



Collegio Ghislieri
Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

13° Corso di formazione avanzata

Nuovi bersagli di terapia cellulare

12-16 maggio 2014, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

13° Corso di formazione avanzata

**Nuovi bersagli
di terapia cellulare**



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

13° Corso di formazione avanzata

**Nuovi bersagli
di terapia cellulare**

12-16 maggio 2014, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

© Copyright 2014  EDIMES
Edizioni Internazionali - Pavia

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione..... pag. IX

Premesse di biologia

1. Embriogenesi e origine della forma..... » 3
CarloAlberto Redi
2. Il microambiente tessutale come induttore di staminalità..... » 12
CarloAlberto Redi
3. Cellule staminali tessuto-specifiche: unità funzionali
più che anatomiche..... » 21
Manuela Monti
4. La transizione epitelio mesenchimale: passaggio cruciale
nel processo metastatico..... » 26
Sergio Marchini
5. Plasticità differenziativa delle cellule staminali emopoietiche
umane..... » 30
Sergio Ferrari
6. Molecular mechanisms of neoplastic B-cell lymphopoiesis..... » 33
*Davide Rossi, Alessio Brusca, Valeria Spina, Sara Monti,
Silvia Rasi, Carmela Ciardullo, Michaela Cerri, Stefania Cresta,
Gianluca Gaidano*
7. Dissecting the antibody response to pathogens and self antigens..... » 44
Antonio Lanzavecchia

Trapianto di midollo osseo: quesiti attuali del primo esempio di terapia rigenerativa

8. Trapianto aploidentico: T-depletato o T-repleto?..... » 49
Franco Aversa
9. La ricerca del donatore alternativo per il trapianto allogenico
di cellule staminali ematopoietiche: donatore non correlato,
sangue di cordone ombelicale o donatore aploidentico?..... » 55
*William Arcese, Alessandra Picardi, Laura Cudillo,
Gottardo De Angelis, Raffaella Cerretti*
10. GvL senza GvHD: un traguardo possibile?..... » 61
Andrea Bacigalupo

Graft versus host disease

11. Profilassi e nuove terapie della GvHD » 65
Alessandra Sperotto, Renato Fanin
12. È ancora attuale la fotochemioterapia extracorporea? » 74
Cesare Perotti, Claudia Del Fante

Terapia cellulare rigenerativa per danni d'organo: alcuni esempi

13. Le terapie con cellule staminali per la cura dell'infarto
del miocardio: dal bancone al letto del paziente » 87
*Massimiliano Gnechi, Patrizia Danieli, Manuela Mura,
Maria Chiara Ciuffreda, Federica Pisano, Giuseppe Malpasso,
Francesco Copes, Kamilia Laarej, Riccardo Bariani,
Martina Rabino*
14. Neural stem cell transplantation in central nervous system
disorders: from cell replacement to neuroprotection » 100
*Donatella De Feo, Arianna Merlini, Cecilia Laterza,
Gianvito Martino*
15. Terapia rigenerativa in ortopedia-traumatologia: indicazioni
ed impiego attuale » 102
Francesco Benazzo, Matteo Marullo

Cellule staminali mesenchimali nella terapia cellulare

16. Origine, definizione ed eterogeneità biologica delle cellule
staminali mesenchimali » 109
Manuela Monti
17. Preparazione delle CSM per impiego clinico » 114
Lorenza Lazzari
18. Trials clinici: risultati attuali e prospettive » 117
*Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano,
Irene Dambruoso, Barbara Rocca, Rita Zappatore,
Celeste Calvello, Ilaria Giardini, Antonella Orlando,
Marilena Caresana, Mirko Farina, Francesco Ripamonti*

Immunoterapia cellulare

19. Immunoterapia e recettori antigenici artificiali » 127
Ettore Biagi
20. Targeting the minimal residual disease in acute myeloid leukemia:
the role of adoptive immunotherapy with natural killer cells » 132
Antonio Curti
21. CIK cells for the treatment of leukaemia relapse » 136
Martino Introna, Alessandro Rambaldi
22. Manipolare l'immunologia per sopprimere la crescita tumorale » 138
*Giulia Golinelli, Filippo Rossignoli, Malvina Prapa,
Giulia Grisendi, Carlotta Spano, Paolo Paolucci,
Massimo Dominici*
23. Reversibilità del processo amiloide: interpretazioni attuali » 150
Giampaolo Merlini

Nuove strategie di terapia mirata

24. Farmaci inibitori di tirosinochinasi responsabili
della crescita tumorale » 161
Antonella Isacchi
25. Immunomodulatori diretti verso nuovi bersagli molecolari » 168
Antonio Sica
26. Permanente soppressione della neoangiogenesi:
una valida strategia contro la progressione tumorale » 174
Patrizia Mancuso, Francesco Bertolini

Prefazione

Quest'anno il tema generale del nostro Corso di formazione avanzata per Medici, Biologi e Biotecnologi riguarda i nuovi bersagli di terapia cellulare, intesa sia come riparazione di danni di organi e tessuti, sia come controllo e modulazione della risposta immune.

Vengono innanzitutto esaminate e discusse alcune acquisizioni di ordine biologico sull'embriogenesi e sull'origine della forma, integrate da informazioni sul microambiente come induttore di staminalità. Tali conoscenze consentono di inquadrare le cellule staminali tessuto-specifiche come unità funzionali più che anatomiche. Le premesse di biologia vengono poi completate con la trattazione dei processi di transizione epitelio-mesenchimale e mesenchimo-epiteliale comuni all'embriogenesi e all'oncogenesi, con l'aggiornamento sui meccanismi cellulari e molecolari della mielopoiesi e linfopoiesi normale e neoplastica, e con l'analisi dei meccanismi di immuno-sorveglianza e di immuno-tolleranza.

In seguito, per la riparazione di danni di organi e tessuti vengono presi in esame i quesiti attuali riguardanti il primo esempio di terapia rigenerativa cellulare, cioè il trapianto di midollo osseo: il trapianto aploidentico, la ricerca di donatore alternativo per un trapianto allogenico, l'immunopatogenesi e il controllo della GvHD, i rapporti tra GvL e GvHD. Come esempi di terapia rigenerativa di danni d'organo vengono presentate e discusse le ricerche riguardanti la riparazione di danno miocardico, di danni neurologici, di danni scheletrici. Nei dettagli viene infine trattato l'argomento dell'impiego delle cellule staminali mesenchimali in medicina rigenerativa, discutendone gli aspetti scientifici, ma ricordandone anche le finzioni commerciali.

