigeni tumorali si sono dimostrate più efficaci di altre strategie terapeutiche, portando alla completa regressione del tumore in una percentuale significativa di individui trattati⁵². Un'alternativa all'utilizzo di mAb Ag-specifici è rappresentata dagli anticorpi anti-idiotipo; infine gli anticorpi possono essere utilizzati come sistemi di *delivery* per veicolare in modo specifico al tumore molecole radioattive, farmaci chemioterapici o tossine.

3.2 ACT

L'altro approccio di immunoterapia passiva, ossia il trasferimento adottivo di cellule T (Adoptive Cell Therapy, ACT), consiste nell'espansione *ex vivo* di linfociti T tumore-specifici con successiva infusione nel paziente neoplastico. I vantaggi di questo tipo di approccio sono rappresentati dalla possibilità di espandere ed attivare *ex vivo* (in assenza dei potenziali fattori immunosoppressivi del microambiente tumorale) una popolazione di linfociti tumore-specifici, trasferendo poi un elevato numero di cellule altamente avidi, capaci di raggiungere il sito tumorale e di esplicare la loro funzione effettrice; l'infusione in un paziente di un elevato

numero di cellule T tumore-specifiche permetterebbe, in linea teorica, un aumento di potenzialità della risposta immunitaria tale da eradicare una neoplasia stabilizzata⁴⁵. Risulta altrettanto importante un intervento sull'ospite prima del trasferimento di cellule autologhe, in termini di eliminazione di componenti immunosoppressive come le cellule Treg³³.

Il razionale del trasferimento adottivo di cellule T è rappresentato dalla possibilità di rompere la tolleranza immunitaria verso il tumore utilizzando linfociti T autologhi stimolati ed espansi *ex vivo*, oppure popolazioni T allogeniche. Più recentemente, infine, sono stati proposti approcci alternativi all'utilizzo di cellule T endogene: le cellule T possono essere ingegnerizzate per ottenere un'attività anti-tumorale potenziata.

Infusione di cellule T autologhe

La maggior parte degli studi clinici di terapia adottiva ha utilizzato cellule T autologhe del paziente, isolate, espanse *in vitro* e successivamente reinfuse; l'efficacia di questo tipo di approccio è stata dimostrata in pazienti affetti da melanoma metastatico ricevanti linfociti T citotossici MART-1- specifici, isolati ed espansi *in vitro*⁵³.

La necessità di numerose replicazioni cellulari *ex vivo* per ottenere un elevato numero di cellule T da reinfondere determina il progressivo differenziamento delle cellule stesse verso un fenotipo effettore, caratterizzato da una minor capacità proliferativa e di sopravvivenza *in vivo*^{54, 55}, fattori che limitano la capacità delle cellule trasferite di eradicare la neoplasia. E' stata inoltre dimostrata la necessità di trasferire popolazioni policlonali per ottenere migliori risultati terapeutici: la presenza di linfociti T *helper*, infatti, consente una maggiore espansione della popolazione CD8⁺ e l'acquisizione di memoria immunologica^{56, 57}.

I linfociti tumore-specifici possono essere isolati i) dal sangue periferico del paziente ed espansi in modo Ag-specifico mediante stimolazione *in vitro* con DC presentanti l'antigene di interesse⁴⁵; è possibile in questi casi immunizzare il paziente per aumentare *in vivo* il numero di linfociti tumore-specifici altamente avidi da isolare ed espandere; ii) dai linfonodi drenanti il tumore o dalla massa tumorale (TIL, Tumor Infiltrating Lymphocytes).

I primi tentativi di impiego di TIL stimolati *ex vivo* hanno dato risultati poco incoraggianti, probabilmente a causa della scarsa capacità effettrice dei linfociti e della diminuita capacità proliferativa dopo ripetute stimolazioni *in vitro*. Più recentemente, è stata però dimostrata l'implementazione dei protocolli di ACT da parte di regimi di preconditionamento dell'ospite: la chemioterapia sistemica linfodepletante causa la rimozione di cellule soppressive (come Treg e MDSC) e di *cytokine sinks* (ossia di cellule del comparto linfoide che "consumano" citochine) con conseguente aumentata espansione e persistenza delle cellule T trasferite⁵⁸ e risultati terapeutici positivi. Il trattamento con TIL autologhi, dopo regime di chemioterapia

linfodepletante non mieloablativa, ha prodotto il 51% di risposte cliniche in 35 pazienti affetti da melanoma metastatico⁵⁹.

Infusione di cellule T allogeniche

Il trasferimento allogenico di cellule T può indurre la regressione di alcuni tumori solidi⁶⁰ e curare varie neoplasie di tipo ematologico; in particolare la DLI (Donor Lymphocyte Infusion) è la terapia più efficace in pazienti leucemici con ricaduta dopo trapianto di cellule staminali allogeniche⁶¹⁻⁶⁴. Il meccanismo alla base di questo successo sta verosimilmente nella reazione *graft-versus-leukemia/lymphoma* o *graft-versus-tumor* causata dai linfociti T allogenici⁶⁵.

Altre importanti dimostrazioni di efficacia clinica di protocolli di ACT sono rappresentate dal trasferimento adottivo di cellule T specifiche per il virus di Epstein-Barr (EBV) per la terapia dei disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) in pazienti immunocompromessi, in cui l'infusione di linfociti T EBV-specifici può trattare e addirittura prevenire lo sviluppo di PTLD^{66, 67}, e dall'utilizzo di CTL specifici per CMV (Citomegalovirus), per il trattamento di pazienti non rispondenti a chemioterapia antivirale⁶⁸.

4. INGEGNERIZZAZIONE DELLE CELLULE T

Per molti tipi di tumore (tra cui quello mammario, prostatico ed ovarico) i vantaggi dell'ACT sono tuttavia limitati da alcuni fattori: l'incapacità di isolare cellule T autologhe tumore-reattive da alcuni istotipi neoplastici, la difficoltà di ottenere in coltura, in tempi clinicamente utili, un'elevata quantità di cellule da reinfondere nel paziente, la scarsa persistenza delle cellule T dopo trasferimento adottivo e la presenza di fattori immunosoppressivi nel microambiente tumorale⁶⁹. Queste problematiche possono essere superate modificando le cellule originarie del paziente per generare cellule T dalle proprietà implementate. La "riprogrammazione genetica" delle cellule T può avere molteplici obiettivi: potenziare il riconoscimento antigenico e la funzione citotossica, incrementare la sopravvivenza cellulare, la capacità proliferativa e di espansione, generare linfociti di memoria e limitare fenomeni come morte, anergia e soppressione della risposta immunitaria. La modificazione genetica delle cellule T può inoltre essere utilizzata per studiarne la biodistribuzione *in vivo* o inserire meccanismi di controllo che ne permettano l'eliminazione se necessario⁷⁰. L'interesse nell'ingegnerizzazione dei linfociti è aumentata negli ultimi decenni in modo significativo, sostenuta dall'idea che la modificazione di linfociti autologhi può generare cellule dalle capacità implementate, più potenti e con una finestra terapeutica più ampia rispetto al trasferimento di cellule T allogeniche⁷¹.

L'ingegnerizzazione dei linfociti T può aumentarne la funzionalità attraverso diversi meccanismi, quali l'espressione di un recettore anti-tumorale, l'aumento della sopravvivenza e l'espressione di molecole suicida.

a) *Generazione di cellule con specificità anti-tumorale.* Linfociti T possono essere ridirezionati contro determinati antigeni tumorali mediante trasferimento genico di un TCR (T Cell Receptor) fisiologico (eterodimero $\alpha\beta$ del complesso TCR) o di un recettore chimerico (CAR, Chimeric Antigen Receptor)⁷².

b) *Potenziamento della sopravvivenza cellulare.* Un limite dell'ACT è la ridotta capacità dei linfociti T trasferiti di sopravvivere nell'ospite in assenza di cellule T *helper* o di citochine; l'ingegnerizzazione con molecole costimolatorie⁷³, citochine⁷⁴⁻⁷⁶, molecole anti-apoptotiche⁷⁷ o con la subunità catalitica dell'enzima telomerasi⁷⁸ è una possibile strategia per potenziare la capacità di sopravvivenza.

c) *Espressione di molecole suicida.* Una terapia di successo dovrebbe garantire la quasi totale assenza di effetti collaterali; il trasferimento di linfociti T allogenici e la DLI possono avere come esito una severa reazione *graft-versus-host* ed è quindi necessario disporre di una modalità di controllo sulle cellule infuse nel paziente. L'ingegnerizzazione con molecole suicida (come HSV-Tk, *herpes simplex virus thymidine kinase* o Caspasi 9) non altera la funzionalità anti-tumorale delle cellule trasferite, ma consente di eliminarle qualora gli effetti tossici della terapia mettano a repentaglio la vita stessa del paziente^{76, 79, 80}. Un recente trial clinico di fase II ha confermato ed ampliato dati precedenti, dimostrando ulteriormente la sicurezza e realizzabilità del trasferimento adottivo di cellule T del donatore trasdotte con geni di suicidio⁸¹.

5. TRASFERIMENTO GENICO DEL TCR

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 a formare il complesso TCR/CD3; la molecola CD3 è responsabile dell'assemblaggio del complesso e della trasduzione intracellulare del segnale.

Poiché la specificità di un linfocita T dipende dal suo TCR, è possibile ridirezionare una qualsiasi altra cellula T verso un determinato TAA mediante trasferimento genico dei geni delle catene α e β di un TCR specifico per quell'antigene⁸²⁻⁸⁴.

Nel 1990 il gruppo di Rosenberg fu il primo ad utilizzare linfociti ingegnerizzati ed esprimenti il gene della neomicina fosfotransferasi allo scopo di valutare l'infiltrazione nel tumore dopo

trasferimento adottivo; l'assenza di effetti tossici fu sicuramente un aspetto positivo, ma la scoperta che ad una settimana dal trasferimento soltanto lo 0,01% dei linfociti persisteva in circolo impose ulteriori studi per implementare l'efficacia di questo tipo di approccio⁸⁵.

Il trasferimento genico di TCR mediante vettori retrovirali è stato ampiamente studiato e documentato in modelli preclinici; i primi studi clinici hanno dato risultati incoraggianti, dimostrando la sicurezza, l'applicabilità e la capacità di questo tipo di approccio di mediare la regressione del tumore^{86, 87}.

Sebbene possibile, sicuro e terapeuticamente efficace, il trasferimento genico di TCR ad elevata affinità per antigeni tumorali (mediante vettori retrovirali o lentivirali) presenta alcuni limiti e problematiche. La capacità di isolare cellule T endogene ad elevata affinità verso antigeni tumorali da cui estrarre i geni per il TCR è limitata ad un ristretto numero di tumori; esiste inoltre la possibilità che le catene α e β esogene si appaino rispettivamente con le catene β e α endogene, creando TCR ibridi in membrana a specificità non nota e diminuendo in tal modo il numero di TCR transgenici funzionalmente espressi sulla superficie cellulare. Infine questo tipo di approccio è limitato ad individui con un determinato HLA (Human Leukocyte Antigen) e perde di efficacia in seguito a modulazione negativa dei complessi MHC-peptide. Tutti questi fattori hanno portato allo sviluppo di strategie alternative di ingegnerizzazione di linfociti, utilizzando recettori chimerici^{69, 88}.

6. CAR: CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

6.1 Struttura e caratteristiche

Il CAR (indicato anche come ChTCR, chimeric TCR) è un recettore artificiale costituito da un dominio extracellulare di riconoscimento/legame dell'antigene, fuso ad un dominio intracellulare di trasduzione del segnale, necessario per l'attivazione della cellula T (Figura 4)⁸⁹.

I T-body, cellule T esprimenti recettori chimerici, sono quindi caratterizzati dalla capacità di riconoscere e legare antigeni superficiali con l'elevata affinità e specificità di un anticorpo, mantenendo la capacità di *homing*, di penetrazione tissutale e la potente funzione effettrice anti-tumorale tipica dei linfociti T⁷⁰.

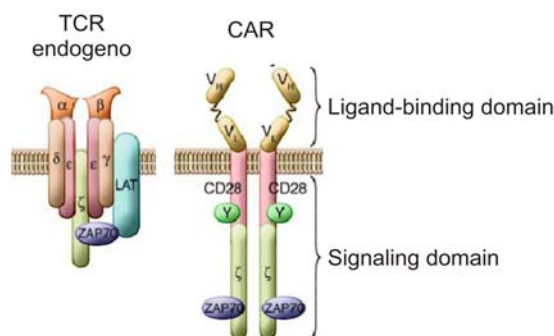


Figura 4. Strutture del TCR e del CAR a confronto. Il CAR è costituito da un dominio extracellulare di legame all'antigene, in genere derivato dal frammento scFv di anticorpi, fuso a moduli intracellulari di trasduzione del segnale, che derivano da proteine del *signaling* T-cellulare. Tratto e modificato da⁹⁰.

La prima configurazione di recettore chimerico era composta dalle due catene del TCR, in cui le regioni variabili $V\alpha$ e $V\beta$ del TCR erano sostituite con le regioni variabili V_H e V_L delle catene pesanti e leggere di un anticorpo, generando così due diverse combinazioni di catene chimeriche ($C\alpha V_H/C\beta V_L$ o $C\alpha V_L/C\beta V_H$)^{91, 92}; la trasfezione di cellule T dimostrò l'effettiva formazione in membrana di un complesso TCRchimerico/CD3 con specificità anticorpale, capace di attivare la cellula T in modo MHC indipendente⁹³.

I primi studi utilizzando recettori di fusione CD8/ ζ avevano inoltre chiarito che la catena ζ del CD3 era sufficiente per attivare la cascata di trasduzione del segnale e l'espletarsi della funzione citotossica di linfociti T in risposta ad antigeni^{94, 95}; poco dopo Eshhar *et al.* dimostrarono che molecole di fusione comprendenti il frammento scFv (Single-Chain Variable Fragment, il più piccolo frammento anticorpale con la capacità di legare l'antigene) di anticorpi monoclonali e domini di trasduzione del segnale come CD3 ζ o FcR γ erano in grado di promuovere l'attivazione della cellula T e di stimolarne la proliferazione e le funzioni effettrici, compresi il rilascio di interleuchina e l'attività citotossica verso cellule bersaglio esprimenti l'antigene⁹⁶. Questa configurazione basata sull'utilizzo di scFv fu il prototipo per lo sviluppo di recettori chimerici con strutture sempre più ottimizzate per l'ingegnerizzazione di cellule T nell'immunoterapia del cancro (Figura 5)⁹⁷.

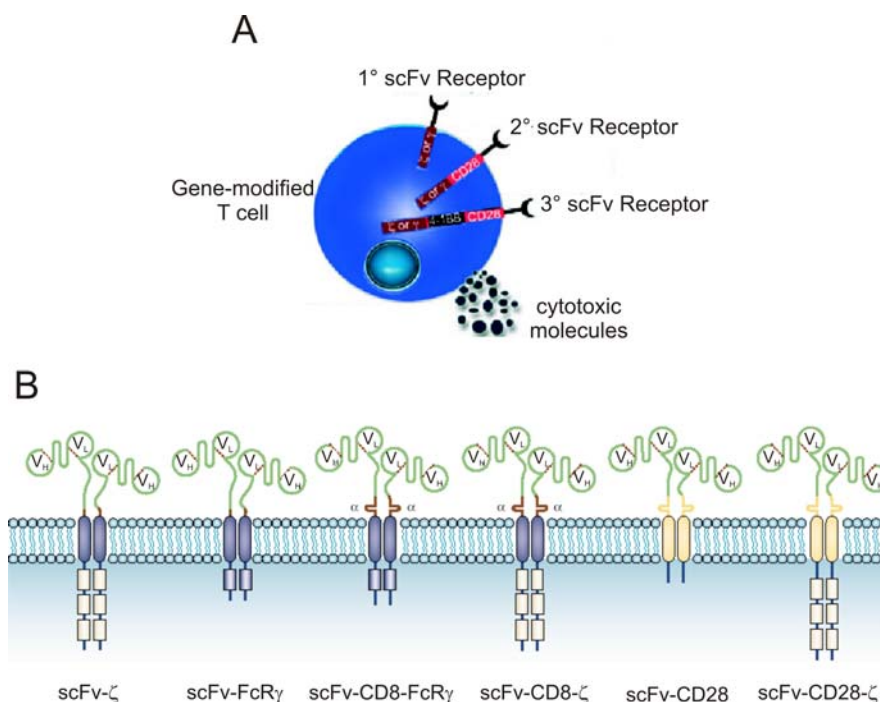


Figura 5. Esempi di recettori chimerici. (A) Il numero di domini di trasduzione del segnale varia a seconda del tipo di CAR (I, II o III generazione). (B) Alcuni esempi di recettori chimerici (in avario CD3 ζ , in marrone CD8 α , in blu domini ITAM di FcR γ , in giallo CD28). Tratto e modificato da^{69,89}.

Le subunità di trasduzione del segnale utilizzate nella costruzione di recettori chimerici sono prevalentemente CD3 ζ e FcR γ , che agiscono mediante la fosforilazione di domini ITAM (FcR γ e CD3 ζ contengono rispettivamente uno e tre domini ITAM) in risposta alla stimolazione antigenica; la fosforilazione attiva proteine chinasi (come ZAP70 e Syk) coinvolte nella trasduzione del segnale.

L'analisi di colture T trasdotte con CAR scFv-CD3 ζ aveva rivelato un'attivazione sub-ottimale dei linfociti, la loro difficoltà a proliferare e secernere citochine in seguito a stimolazione con cellule tumorali Ag-positive; l'espressione di molecole costimolatorie come B7.1 (CD80) da parte delle cellule tumorali determinava tuttavia un'aumentata produzione di IL-2 e un'incremento della proliferazione *in vitro*⁹⁸.

L'idea di fornire alla cellula T il segnale costimolatorio indipendentemente dalla presenza della cellula tumorale ha portato allo sviluppo dei recettori chimerici di seconda generazione, caratterizzati dalla presenza di due domini di *signaling*: oltre a CD3 ζ , il CAR contiene molecole costimolatorie come CD28, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), ICOS o DAP10⁷⁰. L'introduzione di segnali costimolatori nel CAR (CD28 o CD134) aumenta la produzione di citochine (IL-2, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF), la capacità proliferativa in risposta all'antigene e implementa ulteriormente l'attività litica dei linfociti T trasdotti^{99, 100}. Cellule T trasdotte con CAR scFv-CD28-CD3 ζ hanno dimostrato una maggiore efficacia terapeutica *in vivo* nei confronti di

malattia metastatica stabilizzata e una capacità proliferativa superiore di 2-4 volte rispetto a cellule T trasdotte con CAR di prima generazione (scFv-CD3 ζ)¹⁰¹; complessivamente i dati di letteratura indicano che i recettori chimerici di seconda generazione hanno capacità di *signaling* superiori e sono quindi utilizzabili a scopo terapeutico⁷⁰.

Tra tutte le molecole con proprietà costimolatorie il recettore CD28, in particolare, ha un importante ruolo di attivazione di cellule T naïve, mediante interazione con molecole della famiglia B7.1 espresse sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (APC); numerosi studi hanno dimostrato che la molecola costimolatoria CD28 permette di ottenere il miglior risultato in termini di aumentata funzionalità del CAR rispetto ad altre molecole costimolatorie e i CAR basati su CD28-CD3 ζ sono quelli ad oggi più ampiamente studiati. La necessità della molecola CD28 per l'attivazione antigene-specifica e lo sviluppo di cellule T mature è stata dimostrata in animali transgenici esprimenti recettori chimerici sotto il controllo di sequenze regolatorie T-specifiche: linfociti T naïve di topi transgenici per l'espressione di un CAR scFv-CD28- ζ hanno elevata capacità proliferativa, secernono IL-2 e non vanno incontro ad apoptosi¹⁰². A queste proprietà si aggiunge la scoperta che l'espressione di CD28 in cellule CD4⁺ e CD8⁺ permette alla cellula di resistere all'azione anti-proliferativa di TGF- β ¹⁰³; poichè TGF- β è una molecola prodotta da cellule soppressorie come T regolatorie, ed ha attività immunosoppressiva, CD28 può aumentare la resistenza dei T-body alle Treg.

Più recentemente, infine, sono stati riportati recettori chimerici di terza generazione, costituiti da tre domini di *signaling* (CD28, CD3 ζ e 4-1BB o OX40), che sembrano ulteriormente implementare le funzioni effettrici di cellule T trasdotte¹⁰⁴⁻¹⁰⁷; nonostante i risultati positivi ottenuti, manca ancora un confronto convincente con i CAR di seconda generazione, ed è necessaria una più ampia validazione, soprattutto *in vivo*⁶⁹.

Ad oggi la maggior parte dei recettori chimerici utilizza il frammento scFv derivato da anticorpi monoclonali, mentre in altri casi il dominio di riconoscimento antigenico è costituito da ligandi o recettori, come IL-13¹⁰⁸ o eregulina¹⁰⁹.

Gli antigeni riconosciuti da recettori chimerici sono prevalentemente antigeni proteici di superficie (erbB2 rappresenta uno dei primi TAA contro cui è stato sviluppato un CAR), ma questo tipo di approccio è estremamente versatile e consente di bersagliare un'ampia classe di antigeni, compresi carboidrati e glicolipidi, la cui frequenza di mutazione è inferiore rispetto a quella di antigeni proteici; i residui di carboidrati, inoltre, rappresentano bersagli ideali per l'immunoterapia, considerata la loro aberrante espressione su cellule tumorali¹¹⁰. In particolare l'antigene Lewis-Y (Le^Y) è un residuo glicosidico espresso in un'ampia percentuale di tumori

(tumore a piccole cellule del polmone, carcinoma ovarico e mammario); linfociti T ingegnerizzati per l'espressione di recettori chimerici anti-Le^Y si sono dimostrati efficaci nel rallentare la crescita di carcinomi ovarici Le^Y-positivi *in vivo*, anche in presenza di antigene solubile nel siero¹¹¹.

Quale sia il miglior antigene contro cui sviluppare un recettore chimerico è una questione molto complessa: certamente antigeni tumore-specifici (TSA) rappresentano l'ideale, ma sono rari; oggetto di studio sono invece antigeni di differenziazione e antigeni *cancer/testis*, la cui scelta dipende dai livelli e dalla frequenza di espressione su cellule tumorali rispetto a cellule normali⁷⁰.

Rimane ancora da definire l'intervallo di affinità di un recettore chimerico per l'antigene; mentre la costante di affinità del TCR fisiologico è nell'ordine del micromolare, gli anticorpi e i frammenti scFv operano nel range del nanomolare; questo tuttavia non si traduce direttamente in una superiorità del CAR e si ipotizza che la maggior affinità per l'antigene del scFv compensi la mancanza del complesso CD3 nella sua totalità⁷⁰. Uno studio al riguardo ha indicato una stretta relazione tra la densità di recettori chimerici sulla cellula T, la densità dell'antigene sulla cellula bersaglio e l'affinità del recettore per l'antigene¹¹²; anche i livelli di espressione del CAR contribuiscono alla funzionalità effettrice complessiva. Nella scelta del scFv, inoltre, un fattore da considerare è la posizione dell'epitopo nella molecola bersaglio: in particolare sembrano avere una certa importanza la distanza dell'epitopo dalla superficie cellulare, la lunghezza e la flessibilità della regione spaziatrice presente tra il scFv e gli altri domini del CAR¹¹³.

Nonostante possano essere sviluppati recettori chimerici diretti contro un elevatissimo numero di antigeni (in linea teorica è sufficiente poter disporre dell'anticorpo corrispondente), ciascun CAR può riconoscere un solo antigene tumorale; di conseguenza l'espressione eterogenea di antigeni diversi da parte di un tumore costituisce un potenziale limite. Alla luce di queste considerazioni, sono stati sviluppati anche recettori chimerici bi-specifici; un esempio è rappresentato dal recettore anti-CEA/TAG-72, (costituito da due domini scFv fusi, accoppiati alla catena ζ del CD3), che è in grado di mediare la lisi *in vitro* di cellule bersaglio esprimenti gli antigeni CEA e TAG-72¹¹⁴.

Nella Tabella 1 sono riportati gli antigeni tumorali verso cui sono stati sviluppati, ad oggi, recettori chimerici.

Tumor antigens and CAR investigated <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in T lymphocytes.			
Target antigen	Associated malignancy	Receptor type (other specificity)	<i>In vivo</i> studies
α -Folate receptor CAIX	Ovarian cancer	ScFv-Fc ϵ RI γ	Phase I
	Renal cell carcinoma	ScFv-Fc ϵ RI γ	–
		ScFv-CD4-Fc ϵ RI γ	Phase I
CD19	B cell malignancies	ScFv-CD3 ζ (EBV)	–
	B cell malignancies	ScFv-CD3 ζ	+
	B cell malignancies	ScFv-CD28-CD3 ζ	+
	Refractory Follicular Lymphoma	ScFv-CD3 ζ	Phase I
	CLL	ScFv-CD28-CD3 ζ	Phase I
	B cell malignancies	ScFv-CD28-CD3 ζ	+
	ALL	ScFv-41BB-CD3z	–
	ALL	ScFv-41BB-CD3z	+
	B cell malignancies	ScFv-CD3 ζ (Influenza MP-1)	+
CD20	B cell malignancies	ScFv-CD3 ζ (VZV)	–
	Lymphomas	ScFv-CD28-CD3 ζ	–
	B cell malignancies	ScFv-CD4-CD3 ζ	–
	B cell lymphomas	ScFv-CD3 ζ	–
	Mantle cell lymphoma, indolent B cell lymphomas	ScFv-CD3 ζ	Phase I
		ScFv-CD28-CD3 ζ	–
CD22 CD30		ScFv-CD28-41BB-CD3 ζ	–
	B cell malignancies	ScFV-CD4-CD3 ζ	–
CD33	Lymphomas	ScFv-Fc ϵ RI γ	–
	Hodgkin lymphoma	ScFv-CD3 ζ (EBV)	+
CD44v7/8 CEA	AML	ScFv-CD28-CD3z	–
		ScFv-41BB-CD3z	–
EGP-2	Cervical carcinoma	ScFv-CD8-CD3z	+
	Colorectal cancer	ScFv-CD3 ζ	+
		ScFv-Fc ϵ RI γ	+
		ScFv-CD3 ϵ	–
		ScFv-CD28-CD3 ζ	–
		ScFv-CD28-CD3 ζ	+
EGP-40 erb-B2	Multiple malignancies	scFv-CD3 ζ	–
		scFv-Fc ϵ RI γ	–
erb-B 2,3,4	Colorectal cancer	scFv-Fc ϵ RI γ	–
	Breast and others	ScFv-CD28-CD3 ζ	+
		ScFv-CD28-CD3 ζ (Influenza)	+
		ScFv-CD28mut.-CD3 ζ	+
	Prostate cancer	ScFv-Fc ϵ RI γ	+
FBP	Breast and others	Heregulin-CD3 ζ	–
		ScFv-CD3 ζ	+
Fetal acetylcholine receptor G _{D2}	Ovarian cancer	ScFv-Fc ϵ RI γ	+
		ScFv-Fc ϵ RI γ (alloantigen)	+
G _{D3}	Rhabdomyosarcoma	ScFv-CD3 ζ	–
	Neuroblastoma	ScFv-CD28	–
		ScFv-CD3 ζ	–
		ScFv-CD3 ζ	Phase I
		ScFv-CD28-OX40-CD3 ζ	–
		ScFv-CD3 ζ (VZV)	–
Her-2 IL-13R- α 2	Melanoma	ScFv-CD3 ζ	–
		ScFv-CD3 ϵ	–
	Medulloblastoma	ScFv-CD3 ζ	+
	Glioma	IL-13-CD28-4-1BB-CD3 ζ	+
KDR	Glioblastoma	IL-13-CD3 ζ	+
	Medulloblastoma	IL-13-CD3 ζ	+
κ -light chain	Tumor neovasculature	ScFv-Fc ϵ RI γ	–
	B cell malignancies	ScFv-CD3 ζ	+
	(B-NHL, CLL)	ScFv-CD28-CD3 ζ	+
LeY	Carcinomas	ScFv-Fc ϵ RI γ	–
	Epithelial derived tumors	ScFv-CD28-CD3 ζ	+

Target antigen	Associated malignancy	Receptor type (other specificity)	<i>In vivo</i> studies
L1 cell adhesion molecule	Neuroblastoma	ScFv-CD3 ζ	Phase I
MAGE-A1	Melanoma	ScFv-CD4-Fc ϵ RI γ	—
		ScFv-CD28-Fc ϵ RI γ	
Murine CMV infected cells	Murine CMV	Ly49H-CD3 ζ	+
MUC1	Breast, Ovary	ScFv-CD28-OX40-CD3 ζ	+
NKG2D ligands	Various tumors	NKG2D-CD3 ζ	+
Oncofetal antigen (h5T4)	Various tumors	ScFv-CD3 ζ (vaccination)	+
PSCA	Prostate carcinoma	ScFv-b2c-CD3 ζ	—
PSMA	Prostate/tumor vasculature	ScFv-CD3 ζ	+
		ScFv-CD28-CD3 ζ	—
		ScFv-CD3 ζ	+
TAA targeted by mAb IgE	Various tumors	Fc ϵ RI-CD28-CD3 ζ (+ a-TAA IgE mAb)	+
TAG-72	Adenocarcinomas	scFv-CD3 ζ	+
VEGF-R2	Tumor neovasculature	scFv-CD3 ζ	—

(—) *In vitro* studies; (+) *in vivo* animal studies; (Phase I) Phase I clinical trial.

Tabella 1. Antigeni tumorali e recettori chimerici. Elenco dei recettori chimerici utilizzati per ingegnerizzare linfociti T; vengono riportati gli studi *in vitro*, *in vivo* o nell'uomo. Tratto e modificato da⁷⁰.

Il meccanismo attraverso cui un recettore chimerico determina l'attivazione della cellula T e la distruzione della cellula bersaglio è ancora oggetto di indagine; è stato osservato che CD8⁺ murini trasdotti con CAR anti-CEA utilizzano una via perforina-dipendente sia *in vitro* che *in vivo* per la lisi di cellule bersaglio¹¹⁵, mentre in altri casi è utilizzata la via Fas/FasL¹¹⁶. Il rilascio di citochine, compresi IL-2, IFN- γ , GM-CSF e TNF- α in risposta all'attivazione può inoltre produrre effetti antitumorali diretti o indiretti.

6.2 Validazione preclinica

La prima dimostrazione preclinica della capacità di eradicare un tumore stabilizzato da parte di T-body trasferiti adottivamente aveva chiaramente delineato le potenzialità di questo approccio, sottolineando anche l'importanza delle condizioni utilizzate *in vitro* per l'espansione: un singolo inoculo sistemico di cellule T umane ingegnerizzate con CAR anti-CD19 era in grado di eradicare un tumore diffuso indotto da cellule Raji in topi SCID (Severe Combined Immunodeficiency). Questo studio dimostrava inoltre che l'attività *in vivo* delle cellule trasferite dipendeva dalle condizioni di espansione *in vitro*: in particolare cellule attivate in presenza di antigene e con stimolazione CD28-dipendente erano più efficaci di cellule espanse in presenza di OKT-3 e IL-2; inoltre anche l'utilizzo di IL-15, oltre a IL-2, poteva aumentare le capacità effettrici dei T-body¹¹⁷. Nel valutare l'efficacia di un protocollo di terapia adottiva *in vivo* devono comunque essere considerati altri importanti fattori, anche indipendenti dal tipo di recettore chimerico sviluppato: le caratteristiche del tumore indotto e il tipo di animale utilizzato rappresentano infatti due aspetti da considerare nella valutazione di funzionalità di un CAR e nel confronto tra CAR diversi⁷⁰.

L'efficacia terapeutica *in vivo* è stata valutata per la maggior parte dei CAR sviluppati, dopo ingegnerizzazione di cellule T umane o murine (Tabella 1). Complessivamente i dati ottenuti indicano che i T-body sono in grado di rallentare la crescita tumorale o in alcuni casi anche di determinare la regressione di tumori stabilizzati; in generale, la presenza di molecole costimolatorie nel CAR ne aumenta le prestazioni rispetto ai recettori di prima generazione⁷⁰.

6.3 Fattori che influenzano proliferazione, sopravvivenza e persistenza *in vivo*: quali cellule trasdurre?

Oltre alla capacità di riconoscere l'antigene e di lisare la cellula bersaglio, altri fattori cruciali per l'eradicazione di un tumore sono rappresentati dalla capacità delle cellule trasdotte di proliferare in risposta all'antigene, di sopravvivere, ricircolare e raggiungere il sito tumorale una volta trasferite nell'ospite. Se da un lato lo sviluppo dei recettori chimerici di seconda e terza generazione offre la possibilità di implementare la capacità proliferativa della cellula ingegnerizzata, l'obiettivo di un'aumentata persistenza *in vivo* può essere perseguito anche considerando altri importanti aspetti biologici e funzionali.