Per le attualità di immunoterapia cellulare, vengono dapprima analizzate le prospettive di immunoterapia adottiva. In seguito vengono esaminati e discussi alcuni problemi specifici: l'impiego terapeutico di cellule T regolatorie, le possibilità di un trattamento antitumorale con linfociti T ingegnerizzati o con cellule CIK, l'uso di cellule NK per il controllo di recidive leucemiche, le varie modalità di manipolare l'immunologia per sopprimere la crescita tumorale. Per le amiloidosi sistemiche vengono avanzate le più attuali interpretazioni di biologia molecolare per ottenere la reversibilità del deposito di amiloide. Concluderà il Corso l'esame di nuove strategie di terapia mirata: farmaci inibitori di tirosin chinasi responsabili della crescita tumorale, immunomodulatori diretti verso nuovi bersagli molecolari, permanente soppressione della neoangiogenesi.

La trattazione dei vari argomenti è affidata a Relatori particolarmente esperti nei singoli settori di ricerca e con grandi capacità didattiche unanimemente apprezzate, che generosamente hanno accettato il nostro invito. A Loro esprimo i più calorosi ringraziamenti del Collegio Ghislieri e miei personali.

Carlo Bernasconi

Pavia, 12 maggio 2014

PREMESSE DI BIOLOGIA

Embriogenesi e origine della forma

CarloAlberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Lazzaro Spallanzani”,
Università degli Studi di Pavia, Centro Ricerche di Medicina Rigenerativa,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il tema che il Prof. Carlo Bernasconi mi chiede di illustrare è quest’anno di particolare difficoltà e parrebbe a prima vista più adatto ad un convegno di embriologi che di staminologi: ma così non è e come sempre il Prof. Carlo Bernasconi è in grado di proporre ai partecipanti una riflessione quanto mai profonda ed aggiornata ai temi della Biologia delle cellule staminali a noi tanto cari. Il tema della origine della forma nel corso della embriogenesi trova infatti oggi, più che in passato, un passaggio cruciale nel ruolo della acquisizione (e perdita) di staminalità e del differenziamento cellulare nel corso del tempo delle prime fasi di sviluppo embrionale. Questi sono in realtà i due temi da affrontare per spiegare oggi l’origine della forma, certo che si (nel quadro della evoluzione temporale dei meccanismi sottesi all’origine delle forme a partire dagli unicellulari per giungere ai Mammiferi) costituendo in particolare il minimo comun denominatore di fenomeni biologici quali lo sviluppo embriologico, l’omeostasi tissutale e la tumorigenesi. Sotteso ad un unico tema, a mò di ombrello, vi sono tutti gli aspetti biologici, e dunque medici, della citodifferenziazione in una prospettiva sia ontogenetica sia filogenetica. Sullo sfondo non può sfuggire infatti che l’interesse per queste tematiche non è solo e soltanto di tipo “basico” e legato all’avanzamento delle conoscenze in Biologia dello Sviluppo ma vede prepotentemente affacciarsi la applicazione tecnica legata alla capacità di riprodurre artificialmente alcuni dei passaggi sottesi all’acquisizione della forma nelle possibili “stampe” in tre dimensioni di tessuti ed organi artificiali.

Preciso subito che nella mia trattazione non vi saranno riferimenti al mondo vegetale (per mia scarsa conoscenza) che pure tanto avrebbero da insegnare, basti pensare che piante e funghi raggiungono una meravigliosa complessità morfologica senza passare per alcuna fase di gastrulazione (probabilmente grazie ad una più sofisticata architettura di relazioni di segnale tra i diversi tipi di cellule). Mi limiterò dunque al mondo animale iniziando a ricordare, a sostegno di quanto poco sopra affermato, come le conoscenze si siano rapidamente accumulate in questo campo al punto che “giornali” storici deputati alla pubblicazione dei contributi in questi settori hanno mutato, a partire dai primi anni ’80 del secolo scorso, la propria titolazione proprio per sottolineare la interdipendenza dei due temi da

affrontare: ne è un esempio chiarissimo il cambiamento dello storico “Journal of Embryology and Experimental Morphology” in “Development” e poi ancora in anni recentissimi in “Developmental Biology and Stem Cells”. Brevemente, ciò è dovuto al fatto che lo “Sviluppo” animale, come è facile osservare, è in grado di creare un ampio repertorio di forme sulla base di una “elegante” economia di utilizzo di uno smilzo vocabolario di proteine (con grande frequenza sono poi sempre le stesse!) quali quelle delle famiglie BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) e FGFs (Fibroblast Growth Factor) in modi simili ma in contesti differenti, economia di utilizzo capace comunque di generare forme, disegni, modelli, schemi e “tipi” così diversi e così affascinanti. Capacità che resta comunque ancora tutta (o pressochè tutta) da scoprire e che riusciamo solo a ben descrivere nel suo accadere biologico ma che ancora non governiamo appieno (sperabilmente con la futura capacità di manipolarla e piegarla a fini terapeutici) non conoscendone ancora in dettaglio la determinazione molecolare. Nonostante infatti il molto lavoro sperimentale, e teorico, che si sta svolgendo i meccanismi di dispersione e comunicazione delle proteine morfogenetiche (il punto nodale del problema biologico “origine della forma”), i “morfogeni” dei lavori classici, restano ancora da ben conoscere. E però una nuova visione sta aiutando in questa direzione, nuova visione che richiamando un vecchio concetto di relazione tra la forma e la funzione (simmorfosi) vedi in strutture quali i citonemi (sorta di filopodi specializzati) le vie di trasporto delle proteine morfogenetiche con capacità di segnale (signaling proteins) tra cellule-segnalanti (signaling cells). È questa una nuova visione concettuale (Kornberg e Roy, 2014) che suggerisce essere i segnali citonemammediati il meccanismo di dispersione capace di recapitare le proteine segnalanti (di assicurarne il trasporto fisico) direttamente nei siti di contatto cellula-cellula istruendo (inducendo) così cellule competenti alla risposta morfogenetica (attraverso meccanismi biofisici di stiramento, allungamento, costrizione, etc., mediati da proteine contrattili universalmente presenti quali le actine e le miosina). Ma prima di entrare in dettaglio nella trattazione del tema credo possa risultare interessante ricordare un aspetto assai simpatico: secondo Platone l’Universo era di necessità sferico (questa è infatti nel mondo platonico la più “perfetta” delle forme possibili) e quando il Creatore giunse alla creazione dell’Uomo lo fece proprio sferico ! con una difficoltà evidente per noi poveri umani a forma di sfera: una sfera rotola e niente più, e dunque l’Uomo sferico è una creatura sub-ottimale ... e così per ovviare a questo problema causa di gravi insufficienze il Creatore decise in un secondo momento di aggiungere alla sfera umana due braccia e due gambe così che l’Uomo primitivo non fosse legato solo al movimento passivo dovuto alla gravità ma potesse: “scalare le montagne più alte e scendere negli abissi più profondi”! Al di là di quanto importante sia in termini filosofici la visione platonica, resta un fatto incontestabile della realtà platonica che tutti noi si abbia inizio come sfere: questa è infatti la forma della cellula (staminale) totipotente che origina dall’uovo fecondato: lo zigote, di tutti gli animali! Le prime divisioni cellulari tagliano lo zigote formando tante cellule senza alterare però la forma generale, che resta sferica. Una delle prime acquisizioni concettuali della Biologia sperimentale della fine del XIX secolo è stata proprio quella di realizzare come la segmenta-

zione producesse tante cellule ma la biomassa finale dello zigote in sviluppo resta pressochè la medesima di quella dell'uovo appena fecondato. Si realizza così la distribuzione di nuclei (genomi) identici in territori citoplasmatici che vanno sempre più differenziandosi per via delle suddivisioni in tante e diverse parti dello stesso citoplasma oocitario iniziale. Ciò significa che con la segmentazione si vanno distribuendo in territori citoplasmatici diversi tutti gli organelli citoplasmatici (si pensi ai soli mitocondri) e tutte le molecole, lipidi, carboidrati, sostanze di riserva energetica, minerali, etc etc, proteine e acidi ribonucleici che l'organismo materno produce nel corso della oogenesi. Nel corso di queste prime fasi non si altera la forma generale che resta comunque pressochè sferica; questa forma "a palla" va persa solo quando i primi movimenti cellulari autonomi ne produrranno la deformazione: come tutti ben sappiamo questa fase è chiamata gastrulazione. Mentre la gastrulazione è universalmente riconosciuta come una tappa comune dello sviluppo animale che si presenta in una ampia diversità di modi di accadere non è facile stabilirne una semplice e comune definizione (proprio per questa elevata variabilità di processo) e forse solo una battuta spiritosa può permettere di nascondere la nostra ignoranza al riguardo rimandando però all'essenza del fenomeno (l'uso della metafora in scienza): la gastrulazione è quello che accade quando si smette di essere una palla! Ma anche altre definizioni (aforismi) sono ormai entrate di diritto nei libri di testo, la più famosa certamente quella di Lewis Wolpert (1992): *"Non è la nascita, il matrimonio o la morte, ma è la gastrulazione il momento più importante della nostra vita"*.

La gastrulazione è un fenomeno così familiare a tutti noi che ci si dimentica quasi di interrogarsi sulla necessità del movimento cellulare nell'acquisizione delle forme, sul perchè il "farsi" di un animale preveda quella sorta di complicatissimo origami di continui ripiegamenti, elaborate e complesse migrazioni di cellule dapprima indifferenziate e staminali e poi via via con una restrizione di staminalità (che resta comunque reversibile, come le staminali cancerose sono lì a dimostrare) e di citodifferenziazione con l'acquisizione del fenotipo cellulare tipico dei tessuti di appartenenza e però conservatore di un imprinting genetico tipico del foglietto embrionale di origine (ecto- meso- endoderma): in fondo, potremmo anche chiederci perchè mai il "farsi", "l'acquisire una forma", di un animale non preveda sic et simpliciter la produzione di cellule differenziate direttamente nel luogo ove poi le incontriamo al termine delle fasi embriologiche che producono quella determinata forma. Questa idea non è naïve, in fondo in tutti i maggiori gruppi di viventi pluricellulari (alghie brune, funghi, piante) la forma degli individui adulti, e le complesse organizzazioni cellulari ad esse sottese, sono raggiunte direttamente grazie all'impiego di divisioni cellulari "orientate" nello spazio. E dunque è corretta la domanda sul perchè gli embrioni animali (dalle meduse agli scarafaggi, dalle drosofile alle zebre al topo ed all'uomo) non raggiungano la loro forma finale con il solo impiego delle divisioni cellulari spazialmente orientate, crescita differenziale e fenomeni di morte cellulare programmata senza il coinvolgimento di impressionanti migrazioni cellulari e fantasiosi ripiegamenti di tessuti. Come sempre nel procedere della Scienza la prima risposta a questo arcano viene dalla storia della Scienza (prima le descrizioni, poi l'esperienza "sperimentale" e

poi la piena comprensione del fenomeno in studio, come la filosofia della Scienza insegna) e così si deve ad Ernst Haeckel l'aver riconosciuto il fenomeno della gastrulazione nel mondo animale e l'aver coniato il termine stesso con l'intento di darne una spiegazione. La ipotesi di Haeckel è basata sulla sua ben nota idea che lo sviluppo embriologico "ricapitoli" le fasi evolutive (oggi si sa che questo concetto non è corretto nella sua formulazione teleologica): gli animali delle ere geologiche passate possedevano effettivamente una forma sferica anche da adulti ed avevano la capacità di formare una cavità, transiente, ripiegandosi all'interno quando venivano in contatto con un substrato o incontravano un frammento di cibo. E così veniva temporaneamente a formarsi uno stomaco ove potevano catturare anche una preda e ove si concentravano enzimi digestivi; una simile struttura è poi andata stabilizzandosi nel corso dell'evoluzione animale come cavità digestiva permanente: Haeckel concludeva da questa riflessione che ancora oggi le nostre cellule si ripiegano all'interno nel corso delle prime fasi di sviluppo embriologico proprio ricapitolando questa risposta ancestrale a stimoli meccanici. E per analogia con lo stadio embriologico così identificato, propose di chiamare *Gastraea* l'ipotetico progenitore come suggerito nella famosa illustrazione (l'ipotesi *Gastraea*: l'ipotetico progenitore sferico si appiattiva ed invagina per inglobare piccoli frammenti di cibo. La cavità transiente così formata divenne poi una struttura permanente con l'acquisizione di diverse identità cellulari (ecto- ed endoderma) da parte delle cellule poste al di fuori ed all'interno del corpo. Un movimento simile, con cellule poste all'esterno che si muovono portandosi all'interno e producendo un cambiamento di forma, si verifica oggi nella gastrulazione di tutti gli embrioni animali).