Come per altri tipi di terapia adottiva, anche per quella basata sul CAR un importante dibattito riguarda la definizione di quale sia il sottotipo cellulare più adatto ad ottenere un risultato terapeutico ottimale; i recettori chimerici sono stati utilizzati per ingegnerizzare un'ampia gamma di cellule, come popolazioni bulk di splenociti murini o PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) umani, cellule T virus-specifiche, cellule T progenitrici¹¹⁸, o cellule staminali ematopoietiche.

Poichè la persistenza di cellule T dopo trasferimento adottivo è un fattore cruciale per l'eradicazione del tumore, la scelta della cellula T da trasdurre o la definizione di protocolli di espansione *in vitro* che mantengano il fenotipo cellulare desiderato sono aspetti fondamentali per questo tipo di terapia. Ogni stadio differenziativo delle cellule T CD8⁺ è infatti associato a proprietà fenotipiche e funzionali diverse, che influiscono sull'attività anti-tumorale *in vitro* e *in vivo* (Figura 6).

Cellule T effettrici attivate (*late effector*) sono sempre state considerate come la scelta ideale per il trattamento di neoplasie, in quanto capaci di esplicare rapidamente la loro azione citotossica. Tuttavia sono aumentate negli ultimi anni le evidenze a favore delle cellule T di memoria che, grazie alla loro aumentata sopravvivenza, al potenziale proliferativo e alla capacità di raggiungere i tessuti linfoidei e di riconoscere gli antigeni tumorali presentati dalle cellule APC, sembrano configurarsi come il tipo cellulare più adatto per la terapia del cancro¹¹⁹. In un modello murino di ACT basato su topi pmel-1 (topi transgenici per un TCR anti-gp100)

era stato osservato che cellule T CD8⁺ terminalmente differenziate, pur dimostrando *in vitro* un'aumentata attività citotossica, erano meno efficaci *in vivo* nel mediare la regressione neoplastica rispetto a cellule T di memoria: questo comportamento apparentemente contraddittorio è tuttavia giustificato se si considerano le modificazioni fenotipiche (espressione di marcatori) e funzionali (capacità di *homing*, produzione di citochine, capacità proliferativa etc.) che accompagnano il processo di differenziamento cellulare, che questo studio ha associato in maniera diretta al destino *in vivo* dei linfociti trasferiti e alla loro attività terapeutica⁵⁴.

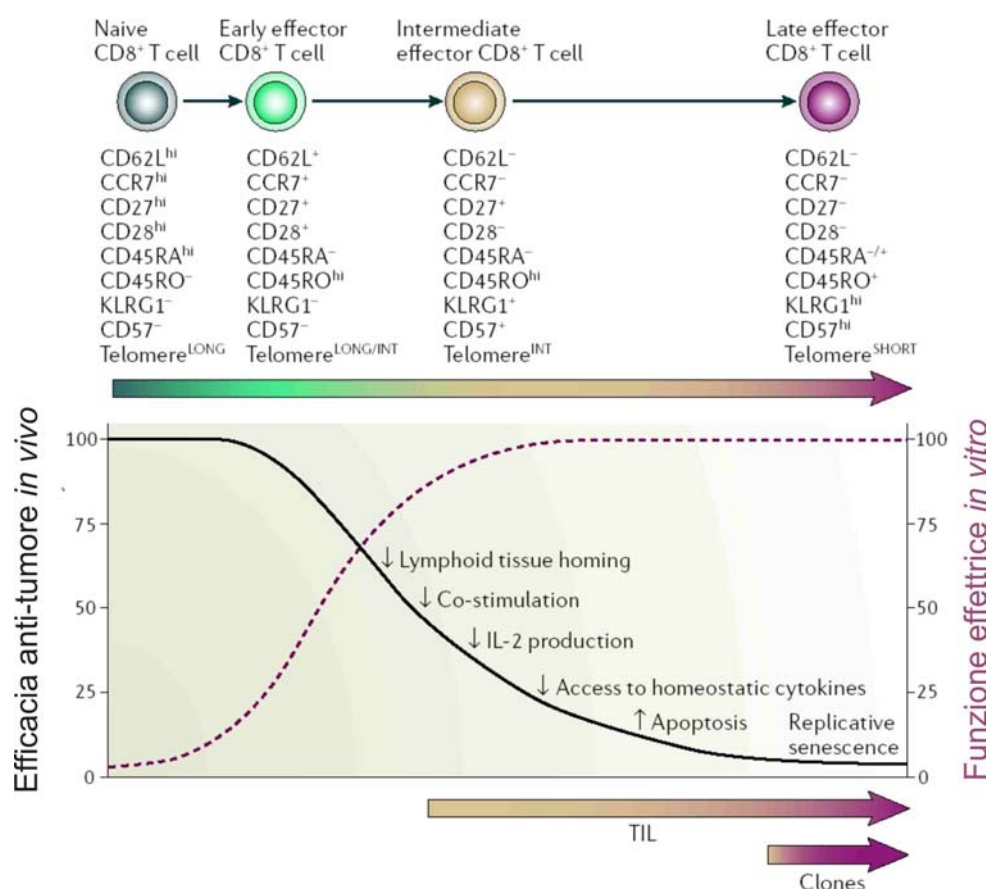


Figura 6. Relazione inversa tra le funzioni anti-tumorali *in vitro* e *in vivo* dei linfociti T. In risposta alla stimolazione antigenica, cellule T naive proliferano e si differenziano progressivamente, attraversando vari stadi, caratterizzati dalla variazione di espressione di alcuni importanti marcatori. L'acquisizione di un fenotipo effettrice è associata ad un aumento della funzione effettrice *in vitro* (linea tratteggiata), ma ad una diminuzione di efficacia terapeutica *in vivo* (linea continua). Tratto e modificato da¹²⁰.

Un'ulteriore distinzione tra cellule T di memoria centrali (T_{CM}) e cellule T di memoria effettrici (T_{EM}) può essere fatta sulla base dell'espressione di determinati marcatori di attivazione e di homing ai tessuti linfoidi. Secondo uno schema di classificazione inizialmente proposto da Sallusto *et al.*¹²¹, cellule T_{CM} esprimono costitutivamente CD62L e CCR-7, due molecole necessarie per l'extravasazione e la migrazione ai tessuti linfoidi secondari, mentre cellule T_{EM}

hanno diminuito o perso l'espressione di questi marcatori e migrano preferenzialmente nei tessuti periferici, come polmoni, milza e siti di infiammazione, proponendosi come sentinelle per una protezione immediata in risposta a stimoli periferici; l'importanza delle cellule T_{EM} nell'eradicazione di infezioni localizzate è infatti ben documentata. Al contrario, le cellule T_{CM} rappresentano una riserva di cellule T antigene-specifiche, pronte ad espandersi e a raggiungere la periferia in seguito ad un secondo stimolo antigenico ed hanno un ruolo critico nella protezione contro infezioni sistemiche, poichè risiedono preferenzialmente nei tessuti linfoidi ed hanno sopravvivenza e potenziale proliferativo superiori rispetto alle T_{EM}¹¹⁹.

Molte evidenze sperimentali indicano che le T_{CM} e le T_{EM} sono i principali attori della risposta immunitaria contro il cancro, ma è ancora aperto il dibattito su quale delle due sottopopolazioni sia più efficace nell'esplicare un'attività terapeutica anti-tumorale *in vivo*. Dato che le T_{CM} si espandono rapidamente in risposta ad una attivazione secondaria e sopravvivono per lunghi periodi di tempo, potrebbero essere efficaci nella protezione contro grosse masse tumorali, metastasi o recidive. Al contrario, le T_{EM} sono in grado di esercitare un'immediata attività citotossica e potrebbero agire rapidamente per contenere la crescita di tumori esistenti in siti periferici isolati. Uno studio di Klebanoff *et al.*, ha dimostrato che nel modello transgenico pmel-1 la capacità di *trafficking* ai tessuti linfoidi secondari è fondamentale per un'attività anti-tumorale significativa, osservando quindi la superiorità terapeutica delle cellule T_{CM} rispetto a T_{EM}⁵⁵.

Recentemente alcuni gruppi hanno scelto una strategia alternativa per ottenere popolazioni caratterizzate da un'aumentata capacità di sopravvivenza *in vivo*: è possibile sfruttare la fisiologica attivazione del TCR e trasdurre con recettori chimerici CTL già specifici per antigeni virali comuni, per ottenere cellule T *dual-specific*. In queste condizioni l'attivazione del TCR fisiologico fornisce uno stimolo molto potente alla cellula, mantenendone ad alti livelli la capacità citotossica, proliferativa e di sopravvivenza, fattori che vengono sfruttati nel generare un T-body specifico per un antigene desiderato.

CTL EBV-specifici sono stati trasdotti con un CAR anti-G_{D2}, antigene espresso da cellule di neuroblastoma; i T-body generati, pur mantenendo la loro attività nei confronti dei bersagli virali, acquisivano anche la capacità di eliminare cellule G_{D2}-positive ed erano caratterizzati da un'aumentata capacità di proliferazione e sopravvivenza, con significativa produzione di IL-2¹²². Questo approccio è stato adottato anche in uno studio clinico di fase I per pazienti affetti da neuroblastoma, determinando risultati positivi¹²³.

Altri gruppi hanno adottato lo stesso tipo di strategia utilizzano CTL specifici per CMV¹²⁴ o per il virus dell'influenza¹²⁵.

Un approccio diverso che consente di evitare la fase di manipolazione *ex vivo* è rappresentato dall'ingegnerizzare con CAR di cellule staminali ematopoietiche (HSC) che matureranno poi in cellule T differenziate: HSC murine trasdotte con CAR anti-Recettore α del folato ritardano la crescita di tumori esprimenti FBP e la deplezione di cellule CD4⁺ e CD8⁺ non altera l'attività terapeutica, indicando che sono probabilmente cellule NK o macrofagi ad essere responsabili dell'effetto antitumorale¹²⁶.

6.4 Applicazioni cliniche

I successi in ambito preclinico hanno giustificato l'applicazione dell'approccio basato su recettori chimerici anche nell'uomo; gli studi clinici finora realizzati hanno valutato l'efficacia terapeutica prevalentemente di recettori di prima generazione per il trattamento di infezioni da HIV e di tumore ovarico, renale, linfoma e neuroblastoma.

Un CAR scFv-CD4- ζ diretto contro l'antigene gp120 di HIV è stato utilizzato in uno studio di fase I per trasdurre linfociti T autologhi CD4⁺ e CD8⁺ in pazienti affetti da sindrome da immunodeficienza acquisita, AIDS (n=24); una singola infusione di 2×10^{10} - 3×10^{10} T-body è stata ben tollerata dai pazienti ed è stato possibile rilevare la presenza di cellule CD4⁺ e CD8⁺ anti-gp120 fino a 42 settimane dopo il trasferimento adottivo (anche in assenza di IL-2 esogena) con una transiente riduzione, in alcuni pazienti, del carico virale nel plasma e nella mucosa rettale¹²⁷. Il successivo studio di fase II, realizzato su 40 pazienti, ha confermato la parziale riduzione della viremia¹²⁸.

Cellule T autologhe trasdotte con CAR scFv-CD4-Fc ϵ RI γ anti-anidrasi carbonica IX (CAIX) sono state invece somministrate a pazienti affetti da carcinoma renale: in questo studio clinico alcuni pazienti hanno sviluppato una progressiva tossicità epatica correlata al quantitativo di cellule T infuse, probabilmente a causa della reazione autoimmune contro cellule epatiche normali esprimenti CAIX¹²⁹.

In un altro studio cellule T autologhe sono state ingegnerizzate con CAR scFv-Fc ϵ RI γ anti-recettore α del folato e somministrate in presenza di IL-2 esogena in 8 pazienti affetti da carcinoma ovarico; la totale assenza di risposte cliniche oggettive è probabilmente dovuta alla mancata persistenza delle cellule trasferite (praticamente assenti dopo un mese dal trattamento) e alla comparsa di anticorpi neutralizzanti anti-FBP nel siero di alcune pazienti. Inoltre 5 pazienti su 8 hanno sviluppato tossicità di 3°-4° grado associata alla somministrazione di IL-2¹³⁰.

L'unico risultato positivo deriva dallo studio clinico su pazienti affetti da neuroblastoma: l'utilizzo di CTL EBV-specifici trasdotti con CAR scFv-CD3 ζ anti-G_{D2} si è dimostrato sicuro e terapeutamente efficace, determinando una risposta clinica oggettiva in metà dei pazienti trattati¹²³.

Sebbene i risultati siano stati complessivamente inferiori alle attese, hanno comunque permesso di far luce su alcuni limiti e problematiche connessi all'utilizzo di CAR; sarà sicuramente necessario valutare l'efficacia di recettori di seconda generazione e ottimizzare protocolli di espansione che garantiscano un'appropriata attivazione, funzionale alla sopravvivenza *in vivo*. In particolare sono stati programmati almeno sette studi clinici con recettori di seconda generazione, negli USA e in Europa, uno dei quali prevede l'ingegnerizzazione di cellule T autologhe con CAR anti-CD19 per il trattamento di leucemia linfocitica cronica^{70, 131}.

6.5 Vantaggi e problematiche

L'utilizzo di recettori chimerici per l'ingegnerizzazione di cellule T presenta sicuramente una serie di vantaggi rispetto all'impiego di un TCR fisiologico: (a) la proprietà di riconoscimento antigenico è indipendente dal processamento MHC e uno stesso CAR può quindi essere utilizzato per modificare linfociti di pazienti diversi (indipendentemente dall'HLA) e contro un ampio spettro di tumori, anche in caso di modulazione negativa dell'espressione delle molecole MHC; (b) è possibile direzionare cellule T contro un elevatissimo numero di TAA, grazie alla relativa facilità di produrre i corrispondenti anticorpi monoclonali; (c) possono essere riconosciuti un'ampia varietà di antigeni, non solo proteici, ma anche carboidrati e glicolipidi; (d) non esiste più il problema della competizione tra le catene esogene ed endogene del TCR; (e) è possibile trasdurre un'ampia gamma di cellule diverse, sia naive che specifiche per antigeni virali e generare risposte sia *helper* (CD4⁺) che citotossiche (CD8⁺).

Ad oggi l'utilizzo di T-body risulta quindi particolarmente vantaggioso nell'ambito della terapia anti-tumorale poichè combina le potenzialità degli anticorpi monoclonali con la potente funzione effettrice dei linfociti; l'indipendenza del riconoscimento dalla processazione MHC rappresenta inoltre una possibile soluzione a meccanismi di *escape* tumorale dovuti a modulazione negativa delle molecole MHC o processazione antigenica difettiva⁸⁸.

I limiti in termini di efficace segnalazione intracellulare e capacità proliferativa, inizialmente riscontrati, sono stati superati con la costruzione dei recettori di seconda (e terza) generazione; problematiche connesse con la capacità di sopravvivenza e proliferazione, sono risolvibili, come già indicato, trasducendo cellule con potenziale proliferativo elevato (cellule staminali, cellule virus-specifiche) o scegliendo condizioni di attivazione e coltura *ex vivo* che non determinino un fenotipo cellulare pienamente differenziato.

Se da un lato, quindi, l'approccio è facilmente ottimizzabile per quanto riguarda la funzionalità della cellula trasdotta, rimangono alcune questioni ancora irrisolte che riguardano, in particolare, la scelta dell'antigene funzionale ad un'efficace eradicazione della neoplasia, in assenza di effetti tossici, la potenziale immunogenicità del costrutto e la sicurezza dei sistemi di trasduzione utilizzati.

Come già dimostrato dallo studio clinico per il trattamento del carcinoma renale metastatico¹²⁹, l'utilizzo di antigeni non tumore-specifici costituisce un limite di specificità della terapia. Un altro esempio in questo senso è rappresentato da recettori chimerici diretti contro CD19, che comportano l'eliminazione di cellule B anche normali, determinando nel paziente la compromissione dell'immunità umorale¹³²; simili considerazioni si applicano all'antigene CD33, espresso a vari stadi di differenziazione nelle cellule del compartimento mieloide, il cui targeting potrebbe eliminare anche neutrofili e cellule progenitrici del midollo, aumentando il rischio di infezioni batteriche nel paziente trattato¹³³.

La presenza di componenti murine (i frammenti scFv derivano da mAb prodotti in topo) rende il costrutto CAR potenzialmente immunogenico; risposte anticorpali anti-CAR sono state effettivamente osservate, ma solo in alcuni casi, rendendo la problematica non universale e risolvibile utilizzando scFv umanizzati o derivati da mAb umani¹³⁴. E' in programma uno studio clinico di fase I con una CAR scFv anti-Le^Y-CD28- ζ completamente umanizzato, per il trattamento di pazienti affetti da mieloma⁶⁹.

La sicurezza dei sistemi di trasduzione utilizzati è infine un problema di notevole importanza, soprattutto dal punto di vista etico, considerate le applicazioni cliniche di questo tipo di approccio. La maggior parte dei protocolli per la generazione di T-body ha utilizzato finora vettori retrovirali per l'espressione stabile del CAR; sebbene ad oggi non ci siano evidenze di eventi di trasformazione neoplastica in seguito a trattamento con cellule T ingegnerizzate, l'utilizzo di vettori virali integranti deve comunque essere applicato con cautela, soprattutto nel caso in cui si trasducano cellule staminali ematopoietiche. Sistemi alternativi di trasduzione sono diventati oggetto di studio negli ultimi anni, come sarà ampiamente descritto nei paragrafi successivi.

7. METODI PER L'INGEGNERIZZAZIONE DI CELLULE T: I VETTORI LENTIVIRALI

La scelta della metodica per l'ingegnerizzazione di cellule T deve essere fatta sulla base di considerazioni di tipo scientifico, etico (sicurezza per l'uomo) e pratico (costi, disponibilità di sistemi adatti alla clinica). Le considerazioni di tipo scientifico comprendono: i) dimensione del transgene; ii) numero di transgeni; iii) modificazione genetica transiente/permanente; iv) livello di espressione del transgene richiesto; v) espressione costitutiva/inducibile; vi) rischio di trasformazione in senso oncogenico nel caso di vettori virali integranti⁷¹.

Esistono vari approcci per l'ingegnerizzazione di cellule T, che possono essere suddivisi in due grandi categorie, sulla base dell'utilizzo o meno di vettori virali. Nella tabella seguente (Tabella 2) si riportano le varie metodiche, con riferimenti all'utilizzo clinico delle stesse; verrà poi descritto in modo più dettagliato l'utilizzo di vettori lentivirali, poichè questa è la metodica adottata nel presente lavoro.

Approccio	Utilizzo clinico
Virus-based	
Vettori gammaretrovirali (RV)	Ampio utilizzo clinico
Vettori lentivirali (LV)	Primi studi clinici utilizzando vettori pseudotipizzati con VSV-G per la trasduzione di cellule T
Vettori derivati da Spumavirus	Non ancora utilizzati in clinica. Studi su cani per correggere la deficienza congenita di CD18 mediante trasduzione di HSC ¹³⁵
Vettori adenovirali	Studio clinico <i>ongoing</i> per il trattamento di infezione da HIV, utilizzando cellule CD4 ⁺ modificate. (N° NCT00842634)
Vettori erpetici linfotropici (HHV6 e HHV7)	Proposti per terapia genica e vaccinazione
Non-virus-based	
Integrazione casuale mediante elettroporazione	Studio clinico per il trattamento di linfoma a cellule B; utilizzo di cellule T autologhe ingegnerizzate per esprimere un CAR anti-CD20 ¹³⁶
Integrazione basata su trasposoni	Non ancora utilizzata in clinica

Tabella 2. Approcci di ingegnerizzazione di linfociti. Tratto e modificato da⁷¹.

7.1 Vettori lentivirali

La maggior parte dei protocolli di ingegnerizzazione delle cellule T, sia *in vitro* che *in vivo*, utilizza vettori retrovirali (RV), derivati da retrovirus murini come il virus della leucemia murina di Moleney (MoMuLV) o il virus murino delle cellule staminali (MSCV), o vettori lentivirali (LV) derivati da HIV-1 (Human immunodeficiency virus-1). Rispetto a vettori adenovirali, principalmente utilizzati per la trasduzione di cellule non ematopoietiche (ed applicati alle cellule T con scarsi risultati), i vettori RV e LV sono in grado di trasdurre i linfociti con buona efficienza, sono scarsamente immunogenici e, grazie alla capacità di

integrazione nel genoma, possono garantire un'espressione genica a lungo termine o permanente^{71, 137}.

I vettori virali basati su gammaretrovirus, dimostratisi sicuri e ormai adottati in clinica da circa due decenni, presentano tuttavia alcuni limiti^{71, 138-141}: i) la cassetta di espressione ha dimensioni ridotte; ii) l'integrazione casuale espone il transgene al rischio di silenziamento genico, documentato soprattutto in cellule staminali ematopoietiche; iii) scarsa efficacia di trasduzione di cellule immunitarie diverse da linfociti, es. NK; iv) l'integrazione del transgene nel genoma della cellula ospite richiede l'attiva replicazione cellulare.

I vettori lentivirali sono stati sviluppati a metà degli anni '90 del secolo scorso e rappresentano l'ultima categoria di vettori la cui applicazione spazia dalla ricerca di base alle biotecnologie e alla terapia genica. I vettori 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 potenziali bersagli cellulari e favorire la stabilità e la manipolazione delle particelle virali.

I vettori LV offrono alcuni vantaggi rispetto ai vettori RV: possono mediare l'integrazione di transgeni anche nel genoma di cellule ospiti non replicanti^{142, 143} e sono, in alcuni casi, meno soggetti a fenomeni di silenziamento genico da parte di fattori di restrizione dell'ospite^{138, 144, 145}, permettendo così un'espressione più stabile del transgene¹⁴¹; infine non si integrano preferenzialmente in prossimità dei siti di inizio della trascrizione, limitando così il rischio di mutagenesi inserzionale e l'attivazione di proto-oncogeni¹⁴⁶.

La patogenicità del virus parentale e la potenziale genotossicità delle LTR (Long Terminal Repeat) e dei geni accessori di HIV-1 ha imposto l'introduzione di rigide norme di biosicurezza nella generazione di LV; è infatti necessario limitare al massimo, o annullare, il rischio di ricombinazione genetica che possa portare alla generazione di particelle virali competenti per la replicazione (RCR, Replicant Competent Recombinants). A questo scopo sono stati disegnati vari tipi di costrutti lentivirali, via via più sicuri, fino ad arrivare a quelli di terza generazione (Figura 7); la biosicurezza di questi tipi di vettori è stata ulteriormente implementata dal meccanismo di inattivazione dei vettori SIN (Self inactivating): l'ampia delezione, nel genoma virale, della regione U3 della ripetizione terminale lunga in 3' viene duplicata dopo trasduzione delle cellule target, causando l'inattivazione trascrizionale di entrambe le LTR. Il costrutto di packaging di terza generazione è caratterizzato dalla perdita di tutti quei geni di HIV-1 non essenziali per la replicazione, mantenendo soltanto *gag*, *pol* e *rev*: la rimozione dell'altro gene essenziale per la replicazione, *tat* è compensato dall'introduzione di un promotore costitutivo (derivato da RSV, Rous sarcoma virus) a monte rispetto al trascritto virale. Infine, le funzioni

virali vengono suddivise in più plasmidi (4), la cui ricombinazione dipende dalla complementazione *in trans* e può avvenire solo all'interno di cellule di *packaging*, garantendo così un significativo vantaggio in termini di biosicurezza^{141, 147}.

Le prestazioni del vettore di trasferimento possono essere ulteriormente implementate dall'aggiunta della sequenza cPPT (*central polypurine tract*), che aumenta l'efficienza di trasferimento genico, e della sequenza WPRE (*Woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element*) posizionata dopo il transgene, per aumentare l'espressione di quest'ultimo¹⁴¹.

Per alcuni scopi (eliminazione condizionale delle cellule trasdotte, marking, ricostituzione di funzioni cellulari dipendenti da più subunità o di pathway metaboliche) può essere necessaria l'espressione contemporanea di più geni nella stessa cellula: la trasduzione con vettori separati risulta poco efficace, poichè genera una popolazione eterogenea caratterizzata da un'espressione non uniforme dei due geni; anche l'utilizzo di *internal ribosome entry sites* (IRES), la metodica ad oggi più comune per un trasferimento genico multiplo, ha dimostrato numerosi limiti¹⁴⁸. Allo scopo di permettere l'espressione multipla di geni e di superare le difficoltà incontrate con altri tipi di approcci, il gruppo di Naldini ha recentemente sviluppato un vettore lentivirale di trasferimento con promotore bidirezionale¹⁴⁹, adottato nel presente studio e descritto in dettaglio nel paragrafo 3 della sezione *Risultati*.

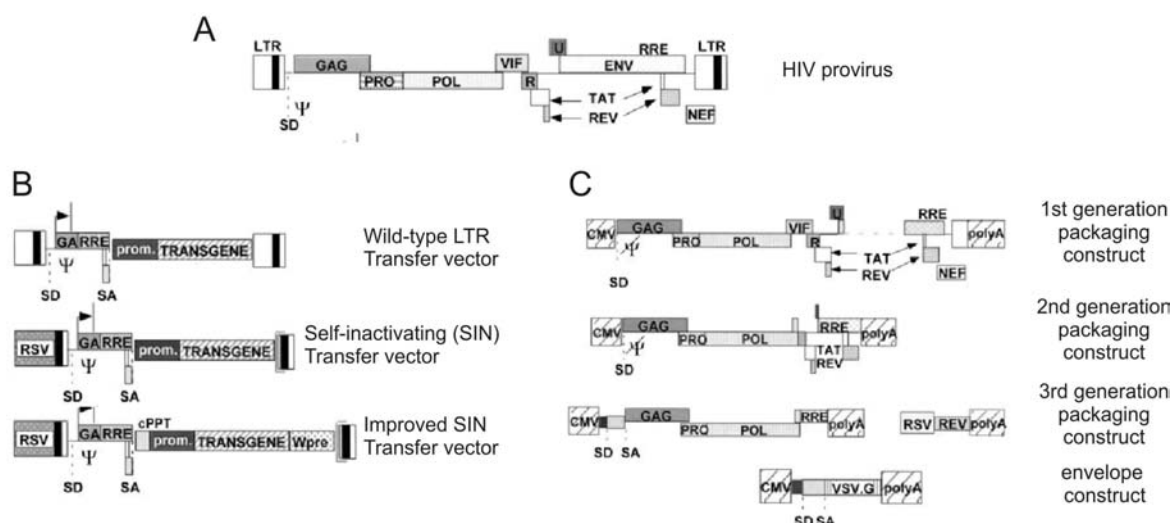


Figura 7. Rappresentazione schematica dei costrutti lentivirali di trasferimento e di packaging. A) Rappresentazione schematica del provirus HIV-1. B) Successive ottimizzazioni dei costrutti di trasferimento lentivirali; il costrutto contiene le sequenze di HIV-1 necessarie per il trasferimento e un promotore interno per l'espressione del transgene; nei vettori SIN si ha delezione della regione U3 dell'LTR in 3'. C) Successive ottimizzazioni dei costrutti di packaging; le LTR virali sono sostituite, in tutti i casi, dal promotore CMV in 5' e dal segnale di poliadenilazione *polyA* in 3'. Nel costrutto di terza generazione il gene *rev* è codificato da un plasmide separato, sotto il controllo del promotore RSV. Il costrutto di envelope contiene sequenze non correlate a HIV-1 ed esprime la proteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV, Vesicular stomatitis virus) sotto il controllo di CMV. Tratto e modificato da¹⁴¹.

I vettori RV, attualmente utilizzati per l'ingegnerizzazione di cellule T, hanno una bassa efficienza di trasduzione di cellule T naive e a crescita lenta come i TIL; l'attivazione del TCR e la sostenuta replicazione cellulare necessarie per la trasduzione da parte di RV sono però deleterie per la funzionalità stessa della cellula, poichè ne alterano la capacità proliferativa, il repertorio e la competenza immunologica¹⁵⁰. Al contrario è stato dimostrato che i vettori LV sono in grado di trasdurre in modo efficace sia CTL tumore-reattivi¹⁵¹, sia un'ampia gamma di cellule con bassa attività replicativa o non proliferanti, compresi PBL poco stimolati^{151, 152}. Sebbene i vettori LV trasducano vari tipi di cellule non replicanti (grazie al trasporto attivo nel nucleo del complesso virale di preintegrazione), cellule T quiescenti non sono permissive alla trasduzione; è stato tuttavia dimostrato che l'utilizzo di citochine come IL-7, IL-2 e IL-15, capaci di promuovere la sopravvivenza a lungo termine *in vitro*, sono in grado di rendere le cellule T suscettibili all'infezione virale, in assenza di attivazione del TCR, promuovendo la progressione dalla fase G₀ alla fase G₁ del ciclo cellulare senza indirizzare le cellule alla proliferazione¹⁵².

La capacità di trasdurre cellule non in attiva replicazione permette un accorciamento della fase di manipolazione cellulare *ex vivo*, fornendo la possibilità di ottenere un elevato numero di cellule T con fenotipo *memory*, ottimale per scopi terapeutici^{54, 55, 119}.

Nonostante in linea teorica il rischio di mutagenesi inserzionale sia inferiore rispetto ai vettori RV¹⁴⁶, la sicurezza dei vettori LV nell'uomo è ancora oggetto di studio; i primi studi clinici stanno dando risultati incoraggianti in termini di efficacia e sicurezza^{153, 154}. In particolare lo studio clinico (iniziato nel 2003) sull'utilizzo di cellule T CD4⁺ ingegnerizzate per esprimere una sequenza antisense contro la proteina *envelope* di HIV-1 ha dimostrato l'elevata efficienza di trasduzione *ex vivo*, con risultati positivi in termini terapeutici, riportando l'assenza di mutagenesi inserzionale in 36 mesi di osservazione¹⁵⁴.

Considerati i primi risultati sulla sicurezza e i numerosi vantaggi biologici rispetto ai vettori RV, i vettori LV si propongono come un'attraente alternativa per l'ingegnerizzazione di cellule T e/o applicazioni di terapia genica, e potrebbero trovare nell'immediato futuro sempre maggiore applicazione nell'ambito dell'immunoterapia⁷².

8. IMAGING DI BIOLUMINESCENZA PER IL MONITORAGGIO DELLA SOPRAVVIVENZA E DELL'HOMING DI LINFOCITI T

8.1 Imaging di bioluminescenza (BLI)

Nell'ambito della ricerca preclinica si è assistito, negli ultimi anni, allo sviluppo di numerose metodiche di imaging, mutate dalla clinica o sviluppate esclusivamente per animali di piccola taglia: l'introduzione in cellule o in animali transgenici di molecole/geni *reporter* consente lo studio longitudinale e non invasivo di processi biologici a livello cellulare e molecolare in organismi viventi, senza dover ricorrere al sacrificio di animali¹⁵⁵. Le principali metodiche di imaging che trovano concreta applicazione nello studio del *trafficking* cellulare sono rappresentate da PET/SPECT (Positron Emission Tomography/Single Photon Emission Computed Tomography), MRI (Magnetic Resonance Imaging) e imaging ottico, BLI (Bioluminescence imaging) o FLI (Fluorescence imaging).

L'enorme interesse nei confronti dell'imaging ottico come nuova modalità di indagine di processi cellulari è giustificata dalla relativa semplicità della tecnica e delle strumentazioni e dalla capacità di rilevare segnali con specificità uguale o in alcuni casi anche superiore rispetto ad altre modalità di imaging molecolare. L'imaging ottico si basa sulla rilevazione di un segnale luminoso e il limite principale è rappresentato dai fenomeni di attenuazione e scattering della luce nell'attraversare i tessuti (l'intensità della luce visibile viene ridotta di circa 10 volte/cm di tessuto¹⁵⁶); per migliorare la sensibilità della tecnica si sfrutta l'emissione di luce nella regione del NIR (Near infrared), tra 600 e 900 nm, dove l'autofluorescenza è ridotta e l'assorbimento della luce da parte di emoglobina, lipidi e acqua è a livelli minimi.

Nell'imaging di fluorescenza una molecola fluorescente viene eccitata da una fonte esterna di energia e ri-emette luce a lunghezza d'onda maggiore e minor energia; la bioluminescenza, invece, è un fenomeno in cui l'energia luminosa viene prodotta in seguito ad una reazione chimica, in assenza di eccitazione da parte di una fonte esterna di luce: questo si traduce nella mancanza di autofluorescenza e in una maggiore sensibilità della tecnica.

In particolare, la reazione chimica che produce luce è catalizzata da una classe di enzimi detti *Luciferasi*, in grado di ossidare il substrato e produrre energia luminosa.