L'arcano della gastrulazione ancora oggi trova nell'ipotesi della *Gastraea* di Haeckel un buon tentativo di spiegazione anche se pur accettando l'ipotesi che la gastrulazione si sia così originata ci si possa giustamente chiedere quali siano le forze evolutive ed i meccanismi citologici che hanno mantenuto sino ad oggi questo fenomeno: due domande che intersecano la medesima risposta poichè è quasi impossibile immaginare le forze evolutive in grado di assegnare un vantaggio selettivo a questo processo mentre, sebbene difficilissimo, si può tentare di immaginare l'esistenza di funzioni (ad oggi sconosciute e nascoste dietro quei movimenti cellulari) capaci di assegnare quel vantaggio selettivo proprio alle cellule che vanno muovendosi ed acquisendo una specifica identità cellulare a partire da una funzione di staminalità. E dunque è nella ricerca per chiarire la determinazione della identità cellulare a partire dai segnali meccanici (primordiali!) legati ai movimenti cellulari della gastrulazione che si può pensare di far luce sul concomitante fenomeno del cambiamento delle forme (origine delle forme) nel corso della embriogenesi. Il fatto descritto del cambiamento di forma è dunque la causa della restrizione di staminalità e quest'ultima ha come conseguenza il cambiamento di forma in una relazione circolare di causa ed effetto; da questa visione il cambiamento di forma emerge come conseguenza (e causa) della citodifferenziazione come stato acquisito e comunque transitorio e reversibile (non esistono tessuti perenni) come i passaggi e le transizioni Epitelio-Mesenchimale (e viceversa), la riacquisizione della staminalità (neoplastica), le trans-determina-

zioni e trans-differenziazioni cellulari a partire da staminali multipotenti sono lì a dimostrare. L'obiettivo di ricerche in questo ambito è dunque quello di dimostrare che i movimenti morfogenetici nel corso dello sviluppo embrionale svolgono altre funzioni oltre a quella di stabilire la forma dell'individuo: i movimenti sono in realtà segnali morfogenetici deputati all'acquisizione della identità cellulare a partire da cellule staminali pluri- multipotenti. In altre parole, i movimenti sono in realtà segnali morfogenetici deputati alla restrizione di staminalità. Alla base di questi ragionamenti vi è il mondo della trasduzione dei segnali (proteine di membrana, proteine strutturali citoplasmatiche, proteine e molecole di ogni tipo capaci di passare nel nucleo, proteine e molecole regolatrici della espressione genica, etc.): le cellule percepiscono biofisicamente e biochimicamente i movimenti delle cellule vicine, movimenti anche capaci di provocare deformazioni cellulari, e rispondono con l'accensione o lo spegnimento di particolari repertori di geni dello sviluppo. In effetti le tensioni, distorsioni, tiramenti, allungamenti, etc etc meccanici che accompagnano i movimenti morfogenetici nel corso dello sviluppo embrionale non sono solo il prodotto della attività del genoma ma a loro volta costituiscono il segnale che con una azione di feed back agisce sulla espressione genica. Alcuni esempi a sostegno di questa visione sulla funzione mecano-trasduttrice dei movimenti nel corso dello sviluppo embrionale ben la illustrano, sebbene siano veramente pochi; tra questi si pensi alla induzione meccanica del fattore di trascrizione Twist nella porzione anteriore dell'apparato intestinale della larva di *Drosophila* oppure la induzione meccanica della giunzione a livello della articolazione di due ossa nel corso dello sviluppo embrionale del topo. Pur essendo scarsi gli esempi a sostegno di questa visione mecano-trasduttrice recentissimi lavori li hanno fortemente sostenuti. In particolare il gruppo di Emmanuel Farge dell'Institut Curie di Parigi con un dettagliato lavoro pubblicato su *Nature Communication* (Brunet et al., 2013) ed una altrettanto dettagliata recensione da parte di Thibaut Brunet (<http://thenode.biologists.com/mechanics-in-the-embryo-and-the-evolution-of-gastrulation/research/>) ha studiato le circuiterie geniche (genes pathways) responsabili dello sviluppo embrionale precoce dimostrando che queste ultime rispondono ai movimenti della gastrulazione; in altri termini ha dimostrato che i segnali meccanici sono necessari ad indurre la corretta identità cellulare (a livello molecolare) nella corretta posizione spaziale quando l'individuo cessa di avere una forma sferica ed inizia ad acquisire la sua nuova forma. L'eleganza strategica del piano di ricerca è da sottolineare: se le risposte sperimentali fossero un chiaro sì e si dimostrassero di generale rilevanza in diversi embrioni animali (con le stesse circuiterie di trasduzione del segnale attivate in risposta alle deformazioni e capaci di attivare a loro volta cassette geniche poste a valle nella regolazione genica dello sviluppo della gastrula di specie animali filogeneticamente lontane) ebbene questo dato contribuirebbe in modo chiaro a spiegare perché i movimenti della gastrulazione si sono evolutivamente conservati: gli stimoli meccanici che i movimenti assicurano si dimostrano essere un pre-requisito necessario alla specificazione della identità cellulare. È possibile anticipare che questo si è rivelato essere il caso: la comparazione tra zebrafish e *Drosophila* (che come è ben noto appartengono a due rami evolutivi diversi