L'enzima più comunemente utilizzato nell'imaging *in vivo* è *Firefly luciferase* (fluc), clonato nel 1985¹⁵⁷ e ottimizzato per l'espressione in cellule eucariotiche: in una reazione che richiede ossigeno, magnesio e ATP questo enzima ossida il substrato luciferina, producendo luce con ampio spettro di emissione (530-640 nm) e un picco a 562 nm. Poichè a causa dell'attenuazione tissutale le lunghezze d'onda con migliori proprietà di attraversamento tissutale sono quelle del

rosso e lontano-rosso, il segnale generato dalla reazione *Firefly luciferasi*-luciferina è rilevabile a vari centimetri di profondità¹⁵⁸.

Altri tipi di luciferasi sono rappresentati dalle luciferasi marine *Renilla* e *Gaussia luciferase*, che reagiscono con un diverso substrato, celenterazina, per produrre luce blu con picco di emissione a circa 480 nm (Tabella 3, Figura 8); entrambi questi enzimi, ATP-indipendenti, sono più piccoli rispetto a *Firefly luciferasi* e sono quindi più vantaggiosi per l'integrazione in genomi virali o per generare proteine di fusione¹⁵⁹. Sebbene utilizzati anche per applicazioni di BLI *in vivo*, la loro utilità è limitata dallo spettro di emissione nel blu e da segnali di background più alti dovuti all'auto-ossidazione della celenterazina¹⁶⁰: le applicazioni *in vivo* di queste luciferasi marine possono essere potenziate generando varianti con spettro di emissione più spostato verso il NIR (*red-shifted*)¹⁶¹. *Gaussia luciferase*, inoltre, è un enzima secreto, poco utile per lo studio di processi biologici localizzati; la delezione del segnale di secrezione riduce tuttavia la capacità di produrre luce.

Oltre ai diversi tipi di enzima, va ricordato anche l'operone batterico Lux (codificante sia l'enzima che il substrato), utilizzato per monitorare le infezioni batteriche tramite BLI; il trasferimento dell'operone a cellule eucariotiche potrebbe essere molto vantaggioso per l'imaging *in vivo*, ma la ricerca in questo ambito non ha ancora dato risultati.

Nelle applicazioni di BLI con gli enzimi luciferasi, il substrato deve essere somministrato all'animale prima di ciascuna analisi, per via intraperitoneale (luciferina) o sistemica (celenterazina); per massimizzare il segnale ottenuto e ridurre al minimo le variazioni sperimentali, va inoltre standardizzato un protocollo che prevede un quantitativo standard di substrato (150 mg/kg di luciferina e 0,7 mg/kg di celenterazina), l'analisi a tempi costanti dall'inoculo del substrato e il mantenimento della medesima posizione dell'animale nelle diverse sessioni di imaging. La celenterazina presenta alcune problematiche rispetto alla luciferina: la necessità dell'inoculo per via sistemica, (endovena o intracardiaco), l'auto-ossidazione nel siero che aumenta il rumore di fondo, la minor capacità di penetrazione in alcuni tessuti come la barriera ematoencefalica (a causa del trasporto attivo da parte di glicoproteina P)¹⁶², la rapida cinetica di reazione (il picco di emissione si ha dopo 1-2 minuti dall'inoculo del substrato e il segnale decresce rapidamente dopo 10-15 minuti)¹⁶⁰ e i costi elevati diminuiscono notevolmente l'utilizzo di *Gaussia* e *Renilla Luciferase*, facendo di *Firefly Luciferasi* l'enzima più utilizzato per applicazioni di imaging *in vivo*.

Le diverse cinetiche enzimatiche e i diversi spettri di emissione possono tuttavia costituire un vantaggio nel caso si utilizzino due diversi enzimi luciferasi per il monitoraggio di processi biologici distinti¹⁶³.

Table 1 : Comparative information of luciferase substrates and enzymes		
Common Name	Firefly	Sea Pansy
Species	<i>Photinus pyralis</i>	<i>Renilla reniformis</i>
Gene Name	Fluc	Rluc
Enzyme Molecular Weight	62 kD	36 kD
Substrate	Luciferin	Coelenterazine
Dose	150 mg/kg	0.7 mg/kg
Cost	\$600 per 1 g	\$190 per 1 mg
Effective Cost (per 25g mouse)	0.025 kg * 150 > 3.75 mg = \$ 2.25	0.025 kg * .7 > .02 mg = \$3.33
Route of Administration	Intraperitoneal	Intravenous
Peak Wavelength	560 nm	475 nm
V _{max}	101 moleculesluciferin/s/mol enzyme	2.0e ²⁴ molecules coelenterazine/s/mol enzyme
K _m	181 +/- 2.0 μM with ATP	2.9 +/- 1.0 μM

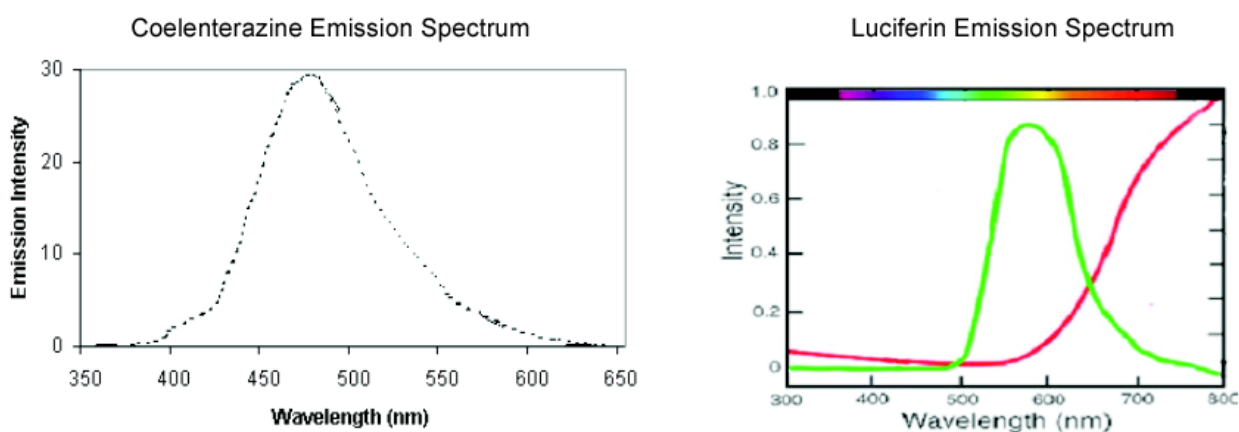
Tabella 3. Confronto tra *Firefly* e *Renilla luciferase*

Figura 8. Spettri di emissione di celenterazina e luciferina

Per l'analisi del segnale ottenuto con BLI, la definizione di specifiche regioni di interesse (ROI) permette di misurare i fotoni emessi da un sito anatomico; in genere il segnale è misurato in termini di fotoni emessi per unità di tempo da un'area fissa, in modo da normalizzare le differenze dovute a tempi di acquisizione e campi di vista (FOV) diversi; i dati forniscono sempre una quantificazione relativa, mai una misura assoluta della quantità di enzima presente in un preciso sito.

In uno studio del 1999 Sweeney et al.¹⁶⁴ avevano determinato che, utilizzando linee cellulari stabilmente esprimenti luciferasi, era possibile rilevare fino a 30 cellule *in vitro* e 1×10^3 cellule *in vivo* (in topo); nonostante il limite inferiore di sensibilità dipenda dalla densità cellulare e dal livello di espressione del transgene (e debba quindi essere valutato per ciascun disegno sperimentale) questo studio aveva enfatizzato le potenzialità della tecnica.

Più recentemente, altri lavori hanno definito la sensibilità e la validità delle informazioni ottenute mediante BLI nella valutazione dello sviluppo neoplastico in animali di piccola taglia

(Tabella 4): se la massa neoplastica è a livello superficiale e ben definita esiste una buona correlazione tra il segnale di bioluminescenza e le dimensioni (peso e/o volume) del tumore; sebbene questa correlazione sia meno significativa nel caso di tumori metastatici, è comunque possibile un'analisi longitudinale sullo stesso soggetto, normalizzando i segnali ottenuti a diverse tempistiche con il segnale iniziale, per ottenere informazioni sulla crescita del tumore¹⁶⁵. In generale, comunque, un'analisi di tipo quantitativo mediante BLI deve essere effettuata con molta cautela e validata per ciascuna specifica applicazione¹⁵⁸.

Cancer Cell Type	Site of Tumor	Solid Mass or Diffuse Tumors	Sensitivity	Validity	Reference
HeLa	s.c.	Solid mass	1×10^4	+	27
	i.p.	Diffuse	1×10^3	+	27
	i.v.	Diffuse	1×10^6	–	27
HeLa	i.p.	Diffuse	2.5×10^3	+++	28, 48
	i.m.	Solid mass	1×10^3	++	28, 48
Gliosarcoma	Orthotopic	Solid mass		+++	43
Glioma	Orthotopic	Solid mass	1×10^5	+++	39
Glioma	Orthotopic	Solid mass		+	31
Glioma	Orthotopic	Solid mass		++	30
Pituitary	Spontaneous	Solid mass		+++	37
Prostate cancer	i.p.	Diffuse	1×10^3	++	33
Prostate cancer	s.c.	Solid mass		+++	41
	Orthotopic	Solid mass		+++	41
Lung cancer	i.v.	Diffuse		++	41
Prostate cancer	s.c.	Solid mass	4×10^2		24
HeLa	i.m.	Solid mass	9×10^2		24
Mammary carcinoma	bm	Solid mass	2×10^4		35
	i.m.	Solid mass	1×10^4		35
	s.c.	Solid mass	1×10^3		35
Colon cancer	i.p.	Diffuse		++	9
Lymphoma	i.v.	Diffuse	7×10^3	+++	40

BLI, bioluminescence imaging; s.c., subcutaneously; i.p., intraperitoneally; i.v., intravenously; i.m., intramuscularly; i.c., intracranially; bm, bone marrow.

Tabella 4. Sensibilità e validità dei dati di BLI per l'analisi di tumori. Tratto da ¹⁶⁵.

La tecnica della bioluminescenza presenta, inevitabilmente, anche alcuni svantaggi¹⁶⁶: oltre all'attenuazione del segnale dovuta all'assorbimento di emoglobina, melanina e altre molecole pigmentate (con conseguenti limitazioni nell'utilizzo di animali dal pelo scuro), le immagini prodotte mediante BLI sono bi-dimensionali (con una sproporzione di intensità tra un segnale superficiale e uno più profondo) e rendono difficile la precisa localizzazione della fonte di segnale; inoltre la limitata risoluzione spaziale (1-3 mm) impedisce di distinguere tra sorgenti di segnale anatomicamente vicine. Infine la necessità di modificare geneticamente le cellule per l'espressione di enzimi luciferasi rende impossibile il trasferimento della tecnica dalla ricerca preclinica ad applicazioni in ambito clinico^{165, 167}.

D'altra parte, comunque, l'enorme sviluppo della bioluminescenza nell'ambito dell'imaging *in vivo* è giustificato dalla sensibilità della tecnica, per certi aspetti superiore alla fluorescenza (minor autofluorescenza e maggior rapporto segnale/rumore)¹⁶⁸, e dalla relativa semplicità e rapidità di utilizzo: le tempistiche di acquisizione sono dell'ordine di minuti (variabili a seconda dei livelli di espressione dell'enzima, del quantitativo di cellule, della profondità del segnale) ed è possibile analizzare più animali contemporaneamente, accorciando i tempi di analisi e fornendo un ottimo strumento per chiarire meccanismi cellulari e molecolari patogenetici ed accelerare lo sviluppo di terapie in modelli preclinici.

Le applicazioni del BLI sono molteplici¹⁵⁵ e permettono di studiare fenomeni come progressione neoplasitica (crescita di masse tumorali, formazione di metastasi, regressione neoplastica in risposta a terapie¹⁶⁹⁻¹⁷¹, monitoraggio di infezioni¹⁷², espressione genica (attività di promotori ed enhancers, trascrizione, trasduzione del segnale, interazioni proteina-proteina ecc.)^{173, 174} e *trafficking* cellulare *in vivo*.

8.2 T cell tracking

Un aspetto critico per il successo di un protocollo di ACT è rappresentato dalla capacità delle cellule T trasferite di sopravvivere nell'ospite e di raggiungere il sito tumorale dove esplicare la funzione effettrice; indagare questi aspetti è di fondamentale importanza per chiarire le dinamiche con cui le cellule si distribuiscono e ricircolano nell'ospite ed intervenire, se necessario, per migliorare la terapia.

In ambito clinico non esiste, ad oggi, nessuna modalità di imaging approvata dalla FDA, che possa essere utilizzata per il monitoraggio a lungo termine del destino di cellule trasferite nel paziente¹⁷⁵.

A livello preclinico la migrazione cellulare e l'*homing* ad un preciso sito (sia esso un tumore, una zona di infiammazione o il focolaio di un'infezione) sono sempre stati studiati valutando mediante immunoistochimica, immunofluorescenza o citofluorimetria la presenza delle cellule in precisi organi o tessuti, ottenuti dopo sacrificio dell'animale. Le informazioni ottenute con questo tipo di analisi, sebbene sicure, sono limitate ad un preciso momento e a campioni isolati, senza tener conto della complessità dei processi biologici all'interno di un organismo vivente¹⁷⁶.

La relativa facilità con cui è possibile ingegnerizzare le cellule con enzimi luciferasi ha permesso all'imaging di bioluminescenza di proporsi, negli ultimi anni, come strumento ottimale per il monitoraggio del *trafficking* linfocitario, per chiarire i meccanismi della risposta immunitaria (in risposta ad insulti o in caso di patologie autoimmuni) e monitorare il destino biologico di cellule T in protocolli di ACT, nel contesto di un organismo vivente¹⁷⁷. I dati generati mediante BLI riflettono la presenza di cellule vitali, metabolicamente attive e non

costituiscono falsi-positivi, un aspetto particolarmente utile negli studi di *trafficking* cellulare, in cui l'esplicarsi di una funzione effettrice dipende prima di tutto dalla capacità della cellula di sopravvivere nell'ospite¹⁷⁵.

Studi recenti hanno utilizzato BLI per analizzare il comportamento di cellule Treg in un modello murino di trapianto di midollo allogenico, dimostrandone la colocalizzazione con cellule T effettrici, l'iniziale espansione in organi linfoidi secondari e la successiva migrazione nei siti di infiammazione^{178, 179}; un altro lavoro ha chiarito le dinamiche di circolazione di cellule T CD8⁺ in risposta ad antigeni, concludendo che esiste una relazione tra il segnale di bioluminescenza e il numero di cellule T antigene-specifiche in vari organi linfoidi superficiali (linfonodi), ma non in profondità (milza)¹⁸⁰. In uno studio più recente, infine, l'utilizzo di una variante di *Firefly Luciferase* (ffLuc) con aumentata capacità di produrre luce permette di rilevare quantitativi inferiori a 3×10^4 cellule T trasferite adottivamente, infiltranti siti di vaccinazione e tumori stabilizzati, consentendo di "quantificare" TIL che costituiscono lo 0,3% delle cellule del tumore¹⁸¹. E' possibile sviluppare anche animali transgenici per l'espressione di Luciferasi: nel modello T-Lux recentemente caratterizzato l'espressione di luciferasi è limitata alle sole cellule T e consente l'osservazione e la quantificazione della dinamica delle risposte T cellulari in modo globale e in tempo reale¹⁷⁶.

SCOPO DELLA TESI

Il tumore prostatico, seconda causa di morte per tumore nella popolazione maschile del mondo occidentale, manca di terapie efficaci e risolutive per le forme aggressive, avanzate, recidivanti e metastatiche; gli approcci immunoterapeutici rappresentano una valida e reale opportunità di cura, soprattutto nei casi di malattia minima residua e di eventuali metastasi a distanza^{182, 183}. Questo tipo di tumore rappresenta un bersaglio ottimale per l'immunoterapia per molteplici ragioni: i) la prostata non è un organo essenziale e il suo danneggiamento non compromette la vita del paziente; questo permette di scegliere come bersagli terapeutici anche antigeni tessuto-specifici, la cui identificazione rispetto a TAA o TSA è molto più semplice e rapida; ii) i siti di formazione di metastasi (tipicamente linfonodi e tessuto osseo) sono generalmente molto vascolarizzati, facilitando il raggiungimento da parte di anticorpi; iii) le metastasi sono tipicamente di dimensioni ridotte e facilmente raggiungibili; iv) la valutazione non invasiva dei livelli sierici di PSA (Prostate Specific Antigen) permette il monitoraggio della risposta alla terapia in modo rapido e semplice¹⁸⁴.

L'antigene tessuto-specifico PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen), 100 KDa, è una glicoproteina integrale di membrana (tipo II) con una breve coda citoplasmatica (19aa), prevalentemente localizzata sulle cellule epiteliali della ghiandola prostatica. La bassa espressione di PSMA in cellule prostatiche normali subisce un notevole incremento nelle cellule di carcinoma prostatico di alto grado, metastatico e androgeno-insensibile. L'importanza di PSMA nella diagnosi e nella terapia del carcinoma prostatico è ulteriormente supportata dalla scoperta che questo antigene è espresso anche nei vasi tumorali neoformati, ma è assente nelle cellule endoteliali normali¹⁸⁵.

Nonostante i presupposti, l'immunoterapia passiva con anticorpi monoclonali diretti contro antigeni prostatici e marcati con radioisotopi, non ha prodotto, ad oggi, i risultati attesi; gli studi clinici hanno inoltre dimostrato che un singolo approccio immunoterapeutico, sia esso l'utilizzo di cellule citotossiche o di anticorpi monoclonali, potrebbe essere insufficiente ad eradicare in modo efficace una neoplasia. Sfruttando le competenze sullo sviluppo di anticorpi monoclonali¹⁸⁶ e sull'ingegnerizzazione di cellule T dirette contro TAA¹⁸⁷ è stata quindi proposta la combinazione di due potenti strategie, mediante lo sviluppo di un recettore chimerico diretto contro hPSMA.

I dati di letteratura su CAR anti-hPSMA riguardano prevalentemente recettori di prima generazione^{98, 188-190}; Maher *et al.*¹⁰⁰ hanno invece sviluppato un CAR scFv-CD28-CD3ζ la cui

attività è stata tuttavia analizzata solo *in vitro*, e a cui ci siamo ispirati per la costruzione del recettore oggetto di questo studio; gli ultimi lavori apparsi nel 2009 riportano infine la costruzione di CAR di terza generazione¹⁰⁷.

In tutti questi studi sono stati utilizzati vettori retrovirali, di cui già si possiede una notevole esperienza anche in ambito clinico; in questo progetto si è scelto di utilizzare vettori lentivirali, sulla base di peculiari caratteristiche che li rendono un'attraente alternativa rispetto ai vettori RV.

Alla luce degli argomenti introdotti, gli obiettivi specifici di questo progetto di ricerca sono stati: i) la costruzione di un recettore chimerico scFv-CD28-CD3 ζ anti-hPSMA; ii) lo sviluppo di un protocollo affidabile, riproducibile e orientato all'applicazione clinica per il ridirezionamento di PBMC mediante trasferimento genico del CAR con vettori lentivirali; iii) la caratterizzazione *in vitro* di una popolazione di cellule T antigene-specifiche indotte a seguito del trasferimento genico del CAR anti-hPSMA; iv) la valutazione della potenzialità terapeutica di cellule T ridirezionate in un modello murino di carcinoma prostatico.

L'utilizzo di un vettore lentivirale recentemente descritto e caratterizzato dalla presenza di un promotore bidirezionale¹⁴⁹ ha permesso l'ingegnerizzazione di cellule T contemporaneamente con CAR anti-hPSMA e gene reporter per studi di *tracking* cellulare *in vivo*. In particolare l'espressione di *Firefly Luciferase* nei linfociti trasdotti ha consentito di analizzarne il destino biologico dopo trasferimento adottivo mediante imaging di bioluminescenza. Poichè la distribuzione, persistenza e la capacità di accumulo al sito tumorale sono fattori indispensabili per ottenere un risultato terapeutico, la loro valutazione, in modo non invasivo e in tempo reale, consente di predire la risposta e modificare, se necessario, la terapia al fine di ottimizzare i risultati.

MATERIALI E METODI

1. LINEE CELLULARI

1.1 Linee cellulari di carcinoma prostatico

Sono state utilizzate le seguenti linee di carcinoma prostatico umano: LNCaP, PC-3 e PC-3-hPSMA (derivante dalla linea PC-3, trasfettata stabilmente con hPSMA). Queste linee cellulari sono state mantenute in terreno di coltura RPMI 1640 (Biochrom AG) addizionato con 2 mM L-Glutammina (Cambrex), 10 mM HEPES (acido 4-(2-idrossietil)-piperazin-1-etansulfonico) (Cambrex), 200 U/ml Penicillina, 200 µg/ml Streptomicina (Cambrex) e 10% (v/v) siero fetale bovino (FBS, EuroClone Ltd.) precedentemente inattivato al calore (56 °C per 30 minuti).

1.2 Linee leucemiche

Jurkat: linea leucemica T umana, CD4⁺, mantenuta in terreno RPMI 1640 (Euroclone) addizionato con 2 mM L-Glutammina (Cambrex), 10 mM HEPES (acido 4-(2-idrossietil)-piperazin-1-etansulfonico) (Cambrex), 200 U/ml Penicillina, 200 µg/ml Streptomicina (Cambrex) e 10% (v/v) siero fetale bovino (FBS, EuroClone Ltd.) precedentemente inattivato al calore (56 °C per 30 minuti).

1.3 293T

Linea cellulare di carcinoma renale umano ad elevata trasfettabilità ed espressione di transgeni. Mantenuta in coltura in terreno DMEM addizionato con 2 mM L-Glutammina (Cambrex), 10 mM HEPES (acido 4-(2-idrossietil)-piperazin-1-etansulfonico) (Cambrex), 200 U/ml Penicillina, 200 µg/ml Streptomicina (Cambrex) e 10% (v/v) siero fetale bovino (FBS, EuroClone Ltd.) precedentemente inattivato al calore (56 °C per 30 minuti).

Questa linea è stata usata come cellula di *packaging* per la produzione di particelle virali.

Tutte le linee cellulari sono state cresciute e mantenute in coltura in fiasche da 25, 75 o 175 cm² (Falcon, Becton Dickinson) in incubatore termostato a 37 °C, al 5% di CO₂ e 95% di umidità.

2. PBMC

Tutti i PBMC utilizzati nello studio sono stati separati secondo gradiente di Ficoll Paque (GE, Healthcare) da 20-30 ml di sangue da *buffy coat* di donatori sani. Le cellule mononucleate ottenute sono state seminate alla concentrazione di 1x10⁶ cellule/pozzetto (in 1 mL) in piastre

da 24 (Falcon), attivate per 48 ore con OKT-3 alla concentrazione finale di 50ng/mL e IL-2 300 U.I./mL (Proleukin Chiron Corporation) prima della trasduzione.

In alternativa, la trasduzione con vettori virali è stata effettuata contestualmente o dopo 72 ore dall'attivazione, mantenendo OKT-3 e IL-2 alle concentrazioni già indicate (50ng/mL e 300 U.I./mL, rispettivamente).

I PBMC sono stati mantenuti in coltura utilizzando terreno RPMI 1640 (Euroclone Ltd.) addizionato con 2 mM L-Glutammina (Cambrex), 10 mM HEPES (acido 4-(2-idrossietil)-piperazin-1-etansulfonico) (Cambrex), 200 U/ml Penicillina, 200 µg/ml Streptomicina (Cambrex) e 10% (v/v) siero fetale bovino (FBS, EuroClone Ltd.) precedentemente inattivato al calore (56 °C per 30 minuti).

3. GENERAZIONE DEL COSTRUTTO CAR ANTI-hPSMA

Il recettore chimerico anti-hPSMA contiene la sequenza completa del scFv anti-hPSMA (da un mAb anti-hPSMA, clone D2B), ottenuta presso il laboratorio del Prof. Colombatti (Università di Verona). Tale sequenza è stata clonata nel vettore pSecTag2A (Invitrogen) tra i siti di restrizione SfiI e NotI del multiple cloning site (MCS). Il MCS del plasmide pSecTag2A è compreso tra le sequenze Leader della catena murina Ig kappa V-J2-C al 5' e del myc Tag al 3'. Il clonaggio ha quindi generato una sequenza Leader-scFv-myc utilizzata per successivi passaggi di costruzione del CAR. In particolare, il frammento Leader-scFv-myc è stato amplificato mediante PCR e inserito nel costrutto pBS SKII tra i siti XbaI e HindIII della regione MCS precedentemente modificata. La regione transmembrana/intracellulare del CAR è costituita da una porzione della molecola CD28 (basi 438-759) e dalla porzione intracellulare della catena CD3ζ (regione 227-563). Le singole sequenze sono state ottenute mediante PCR su cDNA di cellule T CD4⁺ EBV-specifiche utilizzate nel nostro laboratorio, quindi fuse mediante ulteriore reazione di PCR. Il prodotto di fusione è stato digerito con gli enzimi HindIII e SalI ed infine ligato nel vettore pBS SKII sopra descritto, a valle del frammento Leader-scFv-myc. La corretta sequenza dell'intero segmento codificante il CAR è stata confermata mediante reazione di sequenziamento. Per dimostrare che il costrutto genico di fusione fosse in grado, se inserito in cellule eucariotiche, di condurre la sintesi e l'espressione in membrana del CAR, abbiamo subclonato l'intero frammento nel vettore pcDNA3.1-G418 (Invitrogen).

Per generare vettori lentivirali codificanti il CAR anti-hPSMA, l'intero costrutto genico ottenuto come descritto è stato inserito in un vettore commerciale (GENEART) contenente adeguati siti di restrizione.

4. VETTORI

- Vettori di packaging (Figura 9)

pMDLg/pRRE: vettore lentivirale di packaging codificante per i geni 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.

pRSV-Rev: vettore lentivirale di packaging codificante per la proteina Rev di HIV-1.

pMD2.VSV-G: vettore *envelope* usato per pseudotipizzare le particelle virali con proteine VSV-G).

pADVantage: plasmide che aumenta l'efficienza di produzione virale.

- Vettori di trasferimento (Figura 9)

#945.pCCL.sin.cPPT.SV40pA.eGFP.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre: vettore SIN derivato da HIV-1 in cui la regione U3 dell'LTR in 3' risulta deleta, contenente un promotore bidirezionale; il gene reporter eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) è sotto il controllo del promotore minCMV, mentre il gene DeltaLNGFR è sotto il controllo del promotore hPGK. Le sequenze aggiuntive cPPT e WPRE sono responsabili di un aumento di espressione dei transgeni.

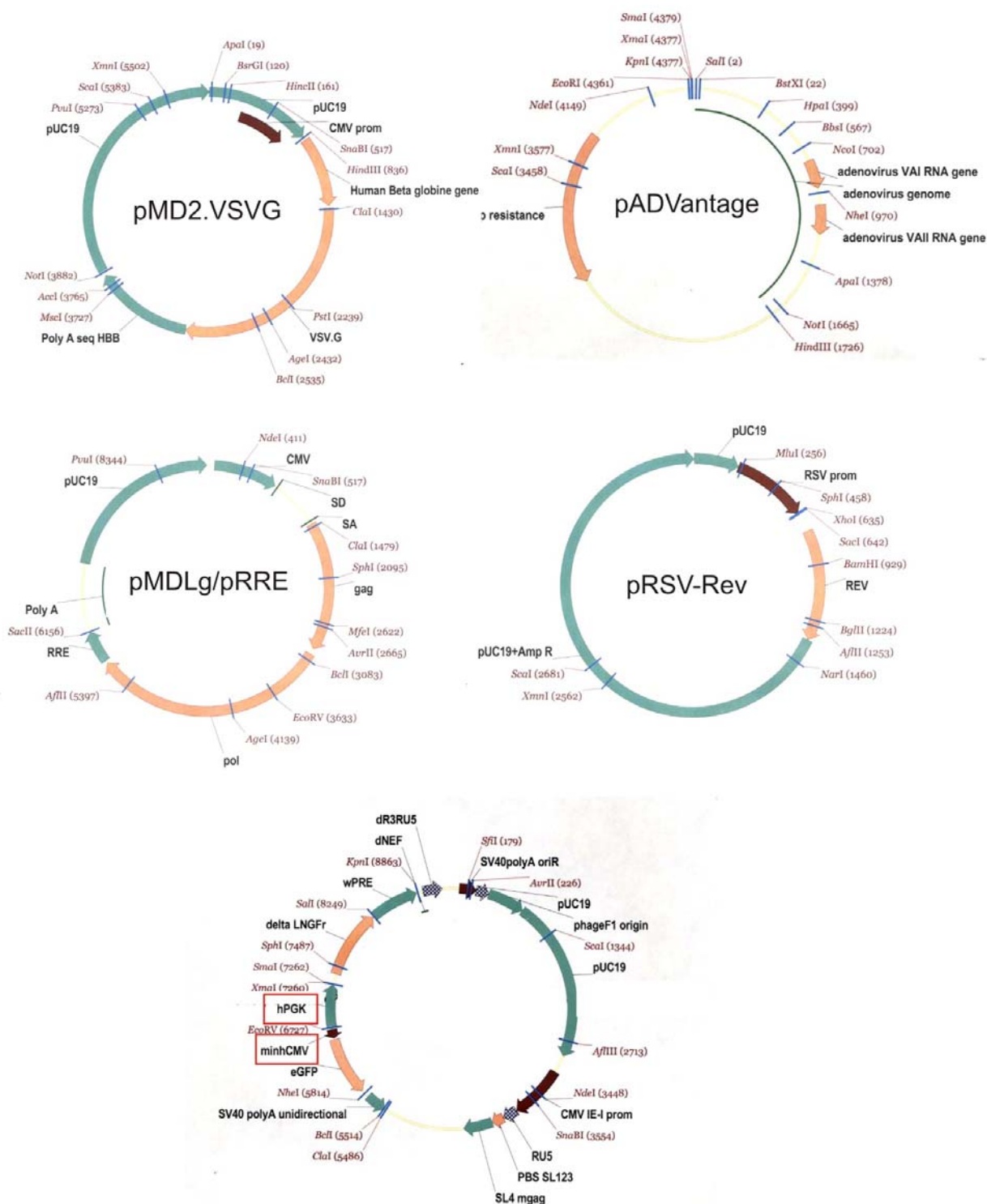
I costrutti per la generazione di vettori lentivirali sono stati gentilmente forniti dal Dr. Luigi Naldini (DIBIT, Milano).

- altri vettori (pcDNA3.1, pMK-minCMV-Luciferase2, pMA-CAR anti-hPSMA)

pcDNA3.1: plasmide codificante CAR anti-hPSMA, da utilizzare per la trasfezione di linee cellulari eucariotiche.

pMA-CAR anti-hPSMA (o pMA-T-body): plasmide commerciale (GENEART) in cui il costrutto CAR anti-hPSMA è stato inserito tra i siti di restrizione RsrII (5') e SalI (3'); utilizzato per il successivo clonaggio nel vettore lentivirale di trasferimento, sotto il controllo del promotore hPGK (Figura 10)

pMK-minCMV.Luciferase2: plasmide commerciale (GENEART) in cui la sequenza genica minCMV.*Firefly Luciferase* (minCMV.fluc) è stata inserita tra i siti di restrizione NheI (5') ed EcoRV (3'), per il successivo clonaggio nel vettore lentivirale di trasferimento (Figura 10)



#945.pCCL.sin.cPPT.SV40polyA.eGFP.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre

Figura 9. Mappe dei plasmidi lentivirali utilizzati per la produzione di particelle virali

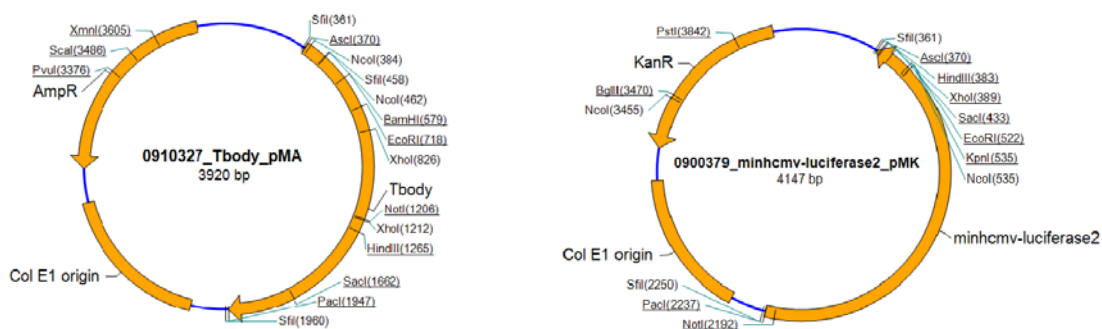


Figura 10. Mappe dei plasmidi commerciali *pMA-CAR anti-hPSMA* e *pMK-minCMV.Luciferase2*.

5. TRASFERIMENTO GENICO DI CAR ANTI-hPSMA MEDIANTE TRASFEZIONE IN CELLULE 293T

Le cellule 293T sono state trasfettate con pcDNA3.1 codificante CAR anti-hPSMA utilizzando il kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen), secondo le indicazioni del produttore. Brevemente, al giorno 0, cellule 293T (1×10^6) sono state piastrate in pozzetto di piastra p6 (Falcon), in 2 ml di terreno completo; il giorno successivo, il terreno è stato rimpiazzato con terreno OptiMem (2 ml) e 500 μ l di una mix DNA-Lipofectamina (1:2,5 4 μ g di DNA e 10 μ l di Lipofectamina) sono stati aggiunti alle cellule, goccia a goccia. Dopo un'incubazione di 6 ore a 37 °C, la mix è stata rimpiazzata con terreno completo. Ventiquattro ore dopo la trasfezione, le cellule sono state staccate con DMEM 5mM EDTA e analizzate al citofluorimetro per valutare l'espressione di CAR anti-hPSMA. Sono stati inoltre preparati pellet da 5×10^5 cellule da congelare a -80 °C per la successiva analisi mediante Western Blotting.

6. WESTERN BLOTTING

Il *Western Blotting* permette l'individuazione di proteine su una membrana a seguito della loro separazione in base al peso molecolare e al loro trasferimento sulla membrana stessa. Tale tecnica è stata usata per l'identificazione del CAR anti-hPSMA nelle cellule 293T trasfettate con pcDNA3.1-CAR anti-hPSMA.

L'estrazione delle proteine cellulari (dalle cellule 293T, 293T trattate con Lipofectamina e 293T trasfettate con pcDNA3.1-CAR anti-hPSMA), è stata eseguita mediante lisi di 5×10^5 cellule/campione in *loading buffer* (2X *Loading Buffer* (LB) 50 μ M Tris HCl pH 6.8; 2% sodio dodecil solfato, SDS; 2% β -Mercaptoetanolo; 10% glicerolo; 0,1-0,05% Blu di Bromofenolo) a 100 °C per 5 minuti e di seguito a RT per 5 minuti. I campioni sono stati caricati nei pozzetti di

un gel precast (Invitrogen) al 10% di poliacrilamide, utilizzando il marker di corsa Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

Per la corsa elettroforetica è stato usato un tampone così costituito: 25 mM Tris HCl; 190 mM glicina; 0,1% SDS; pH 8,5-9. Le condizioni di corsa sono state le seguenti: 2h a 3500V, 8 mA, 200 W a temperatura ambiente (r.T.).

Prima del trasferimento (*blotting*) delle proteine dal gel su una membrana di PVDF (polivinilidene difluoruro, Immobilon-P, Millipore), la membrana deve essere rinaturata in metanolo per 1 minuto, reidratata in acqua bidistillata ed infine riequilibrata nel tampone di trasferimento, costituito dal tampone di corsa per proteine contenente il 20% di metanolo. Il blotting è stato effettuato overnight (o.n.) (3500 V, 250 mA, 200 W a 4 °C). Terminato il trasferimento, la membrana è stata lavata in TBS 1X (154 mM NaCl (Sigma), 10 mM Tris base (Fluka)) Tween 0.1% (polyoxyethylene-sorbitan mono-laurato, Sigma) (TBS-T) per eliminare eventuali residui di gel ed è stata incubata per un'ora in agitazione con Milk (Sigma) al 3% in TBS-T, per saturare i siti di legame aspecifico. Dopo alcuni lavaggi con TBS-T, la membrana è stata incubata per un'ora, in agitazione, con l'anticorpo primario specifico per c-myc, diluito 1:1000 in TBS-T (*mouse anti c-myc monoclonal antibody* 2mg/ml, Sigma-Aldrich). Dopo alcuni lavaggi con TBS-T per eliminare l'anticorpo in eccesso, la membrana è stata incubata per un'ora con l'anticorpo secondario (*goat HRP-conjugated anti-mouse α -IgG*, Amersham) diluito 1:10000 in Milk. Al termine dell'incubazione, dopo alcuni lavaggi, si è proceduto alla rivelazione delle proteine immobilizzate sulla membrana, incubando la membrana con SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology) per 5 minuti. La membrana è stata poi analizzata utilizzando lo strumento BioRad (Life Science Group), con un'esposizione di 10 minuti.

7. GENERAZIONE DI COSTRUTTI LENTIVIRALI

7.1 Clonaggio di minCMV-Luciferasi in vettore lentivirale di trasferimento

La sequenza genica codificante minCMV-Luciferasi è stata ottenuta dal plasmide **pMK-minCMV.Luciferase2** (GENEART) mediante digestione doppia EcoRV/NheI (New England BioLabs), inattivazione della reazione al calore, corsa elettroforetica del prodotto di reazione e successiva estrazione della banda da gel (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN): la banda corrispondente a minCMV-Luciferasi è di 1852 bp. Gli stessi enzimi sono stati utilizzati per digerire il vettore lentivirale di trasferimento #945.pCCL.sin.cPPT.SV40polyA.eGFP.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre (bande attese 8370 bp e 913 bp, la seconda corrispondente a minCMV.eGFP); il vettore è stato

successivamente defosforilato (con Antarctic Phosphatase, New England BioLabs). L'inserto minCMV.Luciferasi e il vettore lentivirale sono quindi stati incubati per una reazione di ligazione o.n. a 4 °C (con T4 DNA Ligasi, New England BioLabs). Il giorno successivo, batteri AG1 competenti sono stati trasformati con il prodotto di ligazione, il DNA estratto secondo il protocollo mini prep (QIAGEN) e analizzato con digestione enzimatica. Il vettore lentivirale che presenta il nuovo inserto minCMV.Luciferasi (10222 bp) genera, dopo digestione doppia EcoRV/NheI, 2 frammenti di 1852bp (corrispondente a minCMV.Luciferasi) e 8370 bp. La digestione sequenziale con gli enzimi RsrII e SalI genera invece frammenti di 9325 bp e 897 bp (corrispondente a deltaLNGFR). Il nuovo vettore di trasferimento così ottenuto è stato indicato come

#945pCCL.sin.cPPT.SV40ployA.**fluc**.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre

7.2 Clonaggio di CAR anti-hPSMA in vettori lentivirali di trasferimento

La sequenza genica codificante CAR anti-hPSMA è stata ottenuta dal plasmide **pMA-CAR anti-hPSMA** mediante digestione sequenziale RsrII/SalI (New England BioLabs), inattivazione della reazione al calore, corsa elettroforetica del prodotto di reazione e successiva estrazione della banda da gel (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN): la banda corrispondente al CAR anti-hPSMA è di 1560 bp. Gli stessi enzimi sono stati utilizzati per digerire i vettori lentivirali di trasferimento #945.pCCL.sin.cPPT.SV40ployA.**eGFP**.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre (bande attese 8386 bp e 897 bp, la seconda corrispondente a deltaLNGFR) e #945.pCCL.sin.cPPT.SV40ployA.**fluc**.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre (bande attese 9325 bp e 897bp, la seconda corrispondente a deltaLNGFR); i vettori sono stati successivamente defosforilati (con Antarctic Phosphatase, New England BioLabs). L'inserto CAR anti-hPSMA è stato quindi incubato con ciascuno dei due diversi vettori lentivirali di trasferimento per una reazione di ligazione o.n. a +4 °C (con T4 DNA Ligasi, New England BioLabs). Il giorno successivo, batteri AG1 competenti sono stati trasformati con i prodotti di ligazione, il DNA estratto secondo il protocollo mini prep (QIAGEN) e analizzato con digestione enzimatica. Sono stati così generati due diversi costrutti lentivirali esprimenti CAR anti-hPSMA, indicati come:

vettore CAR anti-hPSMA/eGFP: vettore di trasferimento codificante CAR ed eGFP;

vettore CAR anti-hPSMA/fluc: vettore di trasferimento codificante CAR e Luciferasi.

In Tabella 5 sono riportati i pattern di digestione attesi per i plasmidi utilizzati o ottenuti al termine del clonaggio.

Plasmide	Dimensione (bp)	RsrII/SalI	EcoRV/NheI
#945.pCCL.sin.cPPT.SV40ployA.eGFP.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre	9283	8386/897	8370/913
#945.pCCL.sin.cPPT.SV40ployA.fluc.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre	10222	9325/897	8370/1852
vettore CAR anti-hPSMA/eGFP	9946	8386/1560	9033/913
vettore CAR anti-hPSMA/fluc	10885	9325/1560	9033/1852
pMA-CAR anti-hPSMA	3920	2360/1560	
pMK-minCMV.Luciferase2	4147		2295/1852

Tabella 5. Pattern di digestione dei vettori utilizzati.

Tutti i plasmidi sono stati espansi mediante trasformazione e coltura di batteri E.Coli del ceppo AG1, resi competenti per la trasformazione mediante shok termico. I vettori utilizzati per la produzione delle particelle virali sono stati purificati mediante EndoFree Plasmid Mega Kit (QIAGEN), allo scopo di ottenere DNA puro e concentrato.

7.3 Sequenziamento

Dopo aver verificato il corretto pattern di digestione dei vettori CAR anti-hPSMA/eGFP e CAR anti-hPSMA/fluc, ottenuti al termine del clonaggio, il DNA è stato sequenziato per escludere l'inserimento di mutazioni, prima di procedere con la produzione delle particelle virali. In Tabella 6 si riportano i primer utilizzati per il sequenziamento:

vettore CAR anti-hPSMA/eGFP	vettore CAR anti-hPSMA/fluc	
FOR 1: ACCTTCTCAGTCTCTGTC	FOR 1: ACCTTCTCAGTCTCTGTC	FOR A: TCTTATCATGTCTGGATCTC
FOR 2: TGAGAAGAGCAATGGAAC	FOR 2: TGAGAAGAGCAATGGAAC	FOR B: CGGTTGTTACTTGACTGG
FOR 3: TAGGACGAAGAGAGGAGT	FOR 3: TAGGACGAAGAGAGGAGT	FOR C: CATAGGACCTCTCACACA
FOR 4: TGTGGAGCAAGTGAGAAT	FOR 4: TGTGGAGCAAGTGAGAAT	FOR D: TAATCTGAAGGCTCCTC
FOR 5: ACTCTGGTCACTGTCTCG	FOR 5: ACTCTGGTCACTGTCTCG	FOR E: GATGAGATGTGACGAACG
FOR 6: GGTGTTCCGCATTCTG	FOR 6: GGTGTTCCGCATTCTG	FOR F: CTTATGCAGTTGCTCTCC
REV: ACGAGTGATGGAGAT TCG	REV: ACGAGTGATGGAGAT TCG	

Tabella 6. Primer utilizzati per il sequenziamento.

8. PRODUZIONE VIRALE

Per la produzione delle particelle virali, di seguito indicate come LV CAR anti-hPSMA/eGFP o LV CAR anti-hPSMA/fluc, è stato utilizzato un sistema di produzione di terza generazione, che utilizza 5 plasmidi per la trasfezione di cellule di *packaging*. Cellule della linea 293T (9×10^6) sono state piastrate e coltivate in fiasche da 175 cm² (Falcon, Becton Dickinson) per 24 ore in

terreno completo; il terreno è stato quindi rimosso e le cellule trasfettate mediante la tecnica della coprecipitazione con calcio-fosfato, utilizzando le seguenti quantità di DNA per ciascuna fiasca:

9 µg di pMD2.VSVG

12,5 µg di pMDLg/pRRE

6,25 µg di pRSV-Rev

15 µg di pADVantage

32 µg di vettore di trasferimento.

Una soluzione contenente il DNA plasmidico, 125 µl di CaCl₂ 2,5M (Sigma) e TE/H₂O (2:1) al volume finale di 1250 µl è stata mantenuta 5 minuti a temperatura ambiente e successivamente aggiunta, goccia a goccia, a 1250 µl di tampone HBS 2X (Sigma), mantenendo il tutto in agitazione con vortex. Il precipitato così ottenuto è stato immediatamente aggiunto, goccia a goccia, nella fiasca di coltura.

Dopo 12-14 ore di incubazione, il mix è stato sostituito con 16 ml di terreno completo addizionato con Sodio Butirrato (Sigma) 1 mM. A 30 ore dal cambio del terreno il sovrnatante virale è stato raccolto, centrifugato 10 minuti a 3000 rpm (1500g) e filtrato con filtro 0,45µm di diametro, per rimuovere cellule e detriti. Il surnatante virale così ottenuto, non concentrato, è stato aliquotato e conservato a -80 °C. In alternativa, se necessario, il surnatante virale è stato concentrato mediante ultracentrifugazione a 7600g per 2 ore a 4 °C, risospeso in terreno RPMI semplice e conservato a -80 °C.

8.1 Titolazione delle preparazioni virali

1. 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 presenti nei surnatanti virali. Il titolo ottenuto nelle diverse produzioni, espresso in termini di concentrazione di particelle virali, è stato in media di 70-80 µg p24/ml per LV CAR anti-hPSMA/eGFP e di 50-60 µg p24/ml per LV CAR anti-hPSMA/fluc (valori riferiti a produzioni virali concentrate 100X).
2. Nel caso di LV CAR anti-hPSMA/eGFP è stato possibile effettuare anche una titolazione citofluorimetrica utilizzando cellule 293T trasdotte con diluizioni scalari del surnatante virale non concentrato. Brevemente, 10⁵ cellule 293T vengono piastrate in pozzetto di p6 (Falcon) al giorno 0; al giorno 1 viene aggiunto il surnatante virale a diverse concentrazioni, in presenza di 8µg/ml di solfato di protamina (SIGMA), in un

1 ml di terreno completo; il giorno 2 il virus viene diluito 1:2 con terreno completo e lasciato in incubazione per 72 ore. Al momento dell'analisi citofluorimetrica, le cellule vengono staccate, lavate, fissate (PBS 1% formaldeide, 15 minuti in ghiaccio) e risospese in tampone da citofluorimetria per la lettura.

Il titolo della preparazione virale non concentrata, espresso in Unità Trasducenti/ml (TU/ml), è stato calcolato utilizzando la seguente formula:

$$\text{TU/ml} = \% \text{ eGFP}^+ \times (2 \times 10^5) \text{ cellule} \times \text{diluizione del virus}$$

considerando una percentuale di positività compresa tra 15 e 30% (condizione in cui ogni cellula è infettata da un virione), ed essendo 2×10^5 le cellule in piastra al momento della trasduzione.

Nel caso di LV CAR anti-hPSMA/eGFP abbiamo ottenuto un titolo medio pari a 21×10^6 TU/ml.

L'infettività viene calcolata infine come rapporto tra TU e ng di p24; nel nostro caso questo valore è stato in media di $2,7 \times 10^4$ TU/ng di p24, valore in linea con i dati di letteratura¹⁴⁹. Nel caso di LV CAR anti-hPSMA/fluc, il titolo TU/ml è stato ricavato solo indirettamente ($14-15 \times 10^6$ TU/ml).

Per ogni trasduzione si definisce MOI il rapporto tra TU e numero assoluto di cellule trasdotte.

Nel nostro caso è stata utilizzata una MOI 100 per la trasduzione di PBMC umani con LV CAR anti-hPSMA/eGFP, mentre LV CAR anti-hPSMA/fluc è stato utilizzato alla concentrazione 20X.

9. TRASFERIMENTO GENICO DI CAR ANTI-hPSMA IN CELLULE T JURKAT MEDIANTE TRASDUZIONE CON VETTORI LV

Il trasferimento genico del CAR anti-hPSMA in cellule della linea Jurkat è stato condotto incubando 2×10^5 cellule per pozzetto in piastre p24 (Falcon) con 1 ml di sovranatante virale (LV CAR anti-hPSMA/eGFP o LV CAR anti-hPSMA/Luciferasi) non concentrato in presenza di 8 µg/ml di solfato di protamina (Sigma), a 37 °C, 5% CO₂, per 15 ore. Il giorno successivo, le cellule sono state lavate e risospese in terreno completo. Cellule T Jurkat non trasdotte sono state utilizzate come controllo negativo.

L'analisi citofluorimetrica per valutare l'espressione del CAR è stata condotta a varie tempistiche dalla trasduzione: 72 ore, 7 giorni, 14 giorni, 28 giorni, 2 mesi, 3 mesi.

L'espressione di Luciferasi è stata invece valutata tramite BLI, analizzando 2×10^5 cellule/campione, con lo strumento IVIS Lumina II (Caliper/Xenogen).

10. TRASFERIMENTO GENICO DI CAR ANTI-hPSMA IN LINFOCITI T PRIMARI MEDIANTE TRASDUZIONE CON VETTORI LV

Il protocollo di trasduzione dei PBMC umani con vettori lentivirali è stato messo a punto sulla base di dati di letteratura e della precedente esperienza di laboratorio¹⁸⁷.

Inizialmente sono comunque state effettuate alcune prove di trasduzione di PBMC attivati con OKT-3 e IL-2 (vedi paragrafo PBMC), variando la durata del periodo di attivazione (0, 48, 72 ore), il numero di cellule infettate (1×10^6 , 10×10^6), la concentrazione del virus e la metodica di trasduzione, per valutare quale protocollo permettesse di generare, in tempi brevi, un elevato numero di linfociti con buona espressione del CAR, fenotipo poco differenziato, capacità proliferativa e funzionalità citotossica.

Metodica spinoculation: protocollo di trasduzione che prevede: i) sostituzione del terreno di coltura in piastra p24 con preparazione virale in presenza di $8 \mu\text{g/ml}$ di solfato di protammina (Sigma) e 100 U/ml di IL-2; ii) centrifugazione di 60 minuti a $550g$, seguita da un'incubazione o.n. a 37°C , $5\% \text{ CO}_2$; iii) ripristino del terreno completo di coltura addizionato con IL-2.

Le colture T cellulari caratterizzate fenotipicamente e funzionalmente ed impiegate per gli studi di trasferimento adottivo *in vivo* sono state generate secondo il seguente protocollo di trasduzione: 1×10^6 PBMC attivati per 48 ore con OKT-3 (50 ng/ml) e IL-2 (300 U/ml) sono stati risospesi in $200 \mu\text{l}$ di sovrantante virale concentrato e incubati in tubi da 14 ml in polistirene (Falcon) per 1 ora a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$, in presenza di $40 \mu\text{g}$ (5X) di solfato di protammina e 500 U/ml (5X) di IL-2. Dopo 1 ora le cellule sono state portate a 1 ml finale di terreno completo, trasferite in pozzetti di p24 e incubate a 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ per 18 ore (MOI finale 100 per LV CAR anti-hPSMA/eGFP e 300 per LV CAR anti-hPSMA/fluc). Al termine dell'incubazione, il surnatante virale è stato eliminato e rimpiazzato con terreno completo addizionato con 100 U/ml di IL-2. Dopo 72 ore i PBMC sono stati raccolti, lavati (10 min a $250g$) e analizzati per l'espressione del CAR, di eGFP (analisi citofluorimetrica) e di Luciferasi (analisi BLI); infine, è stato ottimizzato un protocollo di espansione *in vitro* che prevedeva una prima stimolazione antigene-specifica dopo 7 giorni dall'attivazione iniziale.

I PBMC trasdotti con CAR anti-hPSMA vengono indicati anche come T-body-hPSMA/eGFP, se esprimenti eGFP e T-body-hPSMA/fluc, se esprimenti Luciferasi.

11. STIMOLAZIONE ANTIGENICA DEI LINFOCITI T TRASDOTTI CON CAR ANTI-hPSMA

I T-body-hPSMA sono stati ristimolati una volta la settimana *in vitro* con cellule di carcinoma prostatico umano LNCaP (hPSMA⁺), irradiate 60Gy. I PBMC sono stati coltivati in piastre da 24 pozzetti, in 2 ml di terreno RPMI completo (vedi paragrafo PBMC) addizionato con 100U/ml di IL-2; ogni pozzetto conteneva 1×10^6 PBMC e 1×10^5 cellule *feeder* LNCaP (rapporto 1:10 cellule target:PBMC). A metà settimana, i PBMC venivano raccolti, lavati e seminati nuovamente alla concentrazione di 5×10^5 cellule/ml, in presenza di IL-2 (100U/ml).

12. ANALISI CITOFLUORIMETRICHE

Le cellule trasdotte sono state analizzate in citofluorimetria per valutare l'espressione dei transgeni a partire da 72 ore dal termine del ciclo di trasduzione, per consentire l'espressione stabile a livelli di equilibrio del transgene ed escludere fenomeni di pseudotrasduzione, ossia la rilevazione di fluorescenza dovuta a proteine transgeniche sintetizzate dalle cellule di *packaging* e incorporate nelle particelle vettore o alla sintesi di geni dei plasmidi non integrati. L'intensità di fluorescenza è stata valutata con lo strumento FACSCalibur (Becton Dickinson) e analizzata mediante software CellQuest (BD Biosciences). Durante i vari passaggi della marcatura citofluorimetrica, i reagenti e la centrifuga sono stati mantenuti alla temperatura costante di 4 °C. Le marcature con anticorpi e la risospensione finale delle cellule per la lettura sono stati effettuati in tampone da citofluorimetria (Phosphate Buffered Saline, PBS 1X (Oxoid) contenente 2% BSA (Sigma) e 0,02% sodio azide, NaN₃ (Sigma)). Al termine delle marcature e subito prima dell'analisi allo strumento tutte le cellule trasdotte sono state fissate con PBS 1% formaldeide, per 15 minuti in ghiaccio.

12.1 Valutazione dell'espressione di eGFP

L'espressione di eGFP nei PBMC trasdotti con LV CAR anti-hPSMA/eGFP è stata valutata al citofluorimetro direttamente su campioni cellulari centrifugati (10 minuti a 250g), fissati e risospesi in tampone da citofluorimetria.

12.2 Valutazione dell'espressione di superficie del CAR anti-hPSMA

L'espressione di superficie del CAR è stata valutata in citofluorimetria sfruttando la presenza dell'epitopo di riconoscimento c-myc inserito nella struttura del CAR; sono state analizzate in questo modo tutte le cellule esprimenti CAR (293T trasfettate, Jurkat trasdotte, PBMC umani trasdotti), a varie tempistiche dalla trasduzione e in presenza/assenza di stimolazione antigenica.

$2-5 \times 10^5$ cellule/campione sono state marcate con anticorpo primario anti c-myc (Clone 9E10, SIGMA o, in alternativa, ibridoma 9E10) o controllo isotipico (mouse IgG1 UNLB, Southern Biotech) e successivamente anticorpo secondario coniugato con ficoeritrina (Goat anti-mouse IgG1 RPE Human adsorbed, Southern Biotech); nel caso delle cellule 293T è stato utilizzato un anticorpo secondario coniugato con fluorosceina isotiocianato (Policlonal Rabbit anti-mouse FITC, Dako). Gli anticorpi sono stati utilizzati secondo le modalità indicate dai produttori; le cellule sono state marcate 30 minuti in ghiaccio, lavate con PBS 1X, fissate e risospese in tampone da citofluorimetria per l'analisi allo strumento.

Campioni di cellule non trasdotte e marcate allo stesso modo sono stati assunti come controlli negativi negli esperimenti di trasduzione, e indicati come mock; i controlli isotipici dei reagenti di marcatura sono stati utilizzati al fine di stabilire con precisione i parametri di lettura al citofluorimetro.

Nel caso di marcatura per altre molecole di superficie (Vedi paragrafo 12.3), gli anticorpi specifici sono stati aggiunti dopo la marcatura con anticorpo secondario.

12.3 Valutazione dell'espressione di molecole di superficie

Altre analisi citofluorimetriche sono state condotte marcando le cellule con mAb diretti contro molecole di superficie, valutandone l'espressione singolarmente sulla cellula o contemporaneamente all'analisi dell'espressione di c-myc. Gli anticorpi utilizzati secondo le modalità indicate dai produttori sono stati: anti-CD8 APC (Biolegend), anti-CD4 APC (Biolegend), anti-CD62L FITC (Biolegend), anti-CD27 FITC (Biolegend), anti-CD28 FITC (Biolegend), anti-CD57 FITC (Biolegend), anti-IL-7R α PE (CD127, Becton Dickinson), anti-CCR-7 FITC (eBioscience) e i rispettivi controlli isotipici acquistati presso le stesse ditte.

12.4 Analisi intracitoplasmatica dell'IFN- γ

La produzione di IFN- γ da parte dei PBMC trasdotti è stata valutata tramite marcatura intracitoplasmatica con l'utilizzo del kit Cytofix/Cytoperm Plus Golgi Stop (BD Pharmingen), del mAb anti-IFN- γ umano coniugato con FITC (IOtest) e del controllo isotipico IgG1 mouse FITC (IOtest). L'analisi è stata condotta a 72 ore dalla trasduzione su T-body-hPSMA/fluc e la produzione della citochina è stata valutata in condizioni basali (T-body non stimolati), in presenza di cellule tumorali PC-3-hPSMA (stimolo antigenico), di cellule PC-3 (non esprimenti l'antigene) e di uno stimolo massimale, costituito da PMA (forbolo12-miristato 13-acetato, 40 ng/ml; Sigma) e Ionomicina (4 μ g/ml; Sigma). La marcatura con anticorpo anti-IFN- γ è stata eseguita in singola sulla popolazione stimolata, poichè lo stimolo antigenico porta ad una diminuzione dell'espressione del CAR in membrana. La stimolazione è stata eseguita come

segue: 1×10^6 T-body sono stati seminati in piastre da 24 pozzetti in rapporto 1:1 con eventuali cellule bersaglio e incubati 15 ore a 37 °C, 5% CO₂ in un volume finale di 2 ml di terreno completo addizionato con monensina (Golgi Stop), un inibitore del trasporto intracellulare che blocca il rilascio di citochine da parte della cellula (1,3µl/pozzetto). Terminata l'incubazione, 5×10^5 cellule/campione sono state lavate, risospese in PBS 1mM EDTA (l'EDTA (Sigma) è un chelante del calcio che favorisce la disaggregazione di eventuali aggregati cellulari) e incubate 15 minuti a 37 °C, 5% CO₂. Al termine dell'incubazione e dopo un ulteriore lavaggio, le cellule sono state risospese in 1 ml di PBS 10% FBS (per saturare i siti di legame aspecifico) ed incubate 10 minuti r.T.. Dopo un ulteriore lavaggio in PBS si è proceduto con la permeabilizzazione delle cellule (incubazione di 20 minuti in ghiaccio in 250µl di Cytofix/Cytoperm) a cui sono seguiti due lavaggi successivi in Perm/Wash; infine è stata eseguita la marcatura con anticorpo anti-IFN-γ FITC (e relativo controllo isotipico), in un volume di 50µl di Perm/Wash per 15 minuti a r.T., al buio. Al termine della marcatura le cellule sono state lavate due volte con PBS e risospese in tampone da citofluorimetria per la lettura.

12.5 Valutazione dell'espressione di superficie dell'antigene hPSMA in cellule tumorali

L'espressione dell'antigene hPMSA è stata valutata sia nelle linee cellulari di carcinoma prostatico mantenute in coltura, sia nelle masse tumorali indotte dall'inoculo s.c. di PC-3-hPSMA. Le masse tumorali sono state espianate e digerite 1 ora a 37 °C, 5% CO₂, utilizzando una soluzione digestiva contenente DNasi (270 I.U./ml), Ialuronidasi (70 I.U./ml) e Collagenasi (200 I.U./ml). Al termine dell'incubazione, il tutto è stato filtrato e lavato per ottenere una sospensione di cellule tumorali.

$2-5 \times 10^5$ cellule/campione sono state marcate, in 50µl di tampone da citofluorimetria, con anticorpo anti-hPSMA (clone D2B da ibridoma) o controllo isotipico mouse IgG1, seguiti da anticorpo secondario coniugato con ficoeritrina (Goat anti-mouse IgG1 RPE Human adsorbed, Southren Biotech); le cellule sono state marcate 30 minuti in ghiaccio, lavate con PBS 1X e risospese in tampone da citofluorimetria per l'analisi allo strumento. In alternativa alla marcatura indiretta, è stato utilizzato l'anticorpo anti-hPSMA (clone D2B da ibridoma) coniugato al fluoroforo Alexa680 (GE, Healthcare).

13. SAGGIO DI RILASCIO DI ^{51}Cr

L'attività litica dei PBMC trasdotti con CAR anti-hPSMA è stata valutata mediante saggio di citotossicità a breve termine, utilizzando come bersagli cellulari differenti linee tumorali di carcinoma prostatico: PC-3-hPSMA, LNCaP, PC-3.

Le cellule bersaglio sono state marcate per 1 ora a 37 °C, in fondello secco, con 100 µCi di $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$; dopo opportuni lavaggi, le cellule sono state risospese in terreno completo alla concentrazione di $2 \times 10^4/\text{mL}$. 100 µL di ciascuna sospensione cellulare (corrispondenti a 2000 cellule bersaglio) sono stati seminati in triplicato in una piastra da 96 pozzetti fondo ad U (Bibby Sterlin Ltd) in presenza di diluizioni scalari di cellule effettrici (diluizioni 1:2) precedentemente seminate, partendo dal rapporto effettore/target (E/T) di volta in volta indicato. Le piastra sono quindi state incubate a 37 °C per 4 ore al 5% di CO_2 e 95% di umidità.

Successivamente sono stati prelevati 100 µL di surnatante e trasferiti in appositi tubini per misurare la radioattività espressa in cpm (colpi per minuto) utilizzando un contatore per radiazioni γ (Cobra Gamma Counting System, Packard Instrument Company). 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.

14. TOPI

Per gli esperimenti *in vivo* sono stati utilizzati topi SCID 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, 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 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 contro il *non-self*. La mutazione non coinvolge altri elementi 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 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 "Winn Assay" è stato condotto inoculando sotto cute (s.c.) una sospensione di cellule tumorali (5×10^6 /animale) sole o mescolate con cellule T di una coltura di PBMC trasdotti con CAR anti-hPSMA (5×10^6 /animale). In particolare, dopo un'incubazione di 5 minuti in ghiaccio, cellule tumorali e linfociti sono stati mescolati, immediatamente prima dell'inoculo s.c.. I topi sono stati monitorati giornalmente per valutare la crescita della massa tumorale (mediante misurazione, con calibro, dei diametri perpendicolari della massa) e sono stati sacrificati quando le dimensioni del tumore raggiungevano i 400 mm^3 o in presenza di ulcerazioni, secondo le indicazioni del veterinario.

16. TRASFERIMENTO ADOTTIVO DEI LINFOCITI TRASDOTTI

L'efficacia terapeutica delle cellule ingegnerizzate per l'espressione del CAR anti-hPSMA è stata valutata *in vivo* in un modello tumorale ottenuto inoculando topi SCID s.c. con cellule di tumore prostatico umano PC-3-hSPMA (PSMA⁺) o cellule PC-3 (PSMA⁻, come controllo).

Al giorno zero le cellule tumorali sono state lavate, risospese in terreno semplice (RPMI 1640) alla concentrazione di 30×10^6 /mL e inoculate in un volume di 100 μ L, corrispondenti a 3×10^6 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 trasdotti, risospesi in 100 μ L di terreno semplice o, in alternativa, mediante inoculi per via endovenosa (e.v.) di 10×10^6 linfociti T trasdotti, risospesi in 300 μ L di terreno semplice (RPMI 1640). Il gruppo di controllo non ha ricevuto il trasferimento adottivo di cellule T.

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

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

dove:

d = diagonale minore della massa tumorale;

D = diagonale maggiore della massa tumorale.

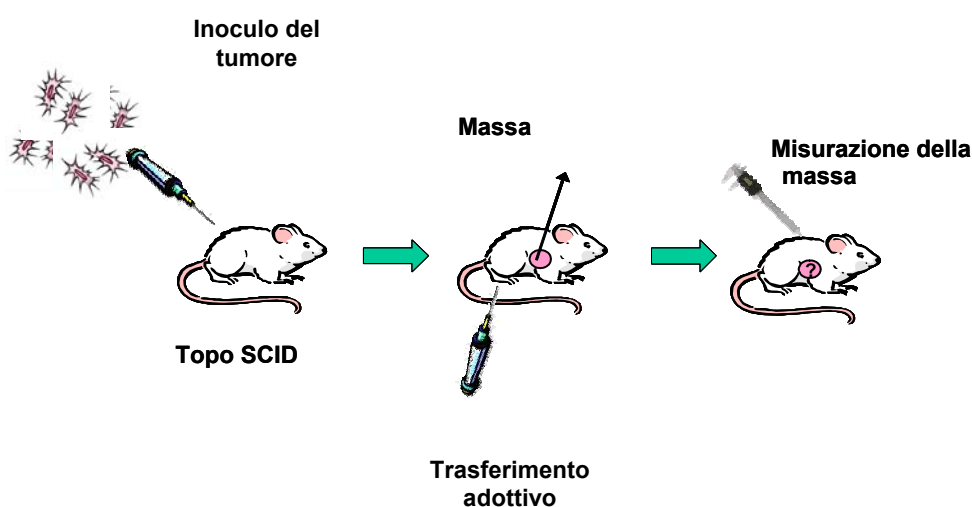


Figura 11. Disegno sperimentale: inoculo di cellule tumorali sottocute in topi SCID e trasferimento adottivo di T-body.