degli organismi bilateri, Deuterostomi e Protostomi) ha infatti messo in luce che il blocco dei movimenti della gastrulazione e la seguente applicazione di stimoli meccanici esogeni per mimare artificialmente i movimenti bloccati, determina in entrambe le specie dapprima il blocco della espressione di specifici geni dello sviluppo mentre successivamente ne riattiva la espressione. Ancora più sostanziale la evidenza che l'identità delle cellule che rispondono al blocco ed al successivo stimolo meccanico è la stessa nelle due specie: sono le cellule del mesoderma presuntivo. Inoltre è chiaro che gli stimoli meccanici attivano fattori di trascrizione per la precoce specificazione del mesoderma (*notail* in zebrafish, un ortologo di *brachyury*, e *twist* in *Drosophila*) e che la via di mecano-trasduzione del segnale è la stessa nelle due specie. Si tratta della fosforilazione della β -catenina in siti conservati (la tirosina 654 in zebrafish e 667 in *Drosophila*), fosforilazione che a sua volta è capace di promuovere la traslocazione della β -catenina stessa all'interno del nucleo dove agisce come un fattore di trascrizione che a sua volta ancora accende i geni di specificazione del mesoderma. Più in dettaglio gli studi sulla induzione meccanica della identità del mesoderma in *Drosophila* hanno fatto uso dei mutanti *snail*^{-/-} (questi mutanti mancano dell'invaginazione del solco ventrale che da luogo al mesoderma del tronco), da tempo noti per la loro caratteristica di riuscire comunque a dar luogo alla invaginazione del solco ventrale se sottoposti a deboli e "gentili" piccoli colpi meccanici. Ebbene nei mutanti *snail* che non riescono a dar luogo all'invaginazione, l'espressione di *twist* si spegne precocemente nel mesoderma mentre la induzione della invaginazione per piccoli colpi meccanici riporta ad alti livelli l'espressione di *twist* nelle cellule del solco ventrale. Nel loro insieme questi dati sostengono l'idea che gli stimoli meccanici legati all'invaginazione del solco ventrale siano in grado di mantenere ad alti livelli l'espressione di Twist nel mesoderma di *Drosophila*.

Anche in zebrafish i dati confermano quanto si può desumere dallo studio di *Drosophila*. Qui il primo movimento morfogenetico è l'epibolia di un sottile strato di cellule che si viene a trovare, in seguito alla segmentazione, sulla superficie di una massa citoplasmatica nutritiva; queste cellule iniziano a distendersi diffondendo ai due estremi della loro localizzazione così da inglobare la massa nutritiva (tuorlo). All'inizio di questo movimento di diffusione le cellule del mesoderma presuntivo (che formano un anello marginale attorno al fondo della massa di cellule) vanno incontro ad una specifica deformazione: si stirano e dilatano. Subito dopo questa deformazione è possibile mettere in evidenza che in queste cellule la β -catenina transloca dal citoplasma al nucleo ove attiva e regola la trascrizione e la espressione di *notail*, in modo tale che queste cellule acquistano il primo marcatore molecolare della identità mesodermale. Questa evidenza è stata acquisita grazie al blocco dei movimenti della gastrulazione impiegando molecole capaci di inibire specificatamente la miosina non muscolare di tipo II (blebbistatina) o la formazione dei microtubuli (nocodazolo). Si è così dimostrato che la deformazione delle cellule è un necessario requisito per il passaggio della β -catenina all'interno del nucleo, passaggio capace di iniziare così l'espressione di *notail*. La elegante controprova è stata quella di riaccendere la espressione di *notail* tramite il passaggio dal citoplasma al nucleo della β -catenina grazie alla rimozione (lavaggio) della

blebbistatina o ad una pressione meccanica sull'embrione capace di deformare le cellule o ancora, grazie ad interventi quanto mai fantasiosi, allo stiramento delle cellule ad opera di una calamita dopo aver iniettato le cellule con particelle magnetiche. Sotto il profilo anatomo-comparato i risultati di questi esperimenti su *Drosophila* e zebrafish suggeriscono che l'identità del mesoderma sia sotto il controllo di segnali meccanici almeno già a partire dal comune progenitore bilaterio dei due phyla a cui appartengono *Drosophila* e zebrafish, il che significa da ben più di 570 milioni di anni. Inoltre, si può anche ritenere che questa affermazione valga per la stragrande maggioranza, se non per tutti, gli animali bilateri: a sostegno di questa speculazione vi è il fatto che nello sviluppo di tutti i bilateri è ricorrente l'espressione di *brachyury* lungo i bordi del blastoporo, osservazione questa che può essere spiegata solo accettando che l'espressione di *brachyury* sia sotto il controllo di stimoli meccanici conservati a livello evolutivo (la gastrulazione).

E dunque alla luce di questi nuovi dati che legano due tematiche biologiche apparentemente lontane (acquisizione della forma e staminalità) tutte le teorie geometriche applicate all'acquisizione della forma, dal classico D'Arcy Thomson (1992) alla teoria delle catastrofi ed ai frattali, debbono essere rivisitate: la geometria delle forme embrionali nel corso dello sviluppo non è solo il prodotto dell'espressione di specifici geni dello sviluppo ma è parte integrale delle circuiterie regolatorie che controllano lo sviluppo. In altri termini è oggi chiaro che i due fenomeni si regolano a vicenda, limitandosi e controllandosi in una relazione circolare di causa ed effetto, in una catena ininterrotta che dal nostro progenitore del Precambriano che smise di essere a forma di palla (per buona pace di Platone!) aprì la porta all'acquisizione delle meravigliose forme che oggi apprezziamo sul pianeta. I cambiamenti di forma e la proliferazione delle cellule sono i due processi alla base della morfogenesi nel corso dello sviluppo animale e sempre nuovi dati a sostegno di queste riflessioni (pur basate su recentissimi studi) emergono di giorno in giorno anche studiando i cordati più "semplici" quali *Ciona intestinalis*. In quest'ultima specie lo studio di come la notocorda vada crescendo nel mentre la larva cambia di forma, ha permesso di chiarire che il solo allungamento delle cellule costituisce il processo fondamentale di crescita e non la divisione cellulare, e come l'allungamento cellulare sia basato fundamentalmente su meccanismi operati dal metabolismo della actomiosina: contrazione di un anello di actomiosina lungo l'asse equatoriale delle cellule. Il sistema di actomiosina che va formandosi all'equatore di ciascuna cellula della notocorda include infatti la catena leggera della miosina fosforilata, α -actinina, cofilina, tropomiosina e talina. Ivonne Sehring e collaboratori (Sehring et al., 2014) hanno dimostrato che l'allungamento delle cellule non è solo dovuto alla costrizione dell'anello equatoriale di actomiosina ma è in realtà il risultato cooperativo tra la costrizione dovuta all'anello di actomiosina e la generazione di forze meccaniche (dovute a flussi citoplasmatici di altre proteine contrattili usualmente impiegate per la citodieresi e citochinesi) alla base delle membrane.