E' stata inoltre valutata la sopravvivenza degli animali, ricorrendo ad eutanasia quando necessario (dimensioni della massa superiori a 400mm³, presenza di ulcerazioni o segni di malattia/tossicità dovuti al trattamento).

Le curve di sopravvivenza ottenute sono state analizzate mediante Log-rank test e i *p-values* calcolati con l'ausilio del programma statistico MedCalc[®] (versione 10.0.2.0).

Tutti gli esperimenti di crescita tumorale *in vivo* sono stati condotti in accordo alle linee guida del UK Co-ordinating Committee Cancer Research (UKCCCR).

17. IMAGING OTTICO (Bioluminescenza)

17.1 Bioluminescenza (BLI)

L'imaging di bioluminescenza rileva l'emissione di luce generata dalla reazione enzimatica di ossidazione di un substrato da parte di una classe di enzimi detti Luciferasi; in questo studio è stato utilizzato l'enzima *Firefly Luciferasi* (fluc) con il relativo substrato D-luciferina. Essendo la produzione di luce legata ad una reazione chimica, il segnale è limitato nel tempo (1-60 minuti, con un picco di segnale a 10-15 minuti) e il substrato deve essere fornito alle cellule esprimenti luciferasi prima di ciascuna analisi di imaging. I tempi di acquisizione sono dell'ordine di minuti, a seconda dei livelli di espressione dell'enzima, della densità cellulare e della profondità del segnale; l'emissione di luce per cellula può essere determinato a priori *in vitro* come parametro di sensibilità, considerando comunque la riduzione di intensità dopo inoculo delle cellule *in vivo*.

17.2 IVIS Lumina II

Le analisi di BLI descritte in questo lavoro sono state eseguite utilizzando lo strumento IVIS Lumina II (Caliper/Xenogen); esso è composto da una camera CCD raffreddata, una camera di imaging con piattaforma mobile e sistema di filtri ottici, sistema di controllo della videocamera, sistema di raffreddamento ed un computer che controlla tutti i componenti dello strumento, utilizzato per guidare le acquisizioni ed analizzare i dati mediante il software Living Image[®] Software (Figura 12).

INSTRUMENT SPECIFICATIONS

Hardware

Field of View (width x length):	5 cm X 5 cm to 12 cm X 12 cm (variable zoom)
Resolution:	50 to 400 μm (based on zoom lens position)
Sensitivity:	100 photons/s/cm ² /sr
Scan Time:	1 to 5 min
Reconstruction Time:	1 to 30 sec
Scans needed for 1 mouse (Nose to Rump):	1 scan (at farthest position) to 3 scans (at nearest position)
Maximum whole Mice per Scan	3

Figura 12. Caratteristiche tecniche dello strumento IVIS Lumina II

17.3 Analisi di cellule esprimenti *Firefly Luciferase*.

2×10^5 cellule/campione sono state lavate, risospese in 50 μl di PBS 1X e trasferite in pozzetto di p96 (utilizzando piastre di plastica nera, PerkinElmer); alle cellule sono stati aggiunti 50 μl di una soluzione di Luciferina (D-Luciferin potassium salt, Caliper Lifesciences) a concentrazione 30 mg/ml in acqua deionizzata. Dopo 10-15 minuti dall'aggiunta del substrato, è stata condotta l'analisi di BLI, utilizzando la piattaforma in posizione A (FOV 4x4cm) e tempi di esposizione

variabili tra 1 secondo e 5 minuti, allo scopo di ottenere un segnale ottimizzato. L'intensità di segnale è stata espressa in termini di $\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$.

17.4 Analisi degli animali.

T-body-hPSMA/fluc sono stati inoculati e.v. in topi portatori di tumore prostatico sottocutaneo e ne è stata monitorata la biodistribuzione e la sopravvivenza a diverse tempistiche: immediatamente dopo l'inoculo e successivamente a 5, 24 e 48 ore dopo l'inoculo.

Brevemente, i topi sono stati anestetizzati (0,4 mg/topo di Zoletil e 0,4 mg/topo di Rompum) e 10 minuti prima dell'analisi di BLI hanno ricevuto, per via intraperitoneale (i.p.), 200 μl di una soluzione di Luciferina (D-Luciferin potassium salt, Caliper Lifesciences) a concentrazione 15 mg/ml in DPBS 1X. Si è utilizzata la piattaforma in posizione D (FOV 12x12 cm), con la possibilità di analizzare 3 animali contemporaneamente per ogni sessione di imaging; il tempo di esposizione utilizzato è stato di 5 minuti e l'intensità di segnale è stata espressa in termini di $\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$.

RISULTATI

1. COSTRUZIONE DEL CAR ANTI-hPSMA

La facilità di manipolazione del plasmide pBS SKII ha indirizzato verso la scelta di un *backbone* plasmidico in cui procedere con il clonaggio dei diversi frammenti genici codificanti le varie regioni del CAR (sequenza Leader, scFv, Tag, CD28, CD3ζ) (Figura 13). In particolare, l'inserimento del myc Tag nella porzione extracellulare del CAR consente la rapida e semplice rilevazione dell'espressione in membrana del recettore chimerico e la valutazione dell'efficienza di trasferimento genico. La posizione della breve sequenza nucleotidica *myc* Tag (compresa tra i siti unici NotI e HindIII) all'interno del costrutto ne consente inoltre la rapida sostituzione con Tag diversi.

In base a dati di letteratura¹⁰⁰ si è scelto di generare un CAR contenente porzioni derivate dalla molecola costimolatoria CD28 e dalla molecola di segnalazione intracellulare CD3ζ. Il frammento CD28 inserito nel recettore chimerico (amminoacidi, aa114-aa220 della sequenza CD28 completa) comprende i) la regione extracellulare (aa114-aa153) che nel CAR funge da spaziatore tra i domini di riconoscimento dello scFv e la membrana cellulare, ii) la porzione transmembrana (aa154-aa176) che svolge la funzione di ancoraggio in membrana del CAR, iii) la porzione intracellulare (aa177-aa220) che comprende il dominio di trasduzione del segnale del CD28. Della molecola CD3ζ è stata clonata in toto la sola regione intracitoplasmatica (aa52-aa164) che comprende le tre regioni ITAM deputate alla trasduzione del segnale.

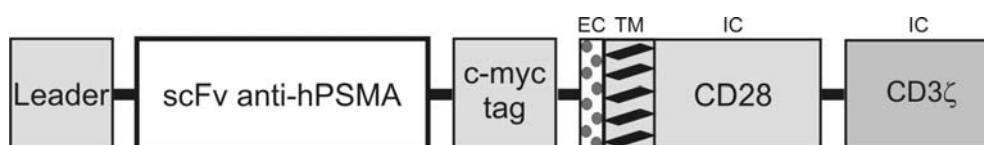


Figura 13. Rappresentazione schematica del costrutto CAR anti-hPSMA. EC: regione extracellulare; TM: regione transmembrana; IC: regione intracellulare.

2. TRASFERIMENTO GENICO DEL CAR ANTI-hPSMA MEDIANTE TRASFEZIONE

Prima di procedere con il clonaggio del costrutto CAR anti-hPSMA in un vettore lentivirale per la trasduzione di PBMC, abbiamo voluto valutare l'effettiva capacità, da parte di linee cellulari umane, di montare in membrana la struttura del recettore chimerico sviluppata. A questo proposito il costrutto CAR anti-hPSMA è stato subclonato nel vettore di espressione eucariotico

pcDNA3.1, con cui è stata trasfettata la linea cellulare 293T, valutando l'espressione del recettore chimerico in membrana mediante analisi citofluorimetrica con anticorpo diretto contro c-myc (Figura 14A). Le cellule 293T si dimostrano suscettibili alla trasfezione e capaci di montare in membrana il recettore chimerico; l'espressione del transgene si riduce tuttavia progressivamente fino alla totale scomparsa. L'espressione del CAR dopo trasfezione è stata confermata mediante Western Blotting: la banda attesa (circa 60KDa) è evidenziabile chiaramente dopo 24 ore dalla trasfezione, mentre si riduce in intensità dopo 1 settimana (Figura 14B).

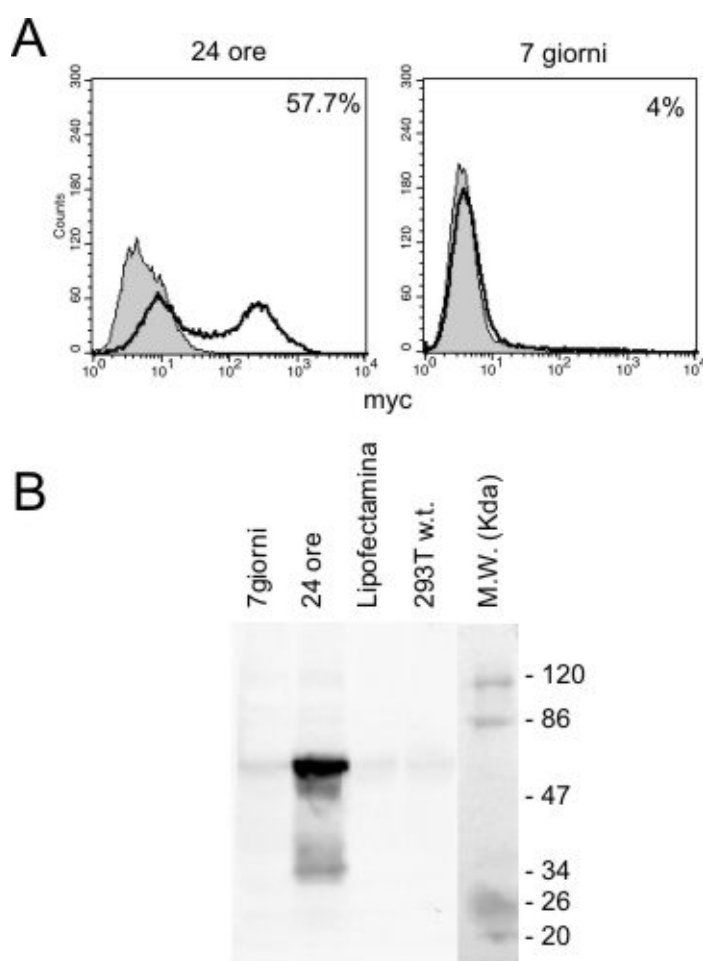


Figura 14. Espressione di CAR anti-hPSMA nella linea 293T trasfettata con pcDNA3.1. La linea cellulare 293T è stata trasfettata con il plasmide pcDNA3.1 codificante il CAR anti-hPSMA. (A) Analisi citofluorimetrica a 24 ore e a 7 giorni dalla trasfezione: nei singoli pannelli è indicata la percentuale di cellule esprimenti il CAR. (B) Western blotting condotto sugli stessi campioni analizzati in citofluorimetria; come controllo sono state analizzate cellule 293T non trasfettate e cellule 293T trattate con la sola Lipofectamina.

3. GENERAZIONE DI VETTORI LV BIDIREZIONALI CODIFICANTI IL CAR ANTI-hPSMA E UN GENE REPORTER

Il costrutto CAR anti-hPSMA è stato clonato in un vettore lentivirale con promotore bidirezionale recentemente descritto¹⁴⁹, con l'obiettivo di ingegnerizzare le cellule T contemporaneamente con il CAR anti-hPSMA e con un gene *reporter* (eGFP o *Firefly Luciferase* per studi di *tracking in vivo*), da poter eventualmente sostituire, in futuro, con CAR diretto contro un altro antigene nell'ottica di una terapia multi-target.

Il promotore bidirezionale utilizzato è costituito da un frammento di 516 bp del promotore della fosfoglicerato chinasi umana (hPGK)¹⁹¹ fuso ad elementi del promotore del Citomegalovirus umano (minCMV), precedentemente sviluppato per accoppiare l'inizio della trascrizione eucariotica ad operatori tetraciclina-dipendenti¹⁹². Il promotore bidirezionale è fiancheggiato da due cassette di espressione ottimizzate per il trasferimento genico mediato da LV: la prima, in orientamento antisenso rispetto alla LTR, comprende il *constitutive transport element* (CTE) del virus di Mason-Pfizer¹⁹³ e un sito di poliadenilazione dal virus di scimmia SV40; la seconda comprende il *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element* (WPRE), che determina una migliore espressione del transgene, e il sito di poliadenilazione SIN HIV-1 LTR¹⁹¹.

La generazione del vettore lentivirale bidirezionale codificante CAR anti-hPSMA e gene *reporter* ha richiesto diverse fasi di clonaggio e l'utilizzo di diversi costrutti plasmidici (descritti in *Materiali e Metodi*); esso è stato ottenuto a partire dal vettore di trasferimento con promotore bidirezionale #945.pCCL.sin.cPPT.SV40ployA.eGFP.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre, clonando il costrutto CAR anti-hPSMA sotto il controllo del promotore hPGK e il gene *reporter* sotto il controllo del promotore minCMV.

Sono stati generati due nuovi vettori lentivirali di trasferimento, CAR anti-hPSMA/eGFP e CAR anti-hPSMA/fluc: quest'ultimo, in particolare, è stato ottenuto sostituendo la sequenza genica eGFP.minCMV con una sequenza *Firefly Luciferasi.minCMV* e mantenendo il CAR sotto il controllo di hPGK.

Oltre alla verifica del corretto profilo di digestione dei vettori di trasferimento ottenuti (Figura 15), è stato escluso l'inserimento di mutazioni negli inserti CAR anti-hPSMA, eGFP e *Luciferasi*, mediante sequenziamento.

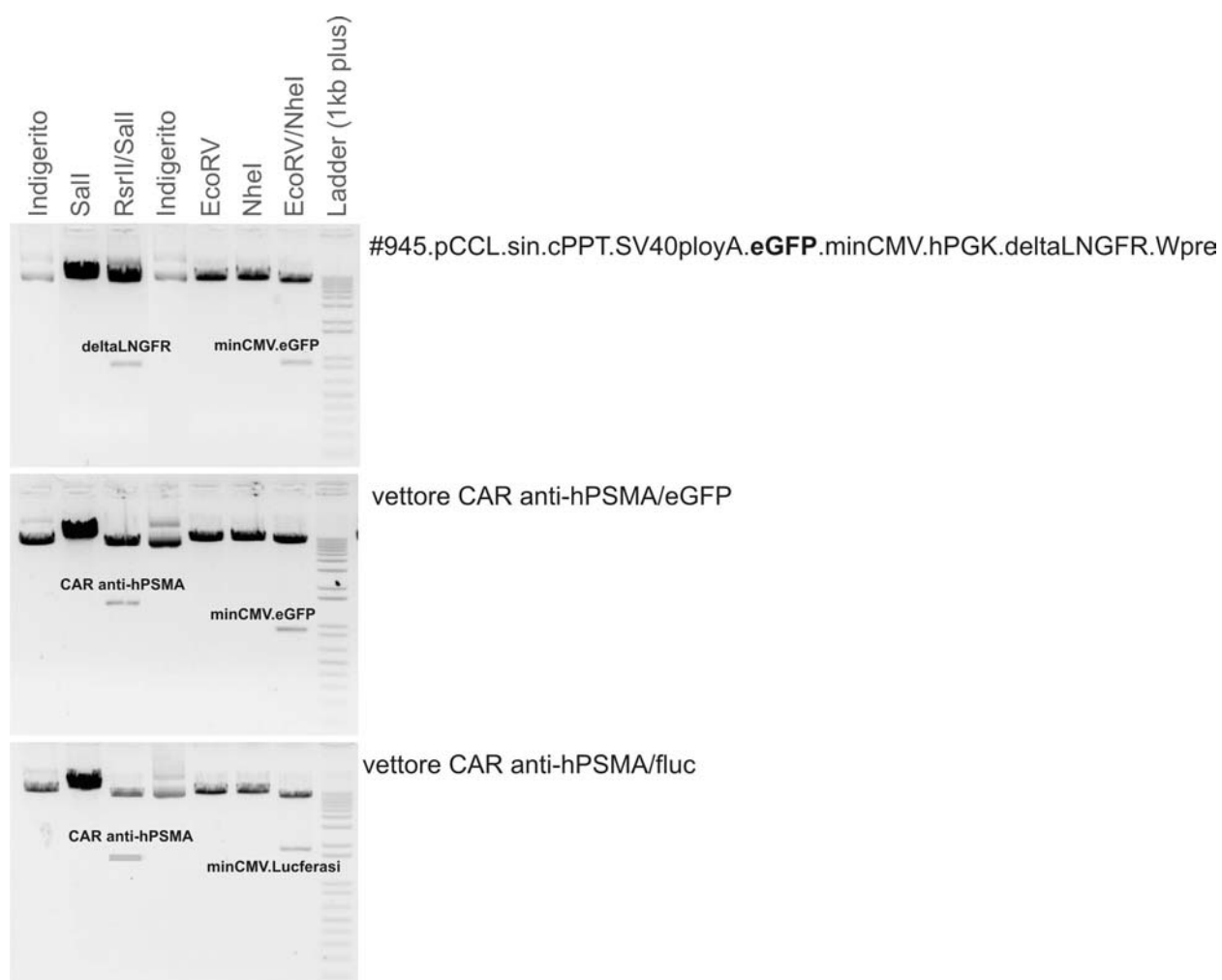


Figura 15. Corse elettroforetiche dei vettori lentivirali dopo digestione con enzimi di restrizione. La digestione dei vettori lentivirali con gli enzimi RsrII/Sall e EcoRV/NheI permette di visualizzare le bande corrispondenti rispettivamente a CAR anti-hPSMA e minCMV.eGFP o minCMV.Luciferasi. Come vettore di controllo è stato digerito, con gli stessi enzimi di restrizione, il vettore lentivirale #945.pCCL.sin.cPPT.SV40ployA.eGFP.minCMV.hPGK.deltaLNGFR.Wpre.

I vettori virali bidirezionali ottenuti sono stati utilizzati per la produzione di particelle virali non replicative, pseudotipizzate con la proteina VSV-G, mediante un sistema di cotrasfezione a 5 plasmidi come descritto in dettaglio in *Materiali e Metodi*. Le particelle virali ottenute sono state indicate come LV CAR anti-hPSMA/eGFP e LV CAR anti-hPSMA/fluc.

4. TRASFERIMENTO GENICO DEL CAR ANTI-hPSMA MEDIATO DA VETTORI LENTIVIRALI

4.1 Linea Jurkat

Cellule della linea Jurkat sono state trasdotte con LV CAR anti-hPSMA/eGFP e LV CAR anti-hPSMA/fluc e analizzate con tecniche citofluorimetriche per valutare l'espressione stabile in membrana del CAR anti-hPSMA. Trasducendo 2×10^5 cellule Jurkat con 1 ml di surnatante

virale non concentrato si ottiene una percentuale di cellule c-myc⁺ superiore al 90% nel caso di LV CAR anti-hPSMA/eGFP e superiore al 60% nel caso di LV CAR anti-hPSMA/fluc (Figura 16A). L'espressione contemporanea di eGFP è stata valutata mediante citofluorimetria (Figura 16B), mentre quella di Luciferasi mediante BLI (Figura 16C).

Le cellule Jurkat trasdotte sono state analizzate fino a 3 mesi dopo la trasduzione per monitorare l'andamento di espressione del CAR in membrana in assenza di stimolazione antigenica: si osserva una progressiva diminuzione di espressione, che risulta più marcata per cellule trasdotte con LV CAR anti-hPSMA/Luciferasi (Figura 16D).

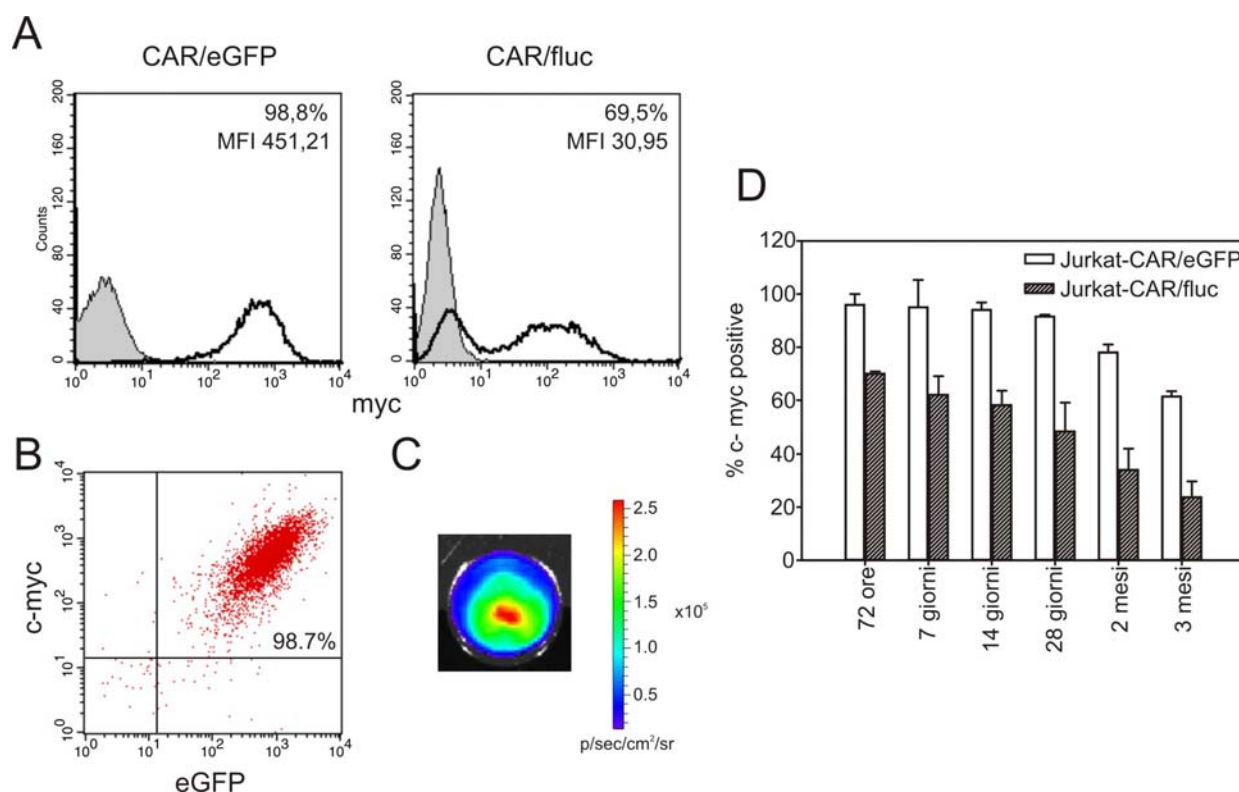


Figura 16. Espressione di CAR anti-hPSMA in cellule Jurkat. Cellule Jurkat sono state trasdotte con 1 ml di surnatante virale non concentrato. (A) Analisi citofluorimetrica dell'espressione del CAR anti-hPSMA: nei singoli pannelli sono indicate la percentuale di cellule c-myc⁺ e l'intensità di fluorescenza media (MFI) a 72 ore dalla trasduzione. (B) Analisi dell'espressione di eGFP e c-myc nelle cellule Jurkat trasdotte con LV CAR anti-hPSMA/eGFP a 72 ore dalla trasduzione: nel pannello è riportata la percentuale di cellule c-myc⁺/eGFP⁺. (C) Valutazione dell'espressione di Luciferasi mediante analisi BLI. (D) Cinetica di espressione del CAR anti-hPSMA in cellule Jurkat: il grafico riporta la percentuale di cellule c-myc⁺ a diverse tempistiche dalla trasduzione, per entrambi i vettori lentivirali utilizzati.

4.2 PBMC

La scelta del protocollo di trasduzione ottimizzato per la generazione di popolazioni T cellulari esprimenti il CAR anti-hPSMA, da utilizzare negli esperimenti di trasferimento adottivo *in vivo*, è stata effettuata sulla base di varie prove di trasduzione su PBMC attivati con OKT-3 e IL-2, come descritto in *Materiali e Metodi*.

Variando parametri quali tempo di attivazione (0, 48, 72 ore), MOI e protocollo di infezione, abbiamo valutato quali condizioni potessero portare ad ottenere, in tempi brevi, un elevato numero di cellule T trasdotte, una significativa espressione del recettore chimerico e un fenotipo meno differenziato possibile, in linea con i recenti dati di letteratura che individuano in popolazioni con fenotipo *memory* le cellule migliori da utilizzare in protocolli di terapia adottiva⁵⁴.

I PBMC si sono dimostrati suscettibili all'infezione da parte dei costrutti lentivirali con efficienza variabile in relazione alla MOI, al volume e ai tempi di incubazione. In generale, è stata riscontrata la necessità di utilizzare preparazioni virali ad elevato titolo, infettando le cellule in un volume ridotto e per tempi non inferiori a 12 ore (o.n.) per ottenere una frazione significativa e facilmente identificabile di cellule esprimenti il recettore chimerico, soprattutto per il vettore LV CAR anti-hPSMA/fluc (dati non mostrati). In Figura 17 si riportano i dati relativi a varie prove di trasduzione di PBMC con LV CAR anti-hPSMA/fluc (Virus 20X, MOI approssimativa 300); si sono confrontati i risultati ottenuti con trasduzione condotta contestualmente all'attivazione (Td0), dopo 48 ore (Td2) o 72 ore (Td3) di attivazione in termini di espressione del recettore chimerico (A), attivazione (B) e di fenotipo (C), conducendo l'analisi a 72 ore dal termine del ciclo di infezione. Poichè la trasduzione dopo 48 ore di attivazione determina la maggior efficienza in termini di espressione del CAR, pur mantenendo un fenotipo ancora di memoria, si è scelto di adottare questo protocollo, descritto in dettaglio in *Materiali e Metodi*, per ottenere popolazioni di cellule T da utilizzare in ACT.

I PBMC trasdotti con CAR anti-hPSMA saranno di seguito indicati come T-body-hPSMA, distinguendo T-body-hPSMA/eGFP (esprimenti il gene *reporter* eGFP) e T-body-hPSMA/fluc (esprimenti il gene *reporter Firefly Luciferase*).

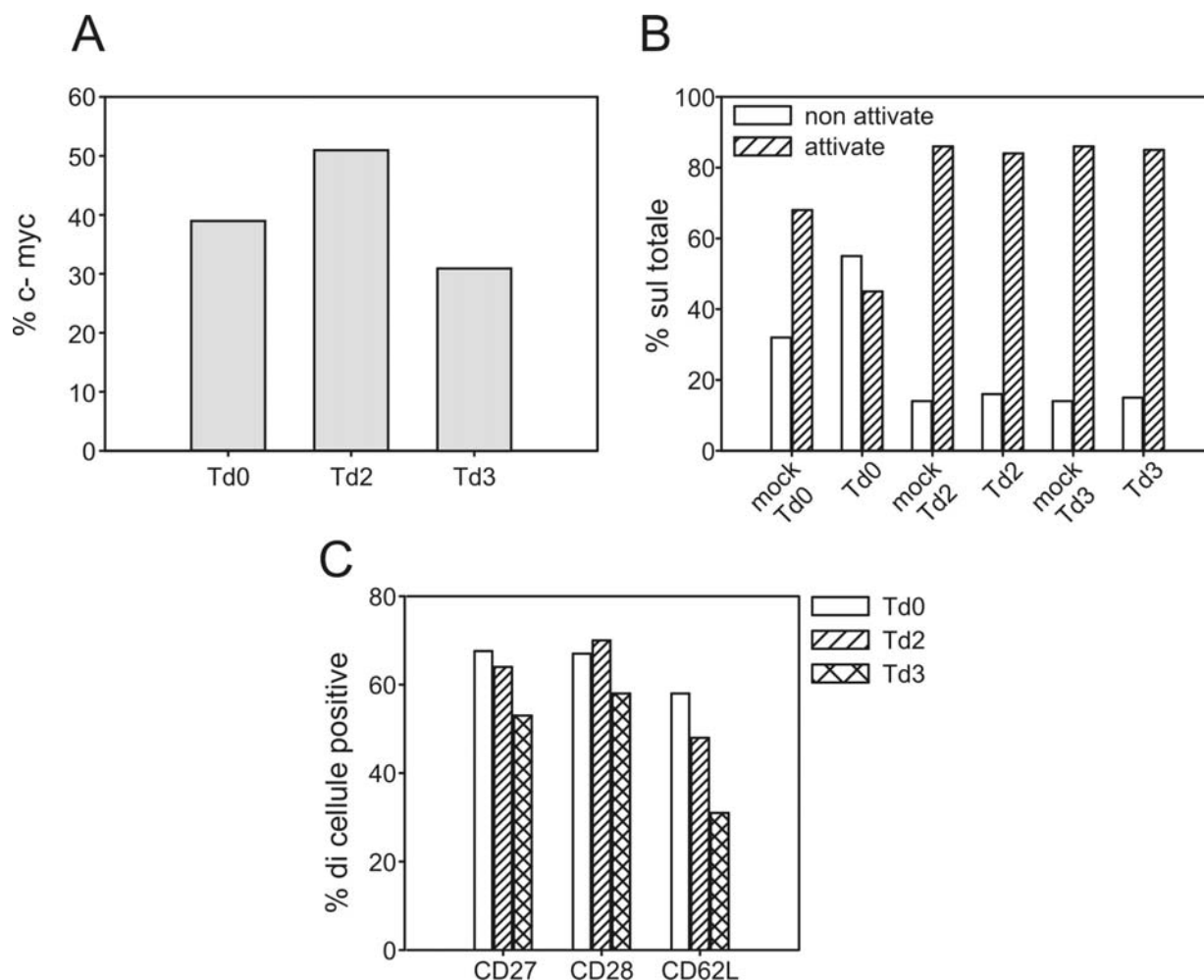


Figura 17. Confronto tra diversi protocolli di trasduzione. I PBMC, attivati con OKT-3 e IL-2 come descritto in *Materiali e Metodi*, sono stati trasdotti con LV CAR anti-hPSMA/fluc (MOI 300), confrontando gli effetti della trasduzione contestuale all'attivazione (Td0), a 48 ore (Td2) o 72 ore (Td3) dall'attivazione. Le analisi sono state effettuate a 72 ore dal termine del ciclo di infezione. (A) Espressione del CAR anti-hPSMA. (B) Analisi della frazione di cellule attivate e non attivate. (C) Espressione di alcuni marcatori di superficie.

5. GENERAZIONE DI LINFOCITI T TRASDOTTI CON CAR (T-BODY), PER STUDI DI TRASFERIMENTO ADOTTIVO

Gli aspetti più critici dell'utilizzo di cellule ingegnerizzate in immunoterapia adottiva sono rappresentati dalla necessità di ottenere un elevato numero di linfociti T Ag-tumorale-specifici e dalla scelta della cellula T ottimale da trasferire. Una metodica efficiente per generare tali cellule deve garantire rese elevate o prevedere un rapido sistema di espansione della frazione esprime il CAR specifico; in questo secondo caso il rischio è quello di ottenere popolazioni terminalmente differenziate, che i recenti dati di letteratura indicano come terapeutamente meno efficaci rispetto a cellule con fenotipo di memoria. In considerazione di ciò, il protocollo definitivo di trasduzione dei PBMC adottato in questo studio è il frutto della sintesi dei dati

sovraesposti e del compromesso tra l'esigenza di un trasferimento genico efficiente e la generazione di cellule con elevata capacità proliferativa e fenotipo meno differenziato possibile. I PBMC, attivati per 48 ore con OKT-3 e IL-2, sono stati trasdotti per un'ora in un volume ridotto di surnatante virale concentrato, quindi addizionati con terreno completo ed incubati o.n. per 18 ore (MOI finale 100 per LV CAR anti-hPSMA/eGFP e 300 per LV CAR anti-hPSMA/fluc); al termine dell'incubazione il surnatante virale è stato rimosso e sostituito con terreno completo e IL-2. Tutte le analisi sono state condotte a partire da 72 ore dopo il termine del ciclo di infezione, rivelando una frazione di cellule c-myc⁺ variabile tra il 35 e il 60% per T-body-hPSMA/fluc (media 53±13%) e il 60-80% per T-body-hPSMA/eGFP (media 68±9%), valori questi ultimi sufficienti a permettere il trasferimento adottivo in assenza di ulteriori stimolazioni *in vitro*. In Figura 18A si riportano i risultati citofluorimetrici rappresentativi dell'efficienza di trasduzione dei vettori LV CAR anti-hPSMA/eGFP e LV CAR anti-hPSMA/fluc.