Oltre ai recenti avanzamenti relativi agli stimoli biofisici ed alla meccano-trasduzione dei segnali morfogenetici, ora brevemente illustrati (Piccolo, 2013), saranno esaminati i dati relativi al contributo informativo dato dalla geometria dei

blastomeri (la classica “posizione informazionale”, si veda il classico Tarkowski e Wroblewska, 1967) e quello dei geni regolatori della morfogenesi in una visione didattica tradizionale (Ohnishi et al., 2014). Tra gli altri il ruolo giocato dai geni della famiglia Pax poichè questi sono geni che codificano fattori di trascrizione capaci di orchestrare complessi processi di acquisizione di identità cellulare nel corso dello sviluppo nei momenti di origine delle forme embrionali (Blake e Ziman, 2014). Il loro ruolo specifico è quello di attribuire una identità cellulare e mantenere questa identità ad un livello di progenitore staminale basandosi su complessi meccanismi di elaborazione dei trascritti di RNA (alternate RNA splicing). I fattori di trascrizione codificati dai geni Pax contengono tutti un sito di legame per il DNA altamente conservato, chiamato appunto “paired domain” (PD). Nove geni Pax sono stati identificati (*Pax1-Pax9*) e caratterizzati in dettaglio a livello molecolare a livello filogenetico, dagli insetti ai mammiferi, evidenziando l’alto grado di conservazione dei domini paired ed il loro ruolo nella sequenziale compartimentalizzazione del corpo nei primi stadi di sviluppo embrionale in parallelo con l’acquisizione della identità cellulare, il mantenimento del fenotipo cellulare acquisito nel corso della seguente morfogenesi dei tessuti.

Il ruolo giocato dalla famiglia di geni Hox verrà analizzato al fine di dimostrare come i cambiamenti di forma anche a livello evolutivo siano legati alle circuiterie (le medesime) che determinano la forma nel corso dello sviluppo embrionale: in altre parole il repertorio di geni impiegato è sempre quello, ciò che varia è la regolazione di quel repertorio operata dal DNA non codificante proteine. Questo dato è ormai classicamente illustrato nei libri di testo ma è sempre bene ribadirlo. Una delle più ovvie osservazioni nell’esame della forma del corpo di animali “complessi” come possono essere i vertebrati e gli artropodi (dai centopiedi ai ragni, dai crostacei agli insetti) è il fatto che il loro corpo è costituito dalla ripetizione di unità fondamentali (vertebre nei vertebrati e segmenti negli artropodi). Le grandi variazioni nei disegni animali (baupläne) che osserviamo oggi sono dovute ai cambiamenti nel numero di queste unità di ripetizione: le varie classi di vertebrati differiscono fondamentalmente per il diverso numero e tipo di vertebre (cervicali, toraciche, lombari, sacrali) e le classi di artropodi per il numero di segmenti. Tutte queste variazioni dipendono dalla stessa serie di geni Hox! Questi ultimi determinano il numero e la comparsa delle unità di ripetizione, la loro identità in particolari zone lungo l’asse principale del corpo determinando inoltre le varie tipologie di strutture che si formano nelle varie zone del corpo. Cambiamenti e spostamenti nel luogo fisico ove i vari geni Hox vengono espressi sono alla base delle grandi differenze di forma che possiamo apprezzare tra rane, serpenti, uccelli e mammiferi così come tra insetti, ragni e crostacei. Spostamenti spazio-temporali nell’espressione di alcuni di questi geni Hox rendono ragione ad esempio della formazione di un lungo corpo nei serpenti con centinaia di vertebre portanti costole e quasi del tutto assenza di un collo, disegno quest’ultimo in grande contrasto con quello di altri vertebrati. Sempre cambiamenti spazio-temporali spiegano la presenza di sole sei zampe negli insetti mentre altri artropodi ne hanno otto o più. Anche queste ultime analogie verranno esaminate in confronti uomo-mosca e uomo-topo.

Bibliografia essenziale

1. Blake J, Ziman M. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell Maintenance. *Development*. 2014, 141: 737-751.
2. D'Arcy T. *Crescita e forma*. Bollati Boringhieri, Torino, 1992.
3. Brunet T et al. Evolutionary conservation of early mesoderm specification by mechanotransduction in Bilateria. *Nature Communication*. 2013; 4: 1-15.
4. Brunet T. <http://thenode.biologists.com/mechanics-in-the-embryo-and-the-evolution-of-gastrulation/research/>. 2014.
5. Kornberg T, Roy S. Cytonemes as specialized signaling filopodia. *Development*. 2014; 141: 729-736.
6. Ohnishi Y et al. Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nature Cell Biology*. 2014; 16: 27-37.
7. Piccolo S. Developmental biology: Mechanics in the embryo. *Nature*. 2014; 504: 223-225.
8. Sehring I et al. An equatorial contractile mechanism drives cell elongation but not cell division. *PLOS Biology*. 2014; 12: 1-16.
9. Tarkowski A. e Wroblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryology and Experimental Morphology*. 1967; 18: 155-180.
10. Wolpert L. Gastrulation and the evolution of development. *Development Camb. Engl.* 1992; (Suppl.) 7-13.

Il microambiente tessutale come induttore di staminalità

CarloAlberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Lazzaro Spallanzani”,
Università degli Studi di Pavia, Centro Ricerche di Medicina Rigenerativa,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il Nobel 2012 per la fisiologia o la medicina è stato assegnato a Sir John Gurdon ed a Shinia Yamanaka con la seguente motivazione: “...*for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent*, the Nobel Prize recognizes two scientists who discovered that mature, specialised cells can be reprogrammed to become immature cells capable of developing into all tissues of the body. Their findings have revolutionised our understanding of how cells and organisms develop”. Questa motivazione ben esprime, sotto il profilo della epistemologia genetica il termine “riprogrammare”, il concetto sotteso alla nostra attuale conoscenza di che cosa sia in realtà “staminalità”: una funzione!

Una funzione assegnata alla cellula dall’ambiente in cui viene a trovarsi, la nicchia. E dunque essendo una funzione assegnata dal contesto spazio-temporale dell’ambiente tessutale, della nicchia, è riprogrammabile in vivo ed in vitro in dipendenza del contesto umorale-citologico che viene a comporre quel preciso microambiente fisiologico (in vivo l’esempio più drammatico è quello che accade nel corso della tumorigenesi); ed è la attuale capacità di riprodurre artificialmente eventi biologici che accadono in natura quella che ha portato nel corso degli anni i due grandi scienziati a raggiungere i risultati che vengono riconosciuti e premiati dal comitato del Karolinska che assegna il premio Nobel. Capire la riprogrammazione genetica di una cellula differenziata vuol dunque dire, operativamente, spostare il livello delle domande che il ricercatore si pone: da quello della microdissezione molecolare sulla biologia della cellula differenziata vs quello della cellula staminale a quello dei meccanismi, e delle cause che li promuovono, sottesi ad un cambiamento umorale/citologico di un determinato microambiente tessutale che opera da causa di quel processo de-differenziativo con l’acquisizione della funzione di staminalità.

Questa nuova visione emerge dalla eterogenea massa di dati che sono stati accumulati negli ultimi vent’anni (Yeo e Ng, 2013) ed è capace di spiegare lo spostamento dell’equilibrio tra stato indifferenziato - stato differenziato in un senso e nell’altro (de-differenziazione, che svolge un ruolo cruciale nella tumorigenesi,

Reya e Clevers, 2005). Se questa è la visione attuale (con lo stato di validità “temporanea” che la storia della biologia assegna a tutte le “presenti verità”) è bene ripercorrere i passi salienti che hanno permesso di giungere a una comprensione piena di questo nuovo paradigma.

È oggi ben chiaro che non è uno solo il fattore in grado di assegnare la funzione di staminalità ad una cellula ma, come detto sopra, è un insieme di fattori presenti nell’ambiente in cui si viene a trovare la cellula a determinarne lo stato funzionale. Tra quelli prossimali (fisica e chimica del microambiente unitamente alla sua composizione biologica in termini di strutture biologiche, i.e., cellule, parenchima, substrati, etc.) e distali (principalmente la chimica dei segnali che giungono alla nicchia), un ruolo particolare è svolto anche da stimoli di tipo meccanico, stimoli da relazione strutturale con altre componenti biologiche (in primis altre cellule) presenti nella nicchia e capaci di determinare la persistenza nel tempo della cellula staminale nella nicchia stessa.

Così una particolare classe di proteine capace di determinare l’ancoraggio delle cellule alla nicchia viene a giocare uno di quei ruoli cruciali sopra ricordati nel determinare la funzione di staminalità. Sono queste le proteine Id (Niola et al., 2012) capaci di coordinare le attività delle cellule staminali neuronali nella nicchia ventricolare embrionale: la inattivazione di ben tre dei geni della famiglia delle proteine Id determina la perdita dell’ancoraggio da parte delle staminali embrionali e la loro differenziazione. Le proteine Id reprimono la attivazione di Rap1GAP mantenendo così la attività GTPasica di RAP1 che è un mediatore fondamentale della adesione cellulare. Mantenendo così l’ancoraggio delle cellule staminali neuronali al microambiente extracellulare della nicchia le proteine Id sincronizzano le funzioni delle staminali neuronali alla loro residenza o uscita (differenziazione) dalla nicchia (Niola et al., 2012).

Di interesse per la comprensione della funzione staminalità è poi l’esame di un quadro comparativo a livello animale delle vie di regolazione dell’espressione genica che presiede alla staminalità (Davidson, 2010), ed anche la possibilità di seguire la migrazione delle cellule staminali al di fuori della nicchia (Snippert e Clevers, 2011) oltre, dopo il Nobel 2012 alla “riprogrammazione genetica”, alle diverse strategie di induzione della pluripotenza (Stadtfield e Hochedlinger, 2010). Di grande rilievo per il futuro del lavoro di ricerca sarà poi la possibilità di ricreare artificialmente delle nicchie capaci di sfruttare al massimo le possibilità funzionali (crescita - rinnovo - differenziazione) delle cellule staminali con la costruzione di microambienti ingegnerizzati (Marx, 2013) con proprietà biochimiche e biofisiche tali da assicurare l’interazione meccanica e chimica più adatta a conferire alle cellule la funzione di “staminalità”.

Per meglio comprendere la capacità tecnica dell’uomo di ricreare artificialmente alcuni contesti e fasi dello sviluppo naturale può essere utile descrivere una nicchia istologica in dettaglio: certamente la nicchia delle cellule staminali (CS) del sangue è quella che meglio si presta poiché storicamente ben conosciuta. Da lungo tempo i biologi descrivono e dettagliano molecularmente il processo della ematopoiesi mentre i medici applicano da tempo queste conoscenze per formidabili terapie capaci di guarire patologie come quelle di alcuni tipi di tumore delle

cellule del sangue. E così, lo studio in dettaglio della nicchia del midollo osseo, della nicchia delle CS ematopoietiche può essere di aiuto paradigmatico alla comprensione delle relazioni architetturali e funzionali che si stabiliscono tra i diversi tipi cellulari in quello speciale microambiente tessutale che chiamiamo nicchia (Mikkola e Orkin, 2006; Ugarte e Forsberg, 2013; Morrison e Scadden, 2014). È bene sottolineare ancora una volta che per tutta una serie di ragioni didattiche, storiche e di complessità biologica l'esempio più adatto da descriversi è quello della nicchia ematopoietica.

Sotto il profilo biologico è stata questa la prima nicchia ad essere sviscerata concettualmente e meglio descritta e dunque ben si presta sotto il profilo didattico ad un esame dettagliato mentre il processo di ematopoiesi è un fantastico modello per capire la biologia delle CS e della loro nicchia.