In alternativa, si è messo a punto un protocollo di espansione che consente di arricchire in tempi brevi la popolazione trasdotta (c-myc⁺): i PBMC vengono ristimolati settimanalmente (a partire dal settimo giorno dopo l'iniziale attivazione) con cellule LNCaP irradiate (rapporto 1:10 LNCaP: cellule T) e IL-2 come fattore di crescita; tale metodica consente un'espansione rapida e consistente (fino a 100 volte in 20-30 giorni) dei PBMC trasdotti e livelli di espressione del CAR che raggiungono l'80-90%. (Figura 18B, C).

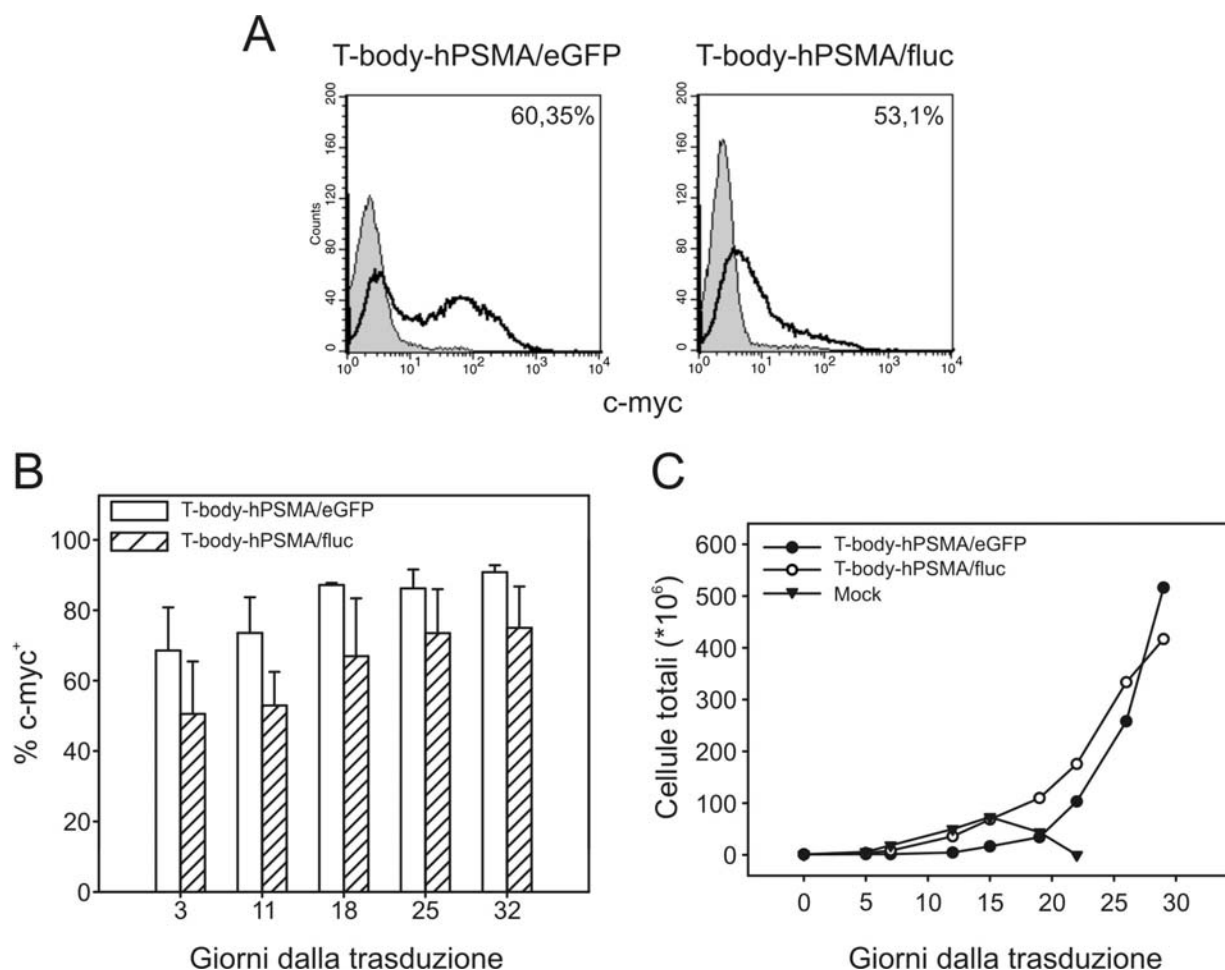


Figura 18. Caratterizzazione di PBMC trasdotti con CAR: efficienza di trasduzione, cinetica di espressione del CAR e proliferazione *in vitro* della popolazione trasdotta. (A) Pannelli citofluorimetrici rappresentativi di 6 esperimenti condotti utilizzando il protocollo di trasduzione adottato nello studio per LV CAR anti-hPSMA/eGFP e LV CAR anti-hPSMA/fluc; è indicata la percentuale di cellule esprimenti il CAR (c-myc⁺) a 72 ore dalla trasduzione; nella coltura non trasdotta l'espressione di c-myc è nulla (dato non mostrato). (B) Cinetica di incremento della frazione c-myc⁺ nelle colture T-body-hPSMA/eGFP e T-body-hPSMA/fluc, in funzione del tempo. (C) Proliferazione *in vitro* delle popolazioni T-body-hPSMA/eGFP e T-body-hPSMA/fluc ristimate settimanalmente con cellule LNCaP, confrontata con una coltura di riferimento non trasdotta (mock) ristimolata allo stesso modo.

6. CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE E FENOTIPICA DELLA POPOLAZIONE T TRASDOTTA CON CAR

6.1 Caratterizzazione funzionale

L'attività terapeutica anti-tumorale *in vivo* di cellule T ingegnerizzate dipende soprattutto dalla capacità della cellula T di esplicare la sua funzione effettrice in risposta al riconoscimento di antigeni tumorali. Per prima cosa, quindi, si è valutato se l'espressione del CAR anti-hPSMA conferisse alla popolazione di PBMC trasdotti la capacità di riconoscere bersagli cellulari esprimenti l'antigene hPSMA in modo specifico e di esplicare una funzione citotossica. L'attività funzionale *in vitro* è stata valutata mediante classico test di rilascio di ⁵¹Cr e marcature

intracitoplasmatiche per rilascio di IFN- γ : il CAR transgenico conferisce alla popolazione trasdotta la capacità di riconoscere l'antigene hPSMA, espresso fisiologicamente (linea cellulare LNCaP) o dopo trasfezione stabile (linea cellulare PC-3-hPSMA) sulla superficie di cellule tumorali (Figura 19), e risulta in grado di mediare un'attività citotossica elevata e specifica e la secrezione di citochine da parte delle cellule trasdotte. Come controllo di specificità sono state considerate sia una popolazione di PBMC non trasdotta e ristimolata settimanalmente con LNCaP (indicata come mock), sia la linea cellulare PC-3, non esprimente l'antigene (Figura 19).

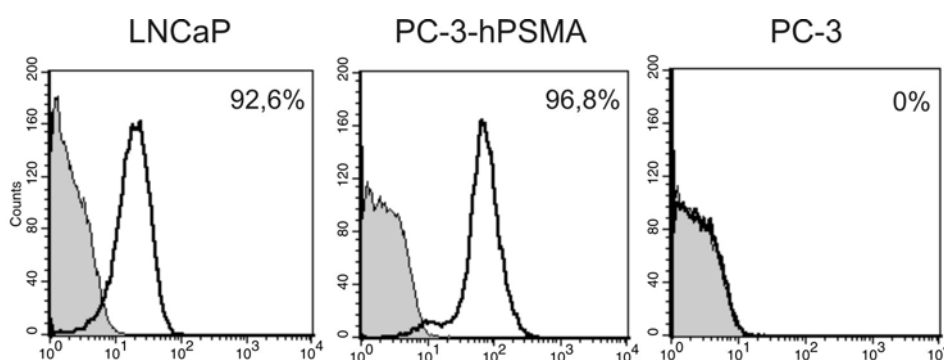


Figura 19. Espressione dell'antigene hPSMA in linee cellulari di carcinoma prostatico. L'espressione dell'antigene hPSMA è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica. In ciascun pannello è riportata la percentuale di cellule hPSMA⁺.

Entrambe le popolazioni analizzate (T-body-hPMSA/eGFP e T-body-hPSMA/fluc) sono in grado di mediare la lisi dei bersagli cellulari presentanti l'antigene hPSMA; l'apparente minore attività citotossica dei T-body-hPSMA/fluc dipende verosimilmente dalla minor percentuale di cellule esprimenti il CAR presente nella coltura analizzata. A 72 ore dalla trasduzione l'attività litica è ancora ridotta; monitorando le colture nel tempo si osserva però un progressivo aumento dell'attività citotossica dopo stimolazioni antigeniche successive (Figura 20).

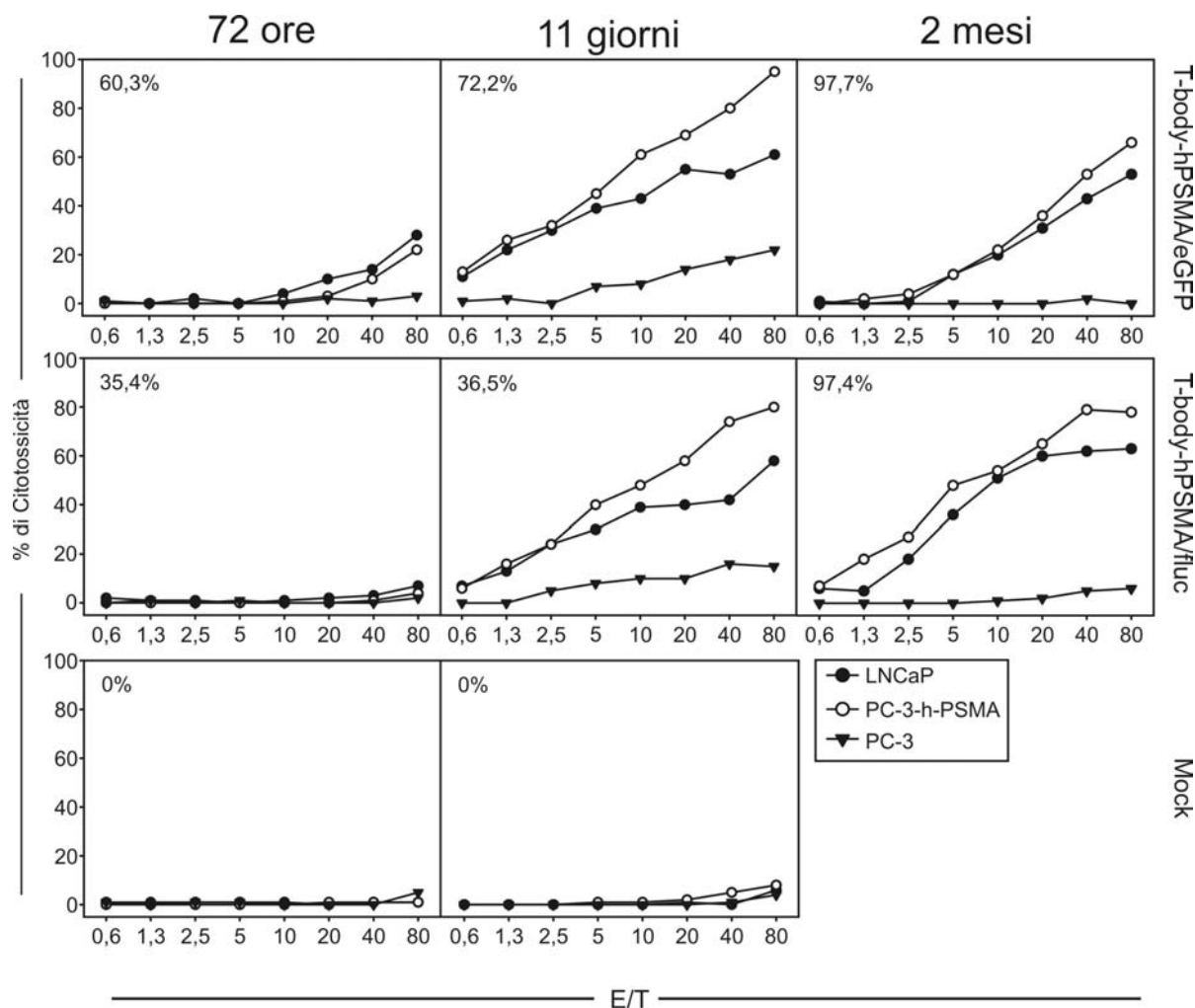


Figura 20. Attività citotossica dei T-body-hPSMA. I T-body-hPSMA ottenuti come descritto nel paragrafo precedente sono stati analizzati mediante classico saggio di rilascio di ^{51}Cr . L'attività citotossica, ancora ridotta a 72 ore dalla trasduzione, aumenta progressivamente dopo stimolazioni antigeniche successive. La popolazione non trasdotta (mock) ha un'attività litica minima, che si mantiene costante, fino all'esaurimento della coltura. In figura si riportano alcuni test rappresentativi condotti a 72 ore, 11 giorni e 2 mesi dalla trasduzione. All'interno di ciascun pannello è riportata la percentuale di cellule c-myc⁺ presenti nella coltura analizzata.

Un'ulteriore conferma del fatto che la popolazione T trasdotta con CAR anti-hPSMA è in grado di riconoscere cellule esprimanti l'antigene e di esplicare una funzione effettrice è derivata dagli studi sulla produzione di citochine, in particolare di IFN- γ .

Prima di procedere con la marcatura intracitoplasmatica per IFN- γ , si è studiato il comportamento del recettore chimerico in seguito ad esposizione all'antigene: T-body-hPSMA/fluc in coltura da 10 settimane sono stati incubati o.n. con cellule tumorali PC-3-hPSMA (in rapporto 1:1) o in presenza di uno stimolo massimale costituito da PMA-Ionomicina (come controllo positivo), valutando poi l'espressione del CAR in membrana mediante citofluorimetria (Figura 21A). Poiché si è osservata la modulazione negativa (seppur modesta) del recettore chimerico in seguito alla co-coltura con cellule hPSMA⁺ o

all'incubazione con PMA-Ionomicina, nel successivo test per la produzione di IFN- γ si è scelto di marcare le cellule solo con anticorpo anti-IFN- γ , senza associare l'espressione del CAR all'attività funzionale mediante una doppia marcatura. T-body-hPSMA/fluc a 72 ore dalla trasduzione (31,5% c-myc⁺ al momento della valutazione funzionale) sono stati incubati per 15 ore in presenza di vari tipi di stimoli (nessuno stimolo, PMA-Ionomicina, PC-3-hPSMA in rapporto 1:1, PC-3 in rapporto 1:1) e quindi marcati con mAb anti-IFN- γ mediante marcatura intracitoplasmatica. Si è osservato che tali cellule trasdotte producono citochine in risposta all'antigene; la percentuale di positività è tuttavia ridotta, in linea con la modesta attività citotossica rilevata mediante saggio di rilascio di ⁵¹Cr (Figura 21B).

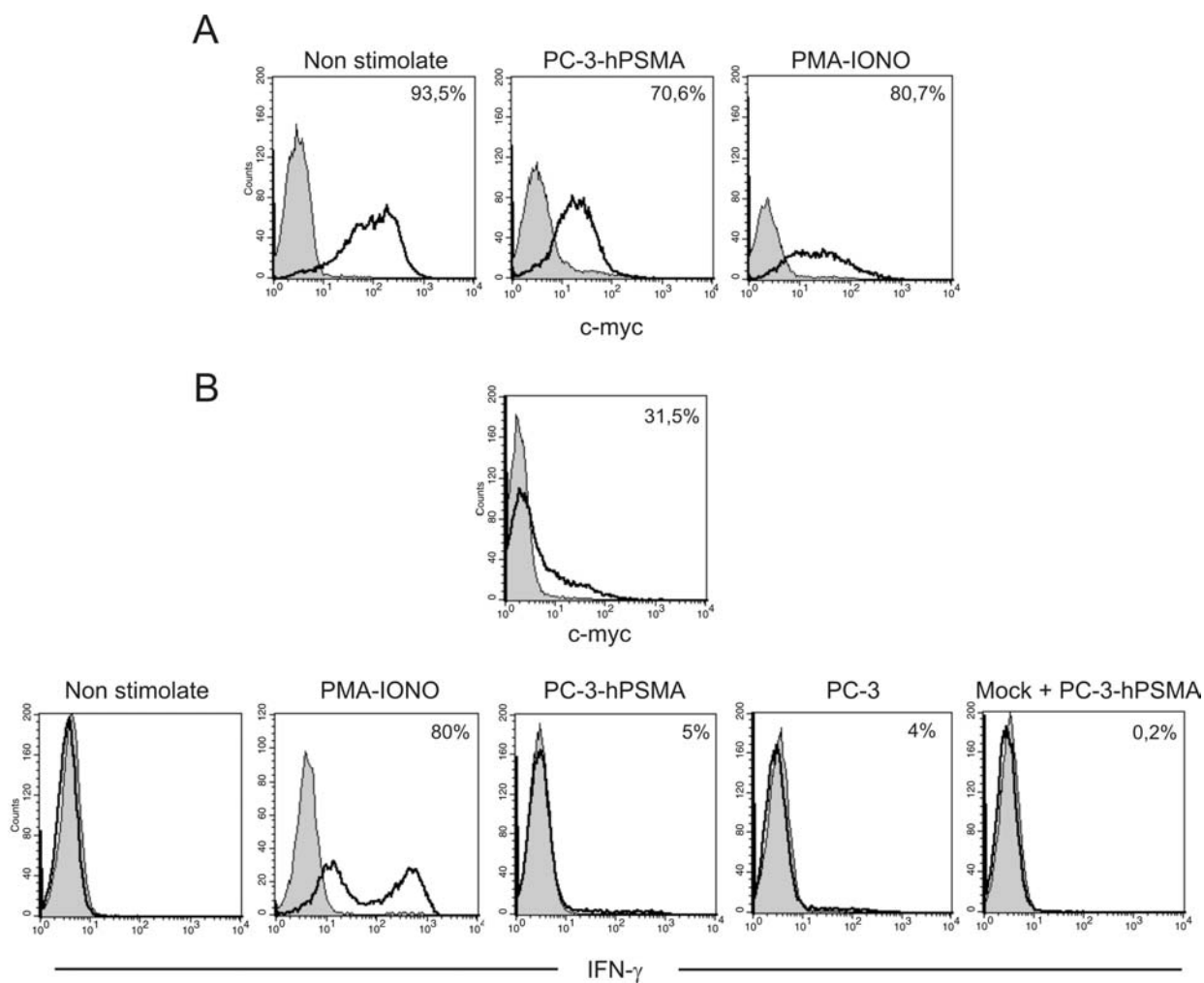


Figura 21. Modulazione del CAR anti-hPSMA e marcatura intracitoplasmatica per IFN- γ . (A) Modulazione del recettore chimerico in risposta ad uno stimolo antigenico massimale (PMA-Ionomicina) o ad esposizione a cellule tumorali esprimenti l'antigene hPSMA. (B) Analisi della produzione di IFN- γ da parte di PBMC trasdotti con LV CAR anti-hPSMA/fluc a 72 ore dalla trasduzione. I T-body-hPSMA/fluc (31,5% c-myc⁺ al momento della valutazione funzionale) sono stati incubati 15 ore in diverse condizioni di stimolazione (cellule non stimulate, PMA-Ionomicina, PC-3-hPSMA, PC-3) analizzando la produzione di IFN- γ mediante marcatura intracitoplasmatica. Come controllo è stata analizzata anche una popolazione di PBMC non trasdotti (mock), incubati con PC-3-hPSMA.

6.2 Caratterizzazione fenotipica

Già considerato come fattore importante nella scelta del protocollo di trasduzione, il fenotipo delle cellule T trasdotte è stato valutato a partire dalle 72 ore dopo la trasduzione e per tempistiche successive, al fine di caratterizzare al meglio le popolazioni di T-body e di utilizzare, negli studi di trasferimento adottivo, cellule non terminalmente differenziate. Sempre più numerose evidenze sperimentali indicano infatti che cellule T di memoria, grazie alla loro aumentata sopravvivenza, al potenziale proliferativo e alla capacità di raggiungere i tessuti linfoidi e di riconoscere gli antigeni tumorali presentati dalle cellule APC, si configurano come il tipo cellulare più adatto per la terapia del cancro, a scapito di cellule T effettrici attivate, fino ad oggi indicate come la scelta ottimale per il trattamento di neoplasie¹¹⁹.

L'analisi citofluorimetrica di cellule T trasdotte con CAR e stimulate ripetutamente *in vitro* indica il progressivo esaurirsi della componente T CD4⁺ a favore di quella T CD8⁺, sia per T-body-hPSMA/eGFP, sia per T-body-hPSMA/fluc (Figura 22A); l'analisi di alcuni marcatori di superficie (CD62L, CD27, CD28, CCR-7, CD57) su T-body-hPSMA/fluc ha permesso inoltre di definire lo stato differenziativo dei linfociti. A 72 ore dalla trasduzione, il profilo che emerge è di tipo *central memory*¹⁹⁴, come indicato in particolare dall'elevata espressione di CD62L, CD27, CD28, dalla presenza di cellule CCR-7 positive (che diminuiscono progressivamente) e dalla bassa espressione di CD57, che aumenta dopo successive ristimolazioni (Figura 22B).

Il fenotipo di queste cellule e la loro attività citotossica *in vitro*, seppur modesta, ci hanno spinto ad utilizzare linfociti a 72 ore dalla trasduzione anche *in vivo*, al fine di valutarne l'efficacia terapeutica.

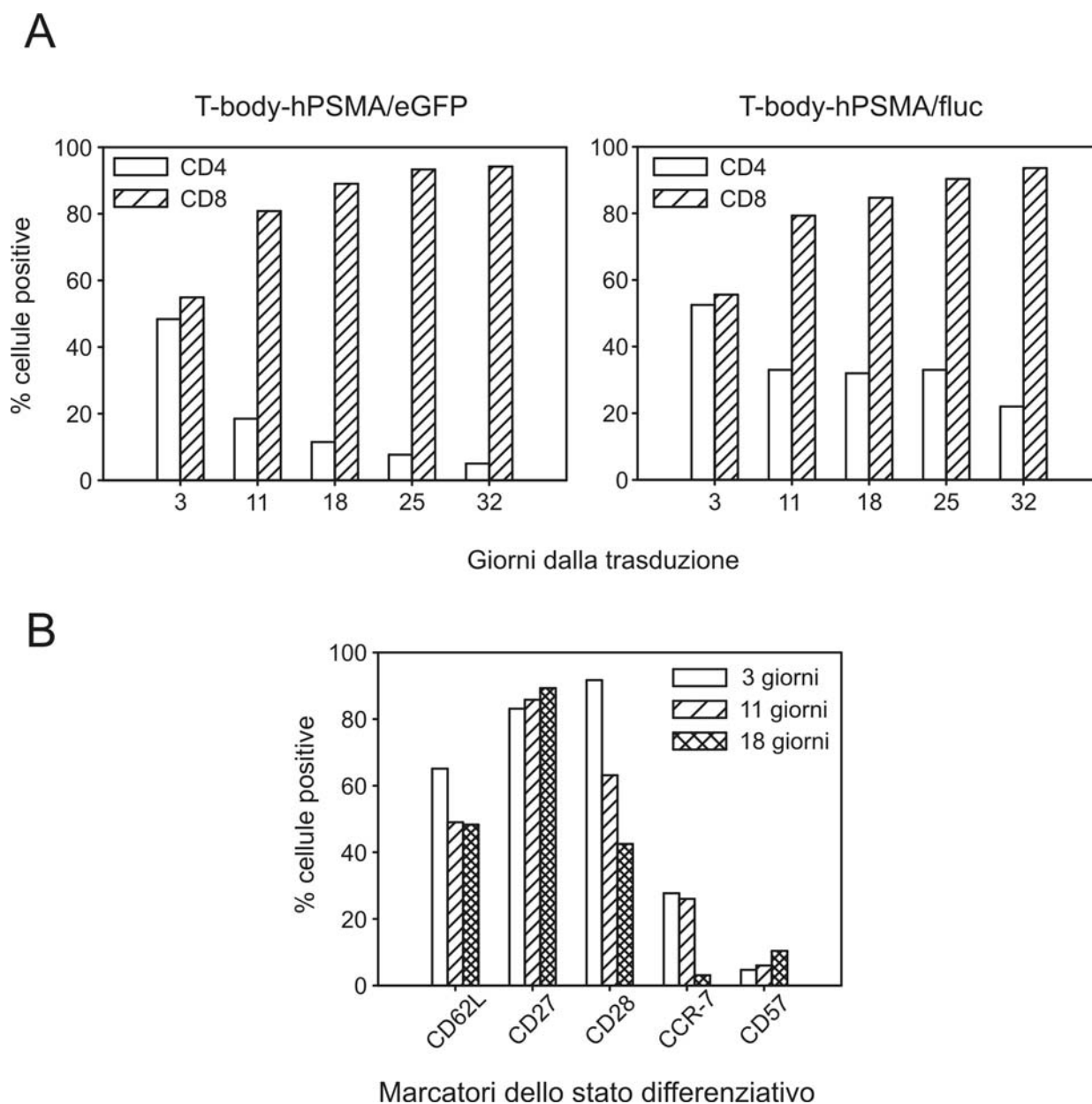


Figura 22. Caratterizzazione fenotipica di PBMC trasdotti con CAR. (A) Analisi citofluorimetrica, a diverse tempistiche dalla trasduzione, delle colture T-body-hPSMA/eGFP e T-body-hPSMA/fluc espanse *in vitro* e marcate con mAb anti-CD4 e anti-CD8. Si osserva la progressiva selezione della componente T CD8⁺ dopo successive stimolazioni *in vitro*. (B) Analisi, a diverse tempistiche dalla trasduzione, della popolazione T-body-hPSMA/fluc mediante marcatura citofluorimetrica con anticorpi diretti contro alcuni marcatori di membrana.

7. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA TERAPEUTICA *IN VIVO*

7.1 Winn Assay

L'efficacia terapeutica *in vivo* dei PBMC trasdotti con CAR anti-hPSMA è stata inizialmente valutata in un esperimento di "Winn Assay", utilizzando come modello murino di tumore prostatico topi SCID immunodeficienti inoculati s.c. con cellule PC-3-hPSMA (sul fianco destro) e cellule PC-3 (sul fianco sinistro).

Nel gruppo di controllo sono state inoculate le sole cellule tumorali (5×10^6), mentre nel gruppo dei trattati le cellule tumorali sono state mescolate a T-body-hPSMA/eGFP in rapporto 1:1, prima di procedere con l'inoculo sottocutaneo. In questo esperimento è stata confrontata l'efficacia di due diverse colture di T-body-hPSMA/eGFP: T-body-hPSMA trasdotti 72 ore prima dell'inoculo *in vivo* e mai stimolati *in vitro* (indicati come T-body-hPSMA 72h) e T-body-hPSMA dopo 5 ristimolazioni settimanali *in vitro* (indicati come T-body-hPSMA 5° px), con l'obiettivo di valutare se esista una differenza tra le due popolazioni in termini di efficacia terapeutica (Figura 23).

I tumori di controllo generati dalle linee prostatiche umane PC-3-hPSMA e PC-3 si sviluppano nel 100% dei topi inoculati, generando masse sottocutanee facilmente misurabili dopo 3 e 7 giorni rispettivamente; la linea PC-3-hPSMA origina tumori più aggressivi, caratterizzati da una cinetica di crescita molto più rapida rispetto alla linea PC-3.

Al sito di co-inoculo delle cellule PC-3-hPSMA e di T-body-hPSMA72h o T-body-hPSMA 5°px si è verificata un'immediata regressione della massa neoplastica, senza ripresa di crescita durante tutto il periodo di osservazione (64 giorni); il co-inoculo di T-body-hPSMA 72h o T-body-hPSMA 5°px con PC-3, al contrario, non ha impedito la crescita della massa neoplastica, causando solo un rallentamento dello sviluppo del tumore, più spiccato nel caso di T-body-hPSMA 72h, ma comunque non statisticamente significativo.

In conclusione, i T-body-hPSMA esplicano un'attività antitumorale efficace e specifica, paragonabile a quella dimostrata *in vitro*, anche in un contesto fisiologico *in vivo*; in particolare, come già evidenziato dagli studi di citotossicità *in vitro*, PBMC a 72 ore dalla trasduzione presentano una modesta attività citotossica e un certo livello di lisi aspecifica, che viene progressivamente perso dopo successive ristimolazioni *in vitro*, a vantaggio di una elevata capacità di lisi specifica.

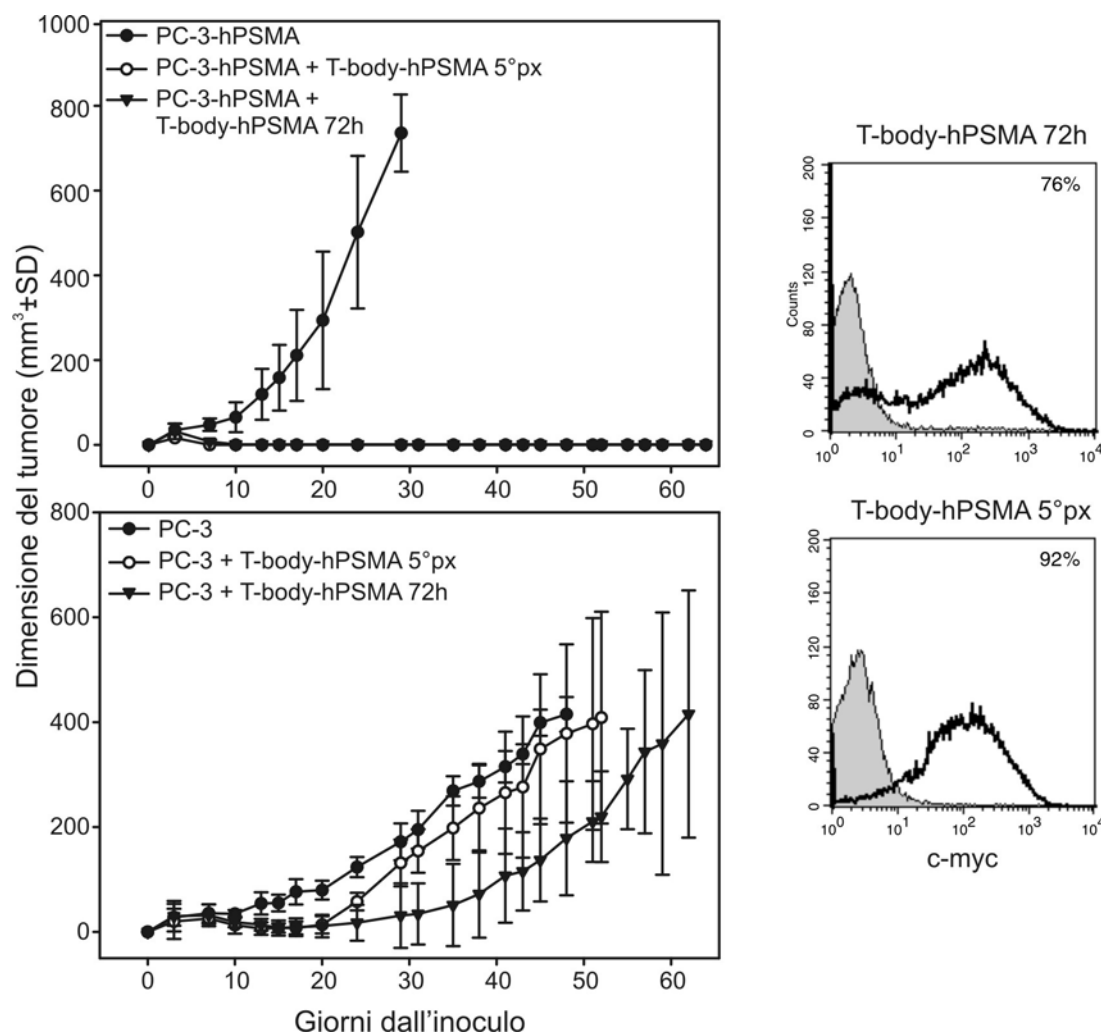


Figura 23. Attività anti-tumorale *in vivo* dei T-body-hPSMA. 5×10^6 cellule tumorali PC-3-hPSMA o PC-3 sono state inoculate sul fianco di topi SCID, da sole o miscelate in rapporto 1:1 a T-body-hPSMA/eGFP (72h o 5°px), valutando la crescita della massa neoplastica nel tempo. Nel caso di co-inoculo di PC-3-hPSMA con T-body-hPSMA 72h o con T-body-hPSMA 5°px non si osserva alcuna crescita neoplastica, mentre in tutti gli altri casi (PC-3-hPSMA, PC-3, PC-3 + T-body-hPSMA 72h o 5°px) la massa tumorale risulta misurabile a partire dal giorno 3 e si sviluppa con progressione costante. T-body-hPSMA72h: PBMC trasdotti con CAR 72 ore prima dell'inoculo *in vivo* e mai stimolati *in vitro*; T-body-hPSMA 5°px: PBMC trasdotti con CAR e ristimolati per 5 volte *in vitro*. Numero di topi per gruppo n=4. Le popolazioni di cellule T trasferite *in vivo* presentavano, al momento dell'inoculo, una percentuale di espressione del CAR anti-hPSMA pari a 76% (T-body-hPSMA 72h) e 92% (T-body-hPSMA 5°px).

7.2 Somministrazione loco-regionale e sistemica di T-body-hPSMA

Considerato il risultato positivo del test Winn Assay, si è deciso di valutare l'efficacia terapeutica di PBMC trasdotti con CAR anti-hPSMA in un modello murino di tumore stabilizzato: topi SCID sono stati inoculati s.c. con 3×10^6 cellule PC-3-hPSMA al giorno 0 e successivamente, al giorno 4 (massa tumorale di circa 30 mm^3), con T-body-hPSMA/eGFP, a livello locale o per via sistemica.

Nel caso del trattamento loco-regionale, 10×10^6 T-body-hPSMA/eGFP 72h (PBMC trasdotti 72 ore prima dell'inoculo *in vivo* e non stimolati *in vitro*, 53% c-myc⁺) sono stati inoculati nel sito del tumore, valutando la crescita neoplastica e la sopravvivenza degli animali trattati rispetto al gruppo di controllo (Figura 24). L'inoculo s.c. delle cellule T ha determinato la totale regressione del tumore senza successiva ripresa di crescita durante tutto il periodo di osservazione (70 giorni) nel 50% degli animali trattati. Nel restante 50% degli animali, dopo una iniziale regressione della massa tumorale si è osservata una ripresa della crescita, con un andamento comunque rallentato rispetto ai controlli non trattati. Inoltre, l'inoculo di T-body ha determinato anche un aumento statisticamente significativo della sopravvivenza ($p=0,0028$) negli animali trattati rispetto ai controlli.

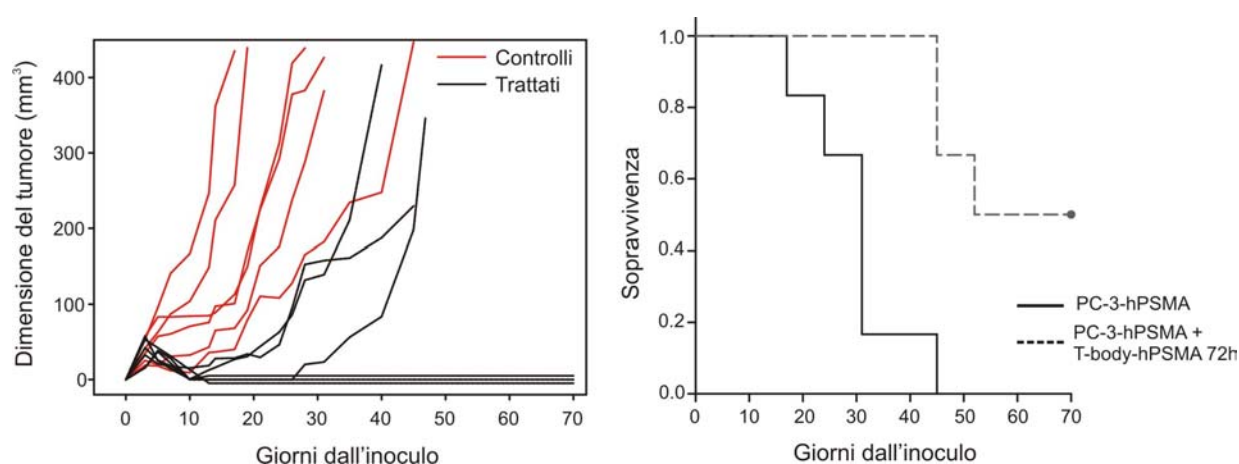


Figura 24. Valutazione dell'efficacia terapeutica *in vivo* mediante somministrazione loco-regionale. 10×10^6 T-body-hPSMA a 72 ore dalla trasduzione sono stati inoculati nel sito tumorale in topi portatori di tumore s.c. PC-3-hPSMA. Il gruppo di controllo è rappresentato da animali non trattati. Un solo inoculo di cellule T ha prodotto la totale scomparsa della massa neoplastica nel 50% degli animali trattati e un aumento della sopravvivenza statisticamente significativo. Numero di topi per gruppo $n=6$.

Per escludere che la ripresa della crescita neoplastica nel 50% degli animali fosse dovuta alla perdita di espressione dell'antigene da parte delle cellule tumorali *in vivo*, i tumori sottocutanei sono stati espunti e analizzati al citofluorimetro per l'espressione di hPSMA, utilizzando come controllo positivo la linea cellulare PC-3-hPSMA mantenuta in coltura (Figura 25). L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato una riduzione dell'intensità di espressione ma non la perdita dell'antigene nelle masse tumorali dei topi trattati, indicando quindi che il fallimento della terapia è verisimilmente imputabile, in questo caso, ad un numero insufficiente di linfociti inoculati in rapporto al numero di cellule tumorali.

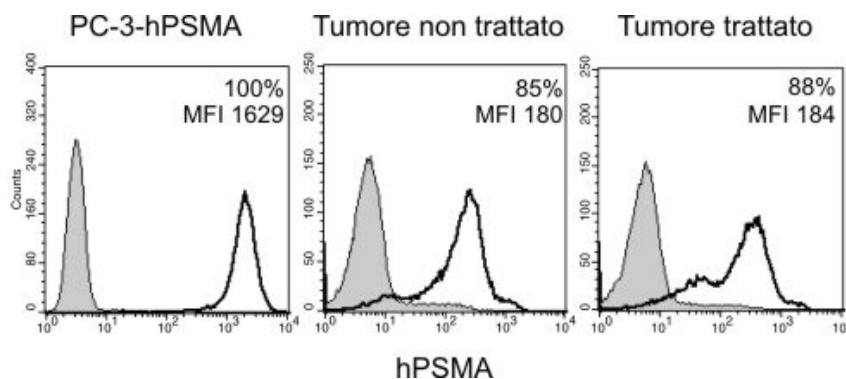


Figura 25. Espressione dell'antigene hPSMA nei tumori in vivo. Le masse tumorali indotte dall'inoculo s.c. di PC-3-hPSMA sono state espianate e si è valutata l'espressione dell'antigene hPSMA mediante marcatura citofluorimetrica con anticorpo anti-hPSMA. I pannelli citofluorimetrici riportano campioni rappresentativi; da sinistra verso destra: linea cellulare PC-3-hPSMA, massa tumorale nei topi controllo, massa tumorale nei topi trattati con T-body-hPSMA.

L'attività terapeutica delle cellule T ingegnerizzate con CAR anti-hPSMA è stata valutata anche mediante somministrazione sistemica endovenosa in topi SCID portatori di tumore s.c. stabilizzato (massa tumorale di circa 30mm³) indotto dall'inoculo di PC-3-hPSMA. In questo caso, 10x10⁶ cellule T trasdotte sono state inoculate e.v. negli animali, confrontando l'efficacia terapeutica di una popolazione T-body-hPSMA/eGFP a 72 ore dalla trasduzione (indicata come T-body-hPSMA/eGFP 72h, 79% c-myc⁺) con quella di una popolazione T con fenotipo più differenziato, dopo numerosi cicli di stimolazione *in vitro* (indicata come T-body-hPSMA/fluc 17°px). Per favorire la sopravvivenza dei linfociti *in vivo*, agli animali è stata somministrata hrIL-2 (60.000 U/die).

Un singolo inoculo di T-body per via sistemica non ha indotto alcuna regressione della massa neoplastica e nessun significativo ritardo della crescita del tumore (Figura 26).

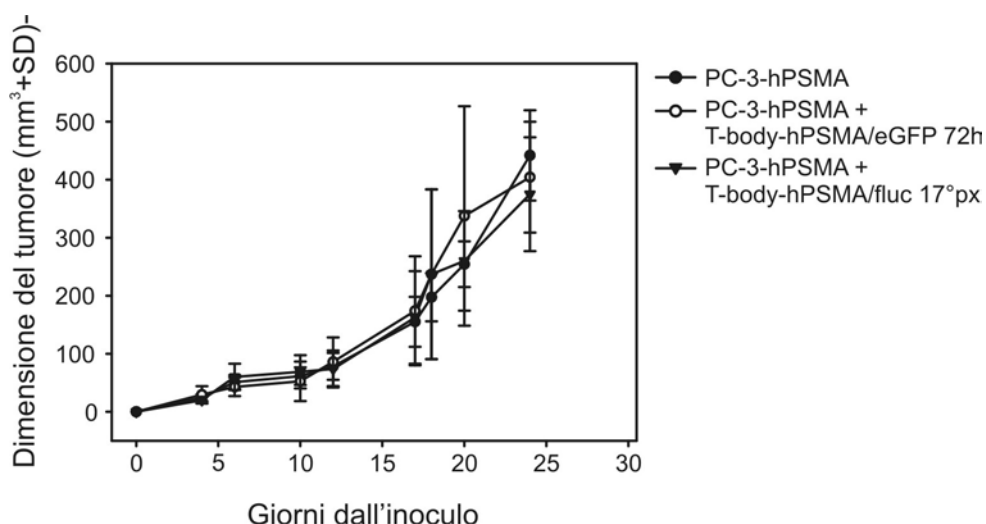


Figura 26. Valutazione dell'efficacia terapeutica *in vivo* mediante somministrazione sistemica. 10×10^6 T-body-hPSMA/eGFP 72h o T-body-hPSMA/fluc 17°px sono stati inoculati e.v. in topi portatori di tumore s.c. PC-3-hPSMA. Il gruppo di controllo è rappresentato da animali non trattati. Un singolo inoculo di cellule T non ha indotto alcuna significativa regressione della crescita tumorale. Numero di topi per gruppo n=6.

In conclusione, le cellule T ingegnerizzate con CAR anti-hPSMA si sono dimostrate efficaci, in un modello murino di tumore prostatico s.c., se co-inoculate con le cellule tumorali (schema del Winn Assay) o se somministrate a livello loco-regionale in un tumore stabilizzato. Per quanto riguarda la somministrazione e.v., i dati finora raccolti dimostrano il fallimento terapeutico di un singolo inoculo di cellule T, probabilmente dovuto alla scarsa persistenza *in vivo* delle cellule trasferite e alla loro incapacità di raggiungere il sito tumorale, come evidenziato nel paragrafo successivo. Rimane da valutare se un maggior numero di T-body inoculati, o più inoculi successivi, possano aumentare le possibilità di trattare un tumore sottocutaneo stabilizzato; sarà infine interessante sviluppare un modello di metastasi indotte da PC-3-hPSMA per valutare l'attività terapeutica dei T-body dopo somministrazione sistemica nei confronti di metastasi.

8. STUDIO DELLA DISTRIBUZIONE *IN VIVO* DEI T-BODY MEDIANTE IMAGING DI BIOLUMINESCENZA

Un aspetto critico in un protocollo di ACT è rappresentato dalla capacità di sopravvivenza e di *homing* al sito tumorale dei linfociti trasferiti, fattori indispensabili per ottenere un risultato terapeutico.

L'utilizzo di un vettore lentivirale bidirezionale per l'espressione contemporanea del CAR anti-hPSMA e del gene reporter *Firefly Luciferasi*, ha permesso di sfruttare moderne tecniche di imaging preclinico, bioluminescenza in particolare, per ottenere in tempo reale informazioni spaziali e temporali sulla distribuzione delle cellule T, sulla loro persistenza e accumulo al sito tumorale dopo trasferimento adottivo. Questi dati consentono di predire la risposta anti-tumorale e di modificare, se necessario, la terapia al fine di ottimizzare i risultati.

Per le analisi di BLI si è inizialmente valutato il limite di sensibilità dello strumento per la rilevazione del segnale dopo inoculo e.v. di T-body-hPSMA/fluc, concludendo che quantità inferiori a 1×10^6 cellule sono difficilmente rilevabili (Figura 27A).

Per gli esperimenti di monitoraggio del destino biologico dei linfociti ingegnerizzati, topi SCID portatori di tumore s.c. PC-3-hPSMA (e, in alcuni casi, PC-3 sul fianco controlaterale) sono stati inoculati e.v. con 10×10^6 linfociti T-body-hPSMA/fluc ripetutamente stimolati *in vitro* (1 mese e 2 mesi) e analizzati a tempistiche successive all'inoculo per valutarne la diffusione, la sopravvivenza e la capacità *homing* al sito tumorale. I risultati ottenuti indicano che tali cellule non sopravvivono a lungo nell'animale e che solo una piccola parte è in grado di raggiungere la massa neoplastica (Figura 27B). Dati analoghi sono stati ottenuti anche in caso di somministrazione di IL-2 esogena (dati non mostrati).

La scarsa sopravvivenza e/o la difficoltà di raggiungere il sito tumorale dopo inoculo per via sistemica sono probabilmente la principale causa della mancata funzione effettrice anti-tumorale in questo modello sperimentale.

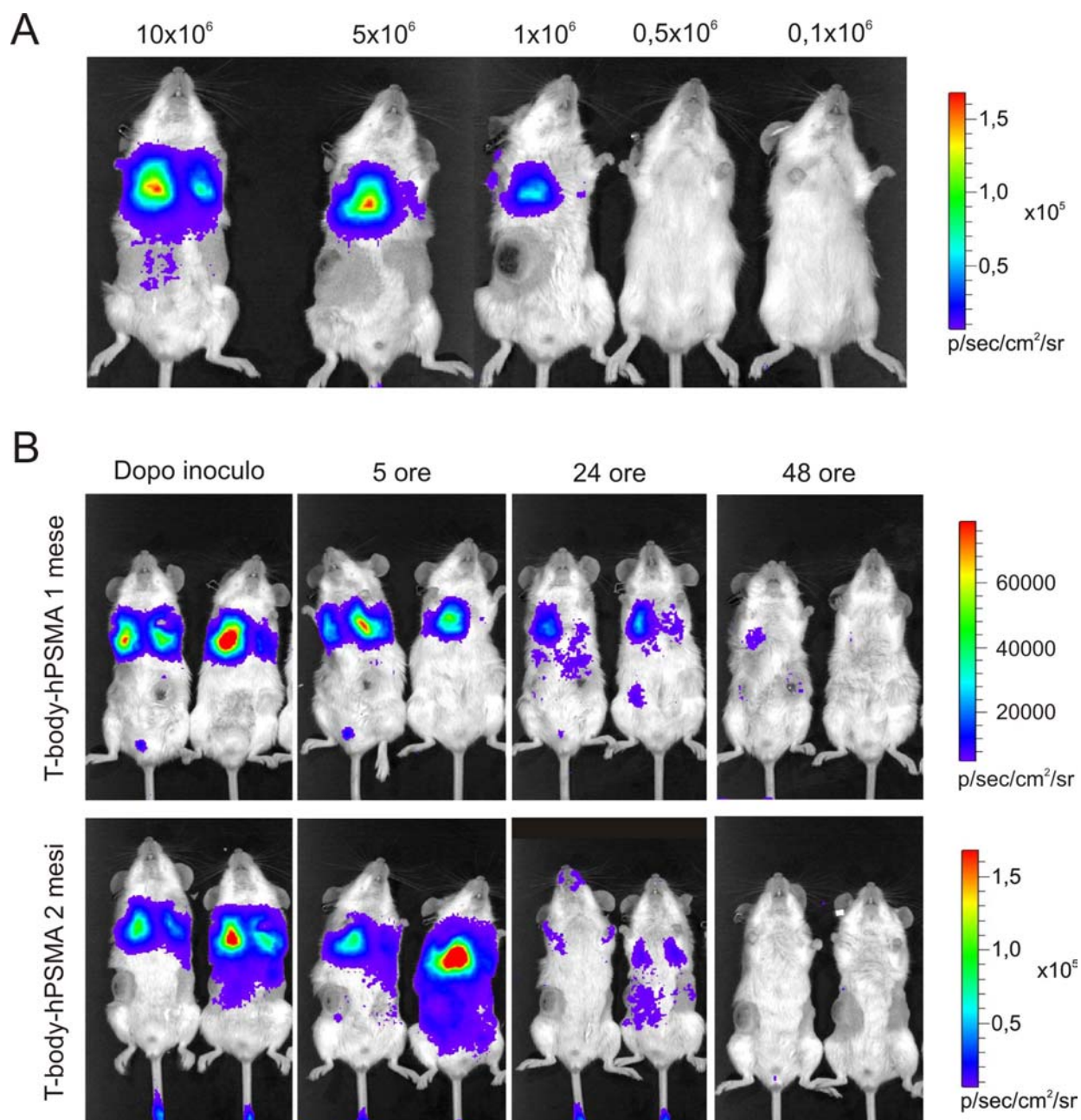


Figura 27. BLI imaging: analisi della sopravvivenza e della distribuzione di T-body trasferiti adottivamente e.v. (A) Valutazione del numero minimo di cellule esprimenti Luciferasi che possono essere visualizzate in un animale dopo trasferimento per via sistemica. (B) Monitoraggio, a diverse tempistiche dall'inoculo endovenoso (subito dopo inoculo, 5 ore, 24 ore, 48 ore) della distribuzione e della sopravvivenza dei linfociti trasferiti adottivamente. In figura si riportano immagini rappresentative di animali inoculati con colture T-body-hPSMA/fluc ripetutamente stimulate *in vitro* e caratterizzate da un fenotipo differenziato.

DISCUSSIONE

Nonostante le enormi potenzialità del sistema immunitario di riconoscere e, in alcuni casi, rigettare cellule tumorali autologhe, le applicazioni cliniche dell'immunoterapia hanno dimostrato, ad oggi, un numero limitato di successi terapeutici, sollevando problematiche e difficoltà tecniche nel trasferire ai tumori umani le conoscenze e i modelli *in vitro* e preclinici. I risultati degli studi clinici hanno inoltre dimostrato che un singolo approccio immunoterapeutico, sia esso l'utilizzo di cellule citotossiche o di anticorpi monoclonali, potrebbe essere insufficiente ad eradicare in modo efficace la neoplasia, permettendo al contrario la sopravvivenza di cellule tumorali capaci di adattarsi ai meccanismi di difesa dell'ospite o ai trattamenti terapeutici, soprattutto in presenza di malattia metastatica. Le basse frequenze di successo dei protocolli di immunizzazione attiva e le problematiche emerse anche con approcci di immunizzazione passiva, impongono una rivalutazione dell'immunoterapia e la messa a punto di protocolli terapeutici di "seconda generazione", caratterizzati dalla combinazione di diverse strategie di intervento.

La comprensione dei meccanismi di evasione tumorale rappresenta uno dei principali successi dell'immunologia e ha aperto nuovi filoni di ricerca volti ad implementare l'efficacia delle iniziali strategie immunoterapeutiche. Le cellule tumorali sono in grado di evadere la risposta immunitaria in vari modi: i) espressione minima o assente di Ag tumore-specifici, ii) espressione di Ag verso cui il sistema immunitario è divenuto tollerante o anergico, iii) modulazione negativa dell'espressione di molecole MHC, iv) alterazioni nella via di processazione e/o presentazione antigenica, v) assenza di appropriati costimoli per l'attivazione completa delle cellule T effettrici, vi) presenza di molecole inibitorie attivamente secrete dal microambiente tumorale; vii) espansione di cellule T con funzioni soppressorie.

Oltre alla necessità di superare queste difficoltà, una strategia immunoterapeutica di successo deve anche tener conto di tutte le considerazioni di tipo teorico, pratico ed etico che inevitabilmente intervengono in vari aspetti del processo di generazione di cellule destinate all'utilizzo clinico: i) la scelta dell'antigene "giusto", espresso dal tumore e potenzialmente condiviso dal maggior numero di pazienti, ii) lo sviluppo di sicure metodiche di manipolazione per la generazione di un elevato numero di cellule in tempi relativamente rapidi, iii) l'utilizzo di adeguate GMP (Good Manufacturing Practice).

Nell'ambito della terapia cellulare adottiva, l'ingegnerizzazione di cellule T con recettori specifici per TAA o TSA rappresenta ad oggi una strategia sempre più utilizzata, sostenuta dall'idea che la modificazione di linfociti autologhi può generare cellule dalle capacità

implementate, più potenti e con una finestra terapeutica più ampia rispetto al trasferimento di cellule T endogene o allogeniche.

Considerate le problematiche relative all'utilizzo di TCR transgenici (difficoltà, in alcuni istotipi neoplastici, di isolare linfociti endogeni ad alta affinità per antigeni tumorali, da cui derivare i geni per le catene del TCR; rischio di competizione tra catene endogene ed esogene del TCR; limitazioni di utilizzo dettate dall'HLA del paziente e perdita di efficacia nei casi di modulazione negativa delle molecole MHC da parte del tumore), negli ultimi anni è stata proposta una strategia alternativa di ingegnerizzazione di cellule T con recettori chimerici per l'antigene (CAR), che si propongono come attraente e promettente linea di ricerca.

I recettori chimerici sono TCR artificiali costituiti da un dominio anticorpale di legame all'antigene (in genere il scFv di mAb), fuso a molecole di trasduzione del segnale derivate dal complesso TCR per l'attivazione della cellula T. Questo tipo di struttura combina pertanto, in una singola molecola di fusione, la capacità di un anticorpo di legare antigeni superficiali con elevata affinità e specificità con la capacità di *homing*, di penetrazione tissutale e la potente funzione effettrice antitumorale dei linfociti T^{70, 88}: espresso su cellule T, il recettore chimerico rende il riconoscimento antigenico funzionalmente indipendente dalla presentazione MHC-mediata in quanto il frammento scFv lega direttamente l'antigene (proteine, carboidrati, glicolipidi) sulla superficie della cellula bersaglio. I T-body, cellule T esprimenti un CAR, possono quindi essere utilizzati in pazienti diversi e contro un ampio spettro di tumori, anche in caso di modulazione negativa dell'espressione delle molecole MHC; possono inoltre essere generati contro un elevatissimo numero di TAA, grazie alla relativa facilità di produrre i corrispondenti anticorpi monoclonali. Fondamentale per questo tipo di approccio è individuare antigeni espressi ad alti livelli sulla cellula tumorale, ma assenti sui tessuti normali.

Il carcinoma prostatico rappresenta un bersaglio ideale per un approccio immunoterapeutico; l'antigene tessuto specifico PSMA, altamente espresso in tumori aggressivi, metastatici e nella neovascolatura tumorale, si è dimostrato efficace sia per la diagnosi di neoplasia che per il targeting terapeutico mediante utilizzo di immunotossine¹⁸⁶.

L'immunoterapia passiva con anticorpi monoclonali anti-PSMA, marcati con radioisotopi o legati a tossine, non ha tuttavia prodotto, ad oggi, i risultati attesi; la combinazione di due potenti strategie, mediante il trasferimento ad una cellula T della capacità di riconoscimento e dell'elevata specificità anticorpale, potrebbe incrementare l'efficacia terapeutica nei confronti del carcinoma prostatico.

Alcuni lavori hanno già dimostrato che recettori chimerici scFv-CD3ζ anti-hPSMA sono effettivamente in grado di direzionare l'attività citotossica di linfociti contro l'antigene di

interesse e possono rallentare la crescita neoplastica *in vivo* in modelli murini di tumore prostatico^{98, 188-190}.

In questo studio si è scelto di generare un CAR di seconda generazione, contenente il scFv anti-hPSMA fuso a porzioni derivate dalla molecola costimolatoria CD28 e dalla molecola di segnalazione intracellulare CD3 ζ ¹⁰⁰; sulla base di numerosi dati di letteratura, infatti, la presenza della molecola costimolatoria CD28 aumenta la funzionalità del recettore e garantisce una maggiore capacità proliferativa e di sopravvivenza delle cellule T trasdotte.

Ad oggi la maggior parte dei protocolli di ingegnerizzazione di cellule T utilizza vettori retrovirali (RV), di cui si possiede una notevole esperienza anche in ambito clinico^{195, 196}; l'utilizzo di vettori RV è tuttavia caratterizzato da alcune problematiche, come il rischio di mutagenesi inserzionale, di silenziamento genico e la necessità di un'attiva replicazione cellulare per l'integrazione del transgene nel genoma della cellula ospite.

Negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata su vettori lentivirali (LV) sulla base di peculiari caratteristiche che li rendono un'attraente alternativa per l'ingegnerizzazione di cellule T e applicazioni di terapia genica⁷². I vettori LV offrono infatti alcuni vantaggi rispetto ai vettori RV, tra cui riteniamo fondamentali il diminuito rischio di mutagenesi inserzionale¹⁴⁶, la stabilità di espressione del transgene¹⁴¹ e la capacità di mediare l'integrazione di transgeni anche nel genoma di cellule ospiti non replicanti^{142, 143}, come PBL poco stimolati^{151, 152}.

Quest'ultimo aspetto, in particolare, rappresenta un fattore potenzialmente in grado di influire sull'efficacia terapeutica delle cellule ingegnerizzate, poichè le ripetute stimolazioni *in vitro* necessarie per la trasduzione con vettori RV possono alterare le proprietà biologiche dei linfociti T in termini di emivita, repertorio e competenza immunologica¹⁵². Al contrario, la capacità dei vettori LV di trasdurre cellule non in attiva replicazione permette un accorciamento della fase di manipolazione cellulare *ex vivo*, fornendo la possibilità di ottenere un elevato numero di cellule T con fenotipo *memory*, ottimale per scopi terapeutici^{54, 55, 119}.

La precedente esperienza di laboratorio sull'ingegnerizzazione di cellule T mediante vettori LV¹⁸⁷ e i primi dati clinici incoraggianti in termini di efficacia e sicurezza di questi vettori^{153, 154}, ci hanno spinto a sviluppare un protocollo affidabile, riproducibile e orientato all'applicazione clinica per il ridirezionamento di PBMC mediante trasferimento genico di CAR anti-hPSMA con vettori lentivirali. In particolare sono stati utilizzati vettori LV *self inactivating* di ultima generazione, caratterizzati dall'eliminazione di tutti i geni di HIV-1 non essenziali per la replicazione; il vettore di trasferimento è dotato inoltre di un promotore sintetico bidirezionale recentemente descritto¹⁴⁹ che permette un'espressione elevata e coordinata di due transgeni.

In questo lavoro cellule T sono state trasdotte con il CAR anti-hPSMA e il gene reporter *Firefly Luciferase* (o eGFP) per studiare il destino biologico della popolazione T transgenica dopo trasferimento adottivo, mediante tecniche di imaging ottico; in alternativa al gene *reporter* è possibile implementare la funzionalità della cellula esprimendo geni che ne aumentano la sopravvivenza, geni di controllo per limitare il rischio di potenziale tossicità (molecole di suicidio) o un secondo CAR diretto contro un altro antigene tumorale, nel contesto di una terapia multi-bersaglio.

Lo studio condotto ha dimostrato che i vettori LV esprimenti il CAR anti-hPSMA e un gene *reporter* consentono di trasdurre linee tumorali stabilizzate (Jurkat) e PBMC umani, generando in quest'ultimo caso T-body funzionali che possono essere facilmente espansi *in vitro* in modo Ag-specifico; l'inserimento del myc Tag nella porzione extracellulare del CAR permette inoltre la rapida e semplice rilevazione dell'espressione in membrana del recettore chimerico e la valutazione dell'efficienza di trasferimento genico mediante marcatura citofluorimetrica.

La scelta del protocollo di trasduzione ottimizzato per la generazione di popolazioni T cellulari esprimenti il CAR anti-hPSMA è stata effettuata considerando come obiettivi fondamentali la generazione, in tempi brevi, di un elevato numero di cellule, una significativa espressione del recettore chimerico e un fenotipo poco differenziato, che i recenti dati di letteratura indicano come ottimale per scopi terapeutici. Gattinoni *et al.*⁵⁴ hanno infatti dimostrato che, in un modello murino di ACT, cellule T effettrici pienamente differenziate, sebbene capaci *in vitro* di attività anti-tumorale e di rilascio di IFN- γ a livelli elevati, presentano *in vivo* un'attività terapeutica inferiore rispetto a cellule T naive o meno differenziate. Nonostante i PBMC isolati da sangue periferico siano prevalentemente in fase G₀, la stimolazione con OKT-3 induce rapidamente il passaggio alla fase G₁ del ciclo, rendendo le cellule permissive alla trasduzione da parte di vettori LV, in assenza però di una completa attivazione TCR-mediata.

L'analisi *in vitro* della popolazione di T-body ottenuta ha rivelato una buona espressione del CAR già a 72 ore dalla trasduzione, la capacità dei PBMC ridirezionati di lisare in modo specifico cellule esprimenti hPSMA e di secernere IFN- γ ; l'attività litica, inizialmente ridotta, aumenta dopo stimolazioni antigeniche ripetute. L'analisi di espressione di marcatori di superficie (CD62L, CD27, CD28, CCR-7, CD57) a 72 ore dalla trasduzione ha permesso di definire il fenotipo delle cellule T come *memory*, portandoci alla decisione di utilizzare una popolazione con questo tipo di caratteristiche per gli studi di trasferimento adottivo.

La capacità dei vettori LV di determinare un'espressione significativa del CAR (superiore al 50%) in cellule T scarsamente differenziate, rappresenta a nostro parere una condizione fondamentale per l'esito positivo di una terapia anti-tumorale *in vivo*, anche in assenza di

capacità litica e produzione di IFN- γ elevate *in vitro*. Inoltre a 72 ore dalla trasduzione i linfociti T CD4⁺ costituiscono ancora il 40-50% della popolazione di T-body, mentre diminuiscono progressivamente a vantaggio della componente CD8⁺ dopo stimolazioni antigeniche successive.

Finora le cellule T CD4⁺ sono sempre state associate ad un ruolo effettore indiretto, poiché sono coinvolte nel *priming* della risposta anti tumorale, stimolano la funzionalità dei linfociti CD8⁺ e organizzano l'immunità innata; in alcuni modelli murini è stato documentato però un ruolo più diretto e tali cellule possono avere anche attività citotossica, dimostrata finora solo per colture clonali *in vitro*. Poiché la presenza di linfociti T *helper* consente una maggiore espansione della popolazione CD8⁺ e l'acquisizione della memoria immunologica^{56, 57}, il trasferimento *in vivo* di una popolazione policlonale CD4⁺/CD8⁺ potrebbe determinare migliori risultati terapeutici.

A 72 ore dalla trasduzione la popolazione T trasdotta, caratterizzata funzionalmente e fenotipicamente, è stata trasferita *in vivo*, confrontandone l'efficacia con quella di popolazioni più differenziate (ristimate *in vitro* settimanalmente con cellule tumorali LNCaP esprimenti hPSMA).

Un classico test Winn Assay ha dimostrato l'attività citotossica specifica anche *in vivo* ed ha incoraggiato la valutazione dell'efficacia terapeutica dei T-body anti-hPSMA in un modello murino di tumore stabilizzato, indotto dall'inoculo s.c. di cellule PC-3-hPSMA in topi SCID.

Un singolo inoculo di T-body a livello locale ha determinato la regressione del tumore negli animali trattati, seguita dalla ripresa di crescita della massa neoplastica nel 50% dei casi; complessivamente si sono osservati un rallentamento della crescita tumorale e un aumento della sopravvivenza statisticamente significativo. L'espressione dell'antigene hPSMA nei tumori degli animali trattati è leggermente inferiore rispetto alla coltura di cellule tumorali: la perdita di espressione dell'antigene non rappresenta in questo caso un meccanismo di immunoevasione e la causa della mancata attività terapeutica. Un quantitativo superiore di cellule infuse o più inoculi ripetuti potrebbero essere, a nostro parere, sufficienti in queste condizioni a mediare la regressione completa della neoplasia.

Al contrario, un singolo inoculo sistemico di T-body non ha indotto alcun rallentamento della crescita neoplastica: in questo caso, l'ipotesi più probabile di tale insuccesso è il mancato *homing* al sito tumorale di un numero di cellule sufficientemente elevato da esplicitare un'azione terapeutica.

E' noto che un aspetto critico per il successo di un protocollo di ACT è rappresentato dalla capacità delle cellule T trasferite di sopravvivere nell'ospite e di raggiungere il sito tumorale dove esplicitare la funzione effettrice; l'utilizzo di un vettore LV bidirezionale per l'espressione

contemporanea di *Firefly Luciferase* ci ha permesso di analizzare la distribuzione dei linfociti in modo non invasivo e in tempo reale, mediante imaging di bioluminescenza *in vivo*.

In seguito all'inoculo per via sistemica, i T-body si accumulano a livello polmonare nelle prime ore, dimostrando una scarsa capacità di ricircolazione; dopo 48 ore dall'inoculo, inoltre, il segnale di bioluminescenza è assente nella maggior parte degli animali, anche in presenza di IL-2 esogena. Queste analisi sono state condotte utilizzando cellule T ripetutamente stimulate *in vitro* (per ottenere quantitativi elevati di cellule da trasferire), ma rimane da valutare se T-body con fenotipo meno differenziato siano in grado di sopravvivere più a lungo e ricircolare con maggiore efficienza nell'animale; tuttavia il fallimento terapeutico dei T-body inoculati a 72 ore dalla trasduzione può indirettamente farne ipotizzare la scarsa sopravvivenza e l'incapacità di accumularsi a livello del sito tumorale.

Alla luce di questi dati, è necessario fare alcune considerazioni, che riguardano il protocollo di trasferimento, la validità delle metodiche di analisi e il tipo di modello utilizzati in questo studio. I dati positivi sulla funzionalità *in vitro* dei T-body generati e sulla loro capacità di lisare cellule tumorali anche *in vivo*, ci spingono a chiarire quali fattori possano implementare l'efficacia terapeutica delle cellule T infuse per via sistemica, per ottimizzare i protocolli di trasferimento adottivo; tra le ipotesi da valutare ci sono l'infusione di un numero maggiore di linfociti, più inoculi ripetuti e l'utilizzo di regimi di preconditionamento dell'ospite, con somministrazione di IL-2 esogena in tutti i casi.

Riguardo alla metodica di indagine del destino biologico delle cellule trasferite, l'imaging di bioluminescenza è una tecnica molto sensibile e potenzialmente in grado di rilevare un numero anche ridotto di cellule esprimenti Luciferasi, ma non è ancora abbastanza ottimizzata da poter dare informazioni sulla presenza/assenza di cellule singole¹⁶⁵. Inoltre esperimenti preliminari di valutazione del limite di sensibilità dello strumento nel nostro modello sperimentale hanno chiarito che quantitativi di cellule inferiori a 1×10^6 sono difficilmente rilevabili. Negli esperimenti di biodistribuzione dopo inoculo e.v. l'assenza di segnale a 48 ore non correla quindi necessariamente con la totale scomparsa dei linfociti, ma potrebbe anche indicare la presenza di un quantitativo di cellule troppo ridotto per poter essere rilevato: in entrambi i casi, comunque, il numero di cellule in circolo o a livello della massa tumorale è insufficiente in rapporto alle cellule neoplastiche per poter mediare un effetto terapeutico nei confronti di un tumore stabilizzato.

Oltre alle condizioni di coltura e alle caratteristiche fenotipiche delle cellule T, anche il modello sperimentale utilizzato può influire sulla capacità di sopravvivenza, con un notevole impatto sull'esito del trasferimento adottivo. Essendo il nostro studio orientato ad applicazioni cliniche,

si è scelto di ingegnerizzare PBMC umani, ma la loro capacità di sopravvivere e ricircolare *in vivo* potrebbe non essere ottimale in un ospite murino.

Con l'obiettivo di disporre di un modello completamente fisiologico (cellule murine trasferite in topo) in cui studiare il destino biologico di cellule T in protocolli di ACT, sono stati eseguiti alcuni esperimenti preliminari per valutare la capacità dei vettori LV descritti di trasdurre linfociti murini: l'efficienza di trasduzione è inferiore rispetto a PBMC umani, ma i T-body sono funzionali e capaci di lisare in modo specifico linee tumorali murine esprimenti hPSMA. Al momento attuale la problematica riscontrata è la scarsa capacità proliferativa *in vitro*, che in base ai dati di letteratura è probabilmente ascrivibile alla presenza di una molecola costimolatoria CD28 umana come componente del CAR: la decisione di proseguire su questa strada impone una modificazione della struttura del CAR o l'ottimizzazione di protocolli di espansione *in vitro* che consentano di compensare l'assenza di un appropriato costimolo nella struttura del recettore.

Una volta chiarite le dinamiche di ricircolazione, persistenza e *homing* al sito tumorale in un modello completamente fisiologico, il nostro obiettivo sarà quello di indagare altri aspetti connessi all'utilizzo di recettori chimerici in immunoterapia adottiva. Sarà innanzitutto interessante valutare l'attività terapeutica di T-body anti-hPSMA nei confronti di metastasi, in un modello di tumore metastatico indotto dall'inoculo endovenoso di PC-3-hPSMA.

In un contesto in continua evoluzione e rimodellamento come quello di un tumore il targeting di un unico antigene tumorale potrebbe generare la comparsa di varianti con minore o assente espressione dell'antigene, vanificando così la reazione immunitaria. La costruzione di un secondo CAR anti-hPSCA (human Prostate Stem Cell Antigen, un altro importante biomarcatore del carcinoma prostatico) e l'ingegnerizzazione di cellule T con entrambi i CAR (anti-hPSMA e anti-hPSCA) o l'utilizzo di popolazioni miste T-body-antiPSMA e T-body-antiPSCA consentirà di colpire antigeni diversi, con un potenziale beneficio clinico oggettivo.

Infine, potendo ridirezionare cellule T sia $CD4^+$ che $CD8^+$, l'approccio basato sui CAR si configura come un metodo molto potente per generare elevate quantità di cellule T *helper* e citotossiche antigene-specifiche, fornendo la possibilità di valutare il contributo relativo delle due popolazioni all'eradicazione del tumore.

In definitiva, l'ingegnerizzazione di cellule T con recettori chimerici rappresenta una strategia realizzabile, sicura e vantaggiosa; i risultati ottenuti in questo lavoro, in particolare lo sviluppo di un recettore chimerico anti-hPSMA di seconda generazione e l'utilizzo di vettori LV per

l'ingegnerizzazione di linfociti, costituiscono un razionale per future applicazioni cliniche di questo tipo di approccio in pazienti con carcinoma prostatico.

ABBREVIAZIONI

aa: amminoacidi
ACT: terapia cellulare adottiva
Ag: antigene
AIDS: sindrome da immunodeficienza acquisita
APC: cellula presentante l'antigene
BLI: *Bioluminescence imaging*
CAIX: anidrasi carbonica IX
CAR: *Chimeric Antigen Receptor*
ChTCR: *Chimeric T Cell Receptor*
CMV: Cytomegalovirus
cPPT: *central polypurine tract*
CTE: *Constitutive Transport Element*
CTL: linfocita T citotossico
DC: cellule dendritiche
DLI: *Donor Lymphocyte Infusion*
e.v.: endovena
EBV: Virus di Epstein-Barr
eGFP: *enhanced Green Fluorescent Protein*
FBS: siero fetale bovino
FLI: *Fluorescence imaging*
fluc: *Firefly luciferase*
FOV: *field of view*
GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
HIV-1: virus umano dell'immunodeficienza di tipo 1
HLA: *Human Leukocyte Antigen*
hPGK: gene della fosfoglicerato chinasi umana
HSC: cellule staminali ematopoietiche
HSV-Tk: gene timidina chinasi del virus Herpes simplex
i.p.: intraperitoneo
IFN- γ : interferone γ
IL: interleuchina
IRES: *internal ribosome entry sites*
Le^Y: antigene Le^Y
LTR: *long terminal repeat*
LV: vettori lentivirali
mAb: anticorpo monoclonale
MCS: *multiple cloning site*
MDSC: cellule mieloidi soppressorie
MHC: complesso maggiore di istocompatibilità
MoMuLV: Virus della leucemia murina di Moloney
MRI: *Magnetic Resonance Imaging*
MSCV: virus murino delle cellule staminali
NIR: *Near infrared*
NK: cellula natural killer
NK T: cellula T natural killer
o.n.: overnight
PBL: linfociti del sangue periferico

PBS: *Phosphate Buffered saline*
 PBMC: cellule mononucleate del sangue periferico
 PET: *Positron Emission Tomography*
 PSA: *Prostate Specific Antigen*
 PSCA: *Prostate Stem Cell Antigen*
 PSMA: *Prostate Specific Membrane Antigen*
 PTLT: disordine linfoproliferativo post-trapianto
 r.T.: temperatura ambiente
 RCR: particelle virali competenti per la replicazione
 ROI: *region of interest*
 RSV: virus del sarcoma di Rous
 RV: vettori retrovirali
 s.c.: sotto cute
 scFv: single-chain variable fragment
 SCID: *Severe Combined Immunodeficiency*
 SIN: *Self inactivating*
 SPECT: *Single Photon Emission Computed Tomography*
 SPF: *specific pathogen free*
 TAA: antigeni tumore associati
 T_{CM}: cellule T *central memory*
 TCR: *T Cell Receptor*
 T_{EM}: cellule T *effector memory*
 TGF- β : fattore di crescita trasformante β
 Th1: T *helper* 1
 TIL: linfociti infiltranti il tumore
 TNF- α : fattore di necrosi tumorale α
 Treg: cellule T regolatorie
 TSA: antigeni tumore specifici
 VSV-G: proteina G del virus della stomatite vescicolare
 WPRE: *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*

BIBLIOGRAFIA

1. Rescigno, M., Avogadri, F. & Curigliano, G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 1776, 108-23 (2007).
2. Stagg, J., Johnstone, R. W. & Smyth, M. J. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 220, 82-101 (2007).
3. Old, L. J. & Boyse, E. A. Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med* 15, 167-86 (1964).
4. Burnet, M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 1, 841-7 (1957).
5. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27 (1970).
6. Burnet, M. Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis. *Br Med Bull* 20, 154-8 (1964).
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. Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1, 447-56 (1994).
9. Smyth, M. J. et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191, 661-8 (2000).
10. Street, S. E., Cretney, E. & Smyth, M. J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192-7 (2001).
11. van den Broek, M. E. et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 184, 1781-90 (1996).
12. Shankaran, V. et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-11 (2001).
13. Pardoll, D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21, 807-39 (2003).
14. Kaplan, D. H. et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7556-61 (1998).
15. Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-95 (2000).
16. Smyth, M. J. et al. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18, 1-6 (2003).
17. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6, 715-27 (2006).
18. 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).
19. Thompson, R. H. et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 1757-61 (2007).
20. Ardavin, C., Amigorena, S. & Reis e Sousa, C. Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity* 20, 17-23 (2004).
21. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-5 (2002).

22. Gallina, G. et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 116, 2777-90 (2006).
23. Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D. I. Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 55, 237-45 (2006).
24. Yang, L. et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 409-21 (2004).
25. Curiel, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 117, 1167-74 (2007).
26. Miyara, M. & Sakaguchi, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13, 108-16 (2007).
27. Wang, R. F. Functional control of regulatory T cells and cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 16, 106-14 (2006).
28. Terabe, M. et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1, 515-20 (2000).
29. Critchley-Thorne, R. J. et al. Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. *PLoS Med* 4, e176 (2007).
30. Bronte, V. et al. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med* 201, 1257-68 (2005).
31. Guilloux, Y. et al. Defective lymphokine production by most CD8⁺ and CD4⁺ tumor-specific T cell clones derived from human melanoma-infiltrating lymphocytes in response to autologous tumor cells in vitro. *Eur J Immunol* 24, 1966-73 (1994).
32. Roussel, E., Gingras, M. C., Grimm, E. A. & Roth, J. A. High expression of adhesion molecules/activation markers with little interleukin-2, interferon gamma, and tumor necrosis factor beta gene activation in fresh tumor-infiltrating lymphocytes from lung adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 41, 1-9 (1995).
33. Rosenberg, S. A. Shedding light on immunotherapy for cancer. *N Engl J Med* 350, 1461-3 (2004).
34. Bergman, P. J. Cancer immunotherapy. *Top Companion Anim Med* 24, 130-6 (2009).
35. Cavallo, F. et al. Protective and curative potential of vaccination with interleukin-2-gene-transfected cells from a spontaneous mouse mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 53, 5067-70 (1993).
36. Degl'Innocenti, E. et al. Peripheral T cell tolerance occurs early during spontaneous prostate cancer development and can be rescued by dendritic cell immunization. *Eur J Immunol* 35, 66-75 (2005).
37. Quaglino, E. et al. Electroporated DNA vaccine clears away multifocal mammary carcinomas in her-2/neu transgenic mice. *Cancer Res* 64, 2858-64 (2004).
38. Ye, X., McCarrick, J., Jewett, L. & Knowles, B. B. Timely immunization subverts the development of peripheral nonresponsiveness and suppresses tumor development in simian virus 40 tumor antigen-transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3916-20 (1994).
39. Kao, J. H. & Chen, D. S. Recent updates in hepatitis vaccination and the prevention of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 97, 269-71 (2002).
40. Mao, C. et al. Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 107, 18-27 (2006).
41. Mocellin, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., Lise, M. & Nitti, D. Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncol* 5, 681-9 (2004).
42. Mocellin, S., Semenzato, G., Mandruzzato, S. & Riccardo Rossi, C. Part II: Vaccines for haematological malignant disorders. *Lancet Oncol* 5, 727-37 (2004).
43. Adema, G. J., de Vries, I. J., Punt, C. J. & Figdor, C. G. Migration of dendritic cell based cancer vaccines: in vivo veritas? *Curr Opin Immunol* 17, 170-4 (2005).

44. Banchereau, J. & Palucka, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5, 296-306 (2005).
45. Disis, M. L., Bernhard, H. & Jaffee, E. M. Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. *Lancet* 373, 673-83 (2009).
46. Rosenberg, S. A., Yang, J. C. & Restifo, N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10, 909-15 (2004).
47. Harris, J. E. et al. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol* 18, 148-57 (2000).
48. Hersey, P. et al. Adjuvant immunotherapy of patients with high-risk melanoma using vaccinia viral lysates of melanoma: results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 20, 4181-90 (2002).
49. Bocchia, M. et al. Effect of a p210 multi-peptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet* 365, 657-62 (2005).
50. Redfern, C. H. et al. Phase II trial of idiotype vaccination in previously treated patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma resulting in durable clinical responses. *J Clin Oncol* 24, 3107-12 (2006).
51. Timmerman, J. M. et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, 1517-26 (2002).
52. 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).
53. 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).
54. 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).
55. Klebanoff, C. A. et al. Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9571-6 (2005).
56. Janssen, E. M. et al. CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434, 88-93 (2005).
57. Shedlock, D. J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-9 (2003).
58. 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).
59. Dudley, M. E. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-4 (2002).
60. Bishop, M. R. et al. Allogeneic lymphocytes induce tumor regression of advanced metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 22, 3886-92 (2004).
61. Dazzi, F. et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 2712-6 (2000).
62. Kolb, H. J. et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76, 2462-5 (1990).
63. Lokhorst, H. M. et al. Donor lymphocyte infusions for relapsed multiple myeloma after allogeneic stem-cell transplantation: predictive factors for response and long-term outcome. *J Clin Oncol* 18, 3031-7 (2000).

64. Porter, D. L. et al. Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. *Blood* 95, 1214-21 (2000).
65. Sprangers, B., Van Wijmeersch, B., Fevery, S., Waer, M. & Billiau, A. D. Experimental and clinical approaches for optimization of the graft-versus-leukemia effect. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 404-14 (2007).
66. 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).
67. 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).
68. Einsele, H. et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99, 3916-22 (2002).
69. Berry, L. J., Moeller, M. & Darcy, P. K. Adoptive immunotherapy for cancer: the next generation of gene-engineered immune cells. *Tissue Antigens* 74, 277-89 (2009).
70. Sadelain, M., Brentjens, R. & Riviere, I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 21, 215-23 (2009).
71. June, C. H., Blazar, B. R. & Riley, J. L. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations. *Nat Rev Immunol* 9, 704-16 (2009).
72. Jones, S. et al. Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Hum Gene Ther* 20, 630-40 (2009).
73. 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).
74. 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).
75. 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* 26, 190-201 (2003).
76. Quintarelli, C. et al. Co-expression of cytokine and suicide genes to enhance the activity and safety of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 110, 2793-802 (2007).
77. Charo, J. et al. Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T-cell survival. *Cancer Res* 65, 2001-8 (2005).
78. 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).
79. 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).
80. Hollatz, G. et al. T cells for suicide gene therapy: activation, functionality and clinical relevance. *J Immunol Methods* 331, 69-81 (2008).
81. Ciceri, F. et al. Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 109, 4698-707 (2007).
82. Coccoris, M., de Witte, M. A. & Schumacher, T. N. Prospects and limitations of T cell receptor gene therapy. *Curr Gene Ther* 5, 583-93 (2005).
83. 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).
84. 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).

85. 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).
86. Duval, L. et al. Adoptive transfer of allogeneic cytotoxic T lymphocytes equipped with a HLA-A2 restricted MART-1 T-cell receptor: a phase I trial in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 12, 1229-36 (2006).
87. Morgan, R. A. et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314, 126-9 (2006).
88. Eshhar, Z. The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity. *Handb Exp Pharmacol*, 329-42 (2008).
89. Sadelain, M., Riviere, I. & Brentjens, R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 3, 35-45 (2003).
90. June, C. H. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 117, 1204-12 (2007).
91. Gross, G., Gorochoy, G., Waks, T. & Eshhar, Z. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. *Transplant Proc* 21, 127-30 (1989).
92. Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10024-8 (1989).
93. Gross, G. & Eshhar, Z. Endowing T cells with antibody specificity using chimeric T cell receptors. *Faseb J* 6, 3370-8 (1992).
94. Irving, B. A. & Weiss, A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64, 891-901 (1991).
95. Romeo, C., Amiot, M. & Seed, B. Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* 68, 889-97 (1992).
96. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. & Schindler, D. G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 720-4 (1993).
97. Eshhar, Z. et al. The T-body approach: potential for cancer immunotherapy. *Springer Semin Immunopathol* 18, 199-209 (1996).
98. Gong, M. C. et al. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. *Neoplasia* 1, 123-7 (1999).
99. Finney, H. M., Akbar, A. N. & Lawson, A. D. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol* 172, 104-13 (2004).
100. Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Riviere, I. & Sadelain, M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 20, 70-5 (2002).
101. Haynes, N. M. et al. Rejection of syngeneic colon carcinoma by CTLs expressing single-chain antibody receptors codelivering CD28 costimulation. *J Immunol* 169, 5780-6 (2002).
102. Friedmann-Morvinski, D., Bendavid, A., Waks, T., Schindler, D. & Eshhar, Z. Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation. *Blood* 105, 3087-93 (2005).
103. Koehler, H., Kofler, D., Hombach, A. & Abken, H. CD28 costimulation overcomes transforming growth factor-beta-mediated repression of proliferation of redirected

- human CD4⁺ and CD8⁺ T cells in an antitumor cell attack. *Cancer Res* 67, 2265-73 (2007).
104. Carpenito, C. et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3360-5 (2009).
 105. Milone, M. C. et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther* 17, 1453-64 (2009).
 106. Wang, J. et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Hum Gene Ther* 18, 712-25 (2007).
 107. Zhong, X. S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I. & Sadelain, M. Chimeric Antigen Receptors Combining 4-1BB and CD28 Signaling Domains Augment PI(3)kinase/AKT/Bcl-X(L) Activation and CD8(+) T Cell-mediated Tumor Eradication. *Mol Ther* (2009).
 108. Kahlon, K. S. et al. Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res* 64, 9160-6 (2004).
 109. Altenschmidt, U. et al. Cytolysis of tumor cells expressing the Neu/erbB-2, erbB-3, and erbB-4 receptors by genetically targeted naive T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2, 1001-8 (1996).
 110. Hakomori, S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* 56, 5309-18 (1996).
 111. Westwood, J. A. et al. The Lewis-Y carbohydrate antigen is expressed by many human tumors and can serve as a target for genetically redirected T cells despite the presence of soluble antigen in serum. *J Immunother* 32, 292-301 (2009).
 112. Turatti, F. et al. Redirected activity of human antitumor chimeric immune receptors is governed by antigen and receptor expression levels and affinity of interaction. *J Immunother* 30, 684-93 (2007).
 113. Guest, R. D. et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J Immunother* 28, 203-11 (2005).
 114. Patel, S. D. et al. T-cell killing of heterogenous tumor or viral targets with bispecific chimeric immune receptors. *Cancer Gene Ther* 7, 1127-34 (2000).
 115. Darcy, P. K. et al. Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL. *J Immunol* 164, 3705-12 (2000).
 116. Darcy, P. K., Kershaw, M. H., Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Expression in cytotoxic T lymphocytes of a single-chain anti-carcinoembryonic antigen antibody. Redirected Fas ligand-mediated lysis of colon carcinoma. *Eur J Immunol* 28, 1663-72 (1998).
 117. Brentjens, R. J. et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med* 9, 279-86 (2003).
 118. Zakrzewski, J. L. et al. Tumor immunotherapy across MHC barriers using allogeneic T-cell precursors. *Nat Biotechnol* 26, 453-61 (2008).
 119. Perret, R. & Ronchese, F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8 T-cell population provides the best protection against tumours? *Tissue Antigens* 72, 187-94 (2008).
 120. 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).
 121. 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).

122. 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).
123. Pule, M. A. et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 14, 1264-70 (2008).
124. 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).
125. 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).
126. Wang, G. et al. A T cell-independent antitumor response in mice with bone marrow cells retrovirally transduced with an antibody/Fc-gamma chain chimeric receptor gene recognizing a human ovarian cancer antigen. *Nat Med* 4, 168-72 (1998).
127. Mitsuyasu, R. T. et al. Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 96, 785-93 (2000).
128. Deeks, S. G. et al. A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Mol Ther* 5, 788-97 (2002).
129. Lamers, C. H. et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* 24, e20-2 (2006).
130. 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).
131. Brentjens RJ, H. D., Weiss M, Stefansky J, Przybylowski M, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Taylor C, Hosey J, Heaney M et al. Phase I trial for the treatment of chemo-refractory chronic lymphocytic leukemia with CD19-targeted autologous T cells. *Mol ther* 16, S15 (2008).
132. Dotti, G. & Heslop, H. E. Current status of genetic modification of T cells for cancer treatment. *Cytotherapy* 7, 262-72 (2005).
133. Biagi, E. et al. Chimeric T-cell receptors: new challenges for targeted immunotherapy in hematologic malignancies. *Haematologica* 92, 381-8 (2007).
134. Hombach, A. et al. An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells. *Int J Cancer* 88, 115-20 (2000).
135. Bauer, T. R., Jr. et al. Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors. *Nat Med* 14, 93-7 (2008).
136. Till, B. G. et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 112, 2261-71 (2008).
137. Bushman, F. D. Retroviral integration and human gene therapy. *J Clin Invest* 117, 2083-6 (2007).
138. Ellis, J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 16, 1241-6 (2005).
139. Miller, A. D. & Rosman, G. J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 7, 980-2, 984-6, 989-90 (1989).
140. Uchida, N., Cone, R. D., Freeman, G. J., Mulligan, R. C. & Cantor, H. High efficiency gene transfer into murine T cell clones using a retroviral vector. *J Immunol* 136, 1876-9 (1986).

141. 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).
142. Amado, R. G. & Chen, I. S. Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach? *Science* 285, 674-6 (1999).
143. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-7 (1996).
144. Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. & Verma, I. M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2140-5 (2002).
145. Wolf, D. & Goff, S. P. Host restriction factors blocking retroviral replication. *Annu Rev Genet* 42, 143-63 (2008).
146. 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).
147. Dull, T. et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-71 (1998).
148. Martinez-Salas, E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 10, 458-64 (1999).
149. 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).
150. Sauce, D. et al. Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions. *J Hematother Stem Cell Res* 11, 929-40 (2002).
151. 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).
152. 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).
153. D'Costa, J., Mansfield, S. G. & Humeau, L. M. Lentiviral vectors in clinical trials: Current status. *Curr Opin Mol Ther* 11, 554-64 (2009).
154. 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).
155. Dothager, R. S. et al. Advances in bioluminescence imaging of live animal models. *Curr Opin Biotechnol* 20, 45-53 (2009).
156. Contag, C. H. et al. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol* 18, 593-603 (1995).
157. de Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R. & DeLuca, M. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7870-3 (1985).
158. Sadikot, R. T. & Blackwell, T. S. Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc* 2, 537-40, 511-2 (2005).
159. Venisnik, K. M., Olafsen, T., Gambhir, S. S. & Wu, A. M. Fusion of Gaussia luciferase to an engineered anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody for in vivo optical imaging. *Mol Imaging Biol* 9, 267-77 (2007).
160. Bhaumik, S. & Gambhir, S. S. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 377-82 (2002).
161. Loening, A. M., Wu, A. M. & Gambhir, S. S. Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods* 4, 641-3 (2007).

162. Pichler, A., Prior, J. L. & Piwnicka-Worms, D. Imaging reversal of multidrug resistance in living mice with bioluminescence: MDR1 P-glycoprotein transports coelenterazine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1702-7 (2004).
163. Luker, G. D. & Luker, K. E. Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med* 49, 1-4 (2008).
164. Sweeney, T. J. et al. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12044-9 (1999).
165. Klerk, C. P. et al. Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals. *Biotechniques* 43, 7-13, 30 (2007).
166. Luker, K. E. & Luker, G. D. Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. *Antiviral Res* 78, 179-87 (2008).
167. Weissleder, R. & Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452, 580-9 (2008).
168. Troy, T., Jekic-McMullen, D., Sambucetti, L. & Rice, B. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging* 3, 9-23 (2004).
169. Contag, C. H., Jenkins, D., Contag, P. R. & Negrin, R. S. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia* 2, 41-52 (2000).
170. Edinger, M. et al. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer* 38, 2128-36 (2002).
171. Sanz, L. et al. Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc Res* 75, 308-14 (2008).
172. Francis, K. P. et al. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct. *Infect Immun* 68, 3594-600 (2000).
173. O'Connell-Rodwell, C. E. et al. In vivo analysis of heat-shock-protein-70 induction following pulsed laser irradiation in a transgenic reporter mouse. *J Biomed Opt* 13, 030501 (2008).
174. Shah, K., Jacobs, A., Breakefield, X. O. & Weissleder, R. Molecular imaging of gene therapy for cancer. *Gene Ther* 11, 1175-87 (2004).
175. Arbab, A. S. et al. In Vivo Cellular Imaging for Translational Medical Research. *Curr Med Imaging Rev* 5, 19-38 (2009).
176. Chewning, J. H., Dugger, K. J., Chaudhuri, T. R., Zinn, K. R. & Weaver, C. T. Bioluminescence-based visualization of CD4 T cell dynamics using a T lineage-specific luciferase transgenic model. *BMC Immunol* 10, 44 (2009).
177. Hardy, J. et al. Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. *Exp Hematol* 29, 1353-60 (2001).
178. Nguyen, V. H. et al. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 109, 2649-56 (2007).
179. Zeiser, R. et al. Early CD30 signaling is critical for adoptively transferred CD4+CD25+ regulatory T cells in prevention of acute graft-versus-host disease. *Blood* 109, 2225-33 (2007).
180. Azadniv, M., Dugger, K., Bowers, W. J., Weaver, C. & Crispe, I. N. Imaging CD8+ T cell dynamics in vivo using a transgenic luciferase reporter. *Int Immunol* 19, 1165-73 (2007).
181. Rabinovich, B. A. et al. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14342-6 (2008).

182. Kiessling, A. et al. Advances in specific immunotherapy for prostate cancer. *Eur Urol* 53, 694-708 (2008).
183. Yao, V., Parwani, A., Maier, C., Heston, W. D. & Bacich, D. J. Moderate expression of prostate-specific membrane antigen, a tissue differentiation antigen and folate hydrolase, facilitates prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 68, 9070-7 (2008).
184. Ghosh, A. & Heston, W. D. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J Cell Biochem* 91, 528-39 (2004).
185. Chang, S. S. et al. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* 59, 3192-8 (1999).
186. Fracasso, G. et al. Anti-tumor effects of toxins targeted to the prostate specific membrane antigen. *Prostate* 53, 9-23 (2002).
187. Bobisse, S. et al. Reprogramming T lymphocytes for melanoma adoptive immunotherapy by T-cell receptor gene transfer with lentiviral vectors. *Cancer Res* 69, 9385-94 (2009).
188. Dobrenkov, K. et al. Monitoring the efficacy of adoptively transferred prostate cancer-targeted human T lymphocytes with PET and bioluminescence imaging. *J Nucl Med* 49, 1162-70 (2008).
189. Gade, T. P. et al. Targeted elimination of prostate cancer by genetically directed human T lymphocytes. *Cancer Res* 65, 9080-8 (2005).
190. Ma, Q. et al. Anti-prostate specific membrane antigen designer T cells for prostate cancer therapy. *Prostate* 61, 12-25 (2004).
191. Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M. & Naldini, L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25, 217-22 (2000).
192. 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).
193. 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).
194. Klebanoff, C. A., Gattinoni, L. & Restifo, N. P. CD8⁺ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* 211, 214-24 (2006).
195. Aiuti, A. et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-3 (2002).
196. 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).

PUBBLICAZIONI

1. *A microRNA targeting Dicer for metastasis control.* Martello G, **Rondina M**, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Parenti AR, Rosato A, Biciato S and Piccolo S. Cell, (in corso di revisione).
2. *Reprogramming T lymphocytes for melanoma adoptive immunotherapy by T-cell receptor gene transfer with lentiviral vectors.* Bobisse S, **Rondina M**, Merlo A, Tisato V, Mandruzzato S, Amendola M, Naldini L, Willemsen RA, Debets R, Zanovello P, Rosato A. Cancer Res. 2009 Dec 69: 9385-94.
3. *Biokinetic and dosimetric studies of 188Re-hyaluronic acid: a new radiopharmaceutical for treatment of hepatocellular carcinoma.* Meléndez-Alafort L, Nadali A, Zangoni E, Banzato A, **Rondina M**, Rosato A, Mazzi U. Nucl Med Biol. 2009 Aug;36(6):693-701.
4. *Synthesis and preliminary in vitro biological evaluation of 4-[(4-hydroxyphenyl)sulfanyl]but-3-en-2-one, a 4-mercaptophenol derivative designed as a novel bifunctional antimelanoma agent.* Ruzza P, Rosato A, Nassi A, **Rondina M**, Zorzin M, Rossi CR, Floreani M, Quintieri L. J Med Chem. 2009 Aug 13;52(15):4973-6.
5. *Biodistribution imaging of a paclitaxel-hyaluronan bioconjugate.* Banzato A, **Rondina M**, Meléndez-Alafort L, Zangoni E, Nadali A, Renier D, Moschini G, Mazzi U, Zanovello P, Rosato A. Nucl Med Biol. 2009 Jul;36(5):525-33. Epub 2009 May 8.
6. *A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis.* Adorno M, Cordenonsi M, Montagner M, Dupont S, Wong C, Hann B, Solari A, Bobisse S, **Rondina MB**, Guzzardo V, Parenti AR, Rosato A, Biciato S, Balmain A, Piccolo S. Cell. 2009 Apr 3;137(1):87-98.
7. *Novel types of carborane-carrier hyaluronan derivatives via "click chemistry".* Di Meo C, Panza L, Campo F, Capitani D, Mannina L, Banzato A, **Rondina M**, Rosato A, Crescenzi V. Macromol Biosci. 2008 Jul 7;8(7):670-81.
8. *A paclitaxel-hyaluronan bioconjugate targeting ovarian cancer affords a potent in vivo therapeutic activity.* Banzato A, Bobisse S, **Rondina M**, Renier D, Bettella F, Esposito G, Quintieri L, Meléndez-Alafort L, Mazzi U, Zanovello P, Rosato A. Clin Cancer Res. 2008 Jun 1;14(11):3598-606.
9. *Hyaluronan as carrier of carboranes for tumor targeting in boron neutron capture therapy.* Meo CD, Panza L, Capitani D, Mannina L, Banzato A, **Rondina M**, Renier D, Rosato A, Crescenzi V. Biomacromolecules. 2007 Feb;8(2):552-9.

RINGRAZIAMENTI

Grazie alla Prof.ssa Zanovello e al Prof. Amadori, per avermi dato l'opportunità di svolgere la mia attività di Dottorato in questa struttura.

Grazie Antonio, per la stima e la fiducia che mi hai dato in questi anni.

Grazie Sara, perchè mi hai sempre ascoltata, tranquillizzata, incoraggiata... perchè mi hai trasmesso la passione per questo lavoro, nonostante tutte le difficoltà.

Grazie al Lab7 e Lab11, per l'aiuto, il sostegno, l'amicizia e i sorrisi...

Grazie agli amici che mi hanno capita e sopportata...

Grazie Paolo perchè, nonostante le tue idee, mi sei stato vicino in questi tre anni di Dottorato.

Grazie mamma, e papà!, perchè avete sempre avuto fiducia e tante volte mi avete fatto ritrovare l'energia e la voglia per continuare sulla strada intrapresa.