Corre l'obbligo di ricordare inoltre che come sempre nella Scienza la "*verità*" è valida solo e soltanto per quel momento temporale preciso della conoscenza e che "*domani*" nuovi dati sperimentali saranno in grado di modificare anche profondamente quella precisa visione. E così non fa eccezione neppure la ematopoiesi e la nicchia delle CS ematopoietiche che, nonostante sia conosciuta in grande dettaglio, presenta ancora misteri da svelare. Ci si può così rendere conto di quanto lavoro di ricerca vi sia ancora da svolgere per ottenere una visione soddisfacente di tutte le nicchie staminali che si vanno scoprendo.

Innanzitutto va precisato che una nicchia di CS non ha una sola localizzazione anatomica, nel senso che sebbene la sua costituzione sia unica e di un certo tipo, la sua sede può variare nel tempo dello sviluppo biologico (embrionale, fetale, adulto e senescente) ed essere comunque presente, simultaneamente o nel corso del tempo di sviluppo dell'individuo, in più luoghi anatomici: quella del sangue, ad esempio, si presenta in diversi tessuti nel corso dello sviluppo biologico di un nuovo individuo, inizialmente nell'embrione nella regione aorta-gonade-mesonefro e sacco vitellino; a seguire nella placenta, nel fegato degli stadi fetali e poi nel midollo osseo.

Alla nascita (i.e., nelle fasi post-natali) il midollo osseo diviene la localizzazione primaria della nicchia delle CS ematopoietiche, anche se in risposta a particolari condizioni di stress ematopoietico la nicchia può spostarsi e costituirsi in luoghi al di fuori del midollo. In effetti sta divenendo sempre più frequente parlare di "spazio" della nicchia proprio per sottolineare questa singolare caratteristica biologica di poli-localizzazione spazio-temporale. È bene sottolineare che la dettagliata conoscenza delle nicchie, in questo caso di quella delle CS del sangue, non è solo una questione di dottrina scolastica fine a se stessa ma ha una duplice valenza poiché definirne esattamente i componenti e come questi "lavorino" in concerto a regolare quel preciso processo (in questo caso la ematopoiesi, la formazione di tutti i tipi di cellule del sangue ed il contemporaneo mantenere una riserva di CS indifferenziate) fornisce da un lato la opportunità di sapere come migliorarne la rigenerazione in seguito ad un danneggiamento, lesione, ferita, trapianto di CS (del sangue) e d'altro canto permette di meglio capire come il malfunzionamento della nicchia sia in grado di determinare una patologia. La nicchia delle CS del sangue è primariamente identificabile nella cavità di diverse ossa, in particolare

di quelle lunghe, nella zona trabecolare ove giungono le diramazioni più fini del sistema vascolare, in prossimità di arteriole e sinusoidi ed è lì che è possibile identificare le CS del sangue, le Hematopoietic Stem Cell (HSC), in quello “spazio” che si può ben definire la vera e propria nicchia delle HSC ove sono presenti diversi tipi cellulari che concorrono a mantenere la staminalità delle HSC: cellule dell’endotelio delle arteriole e dei sinusoidi, le cellule mesenchimali stromali, le cellule di Schwann non-mielinizzanti, macrofagi, osteoclasti, le terminazioni dei nervi del sistema simpatico e molto probabilmente anche altri tipi cellulari di cui non si è ancora scoperto il ruolo ricordando comunque il ruolo svolto, ad esempio, dalla concentrazione dello ione Ca^{++} e quello della matrice extracellulare. Questa nicchia delle HSC viene detta “perivascolare”.

Ad innalzare il livello di complessità morfologica e funzionale della nicchia delle HSC vi è poi da precisare che all’interno del midollo osseo sono presenti anche altre cellule ematopoietiche con un più ridotto grado di staminalità rispetto alle HSC, le cellule progenitrici (che comunque sono sempre da considerarsi CS del sangue). Ad esempio, le cellule progenitrici della linea linfoide (vedi sopra), occupano una zona particolare dello spazio della nicchia e hanno una relazione funzionale altamente specifica con altri tipi cellulari. Grazie a questa caratteristica si pensa possa esistere una sottosezione della nicchia che, possedendo a sua volta tutte le corrette caratteristiche morfo-funzionali, può essere essa stessa definita a pieno titolo “nicchia”.

Possiamo quindi affermare che la nicchia delle CS del sangue è composta in realtà da ben due nicchie! Le cellule progenitrici della linea linfoide sono infatti mantenute (come staminali) ed indirizzate verso la differenziazione da tutta una serie di molecole prodotte dagli osteoblasti posti in loro contatto: i progenitori della linea linfoide risiedono dunque in una “nicchia endosteale” che è distinta sia spazialmente sia per “cellularità” da quella delle HSC vere e proprie. In altre parole, stante la complessità dei tipi cellulari coinvolti nella regolazione della staminalità delle CS del sangue si può affermare che non esiste una singola nicchia delle CS del sangue; piuttosto è meglio dire che la nicchia integra le funzioni di più “partecipanti” (tipi cellulari). Ad esempio, sebbene le cellule della linea ossea non regolino direttamente la staminalità delle CS del sangue, sono però coinvolte nella regolazione delle cellule progenitrici della linea linfoide-B, come dimostra la ricca produzione di linfociti B dalle colture cellulari arricchite di osteoblasti.

Di conseguenza si può ben affermare che alcuni progenitori precoci della linea linfoide dipendano da una nicchia osteoblastica che è ben diversa sotto il profilo della cellularità e funzionalità dalla nicchia perivascolare che mantiene la staminalità delle HSC del sangue. Va poi ricordato che possono esistere anche altre nicchie deputate al mantenimento della staminalità di cellule progenitrici ad un maggior grado di differenziazione. È questo il caso dei macrofagi che paiono svolgere un ruolo cruciale nella maturazione eritroide che porta alla formazione dei globuli rossi: infatti, la deplezione dei macrofagi riduce quasi del tutto la produzione di eritrociti. A completare il quadro dei segnali capaci di regolare la staminalità delle CS del sangue vanno ricordati i segnali distali che giungono alla nicchia ed alle CS del sangue, principalmente quelli veicolati dal sangue:

ormoni e molecole (citochine) dotati di una duplice valenza, da un lato in grado di segnalare, ad esempio, lo stato nutrizionale o la condizione di riproduzione e dall'altro capaci di stimolare la progressione del ciclo cellulare (si pensi ad esempio alla trombopoietina prodotta dal fegato e dal rene, ed in misura minore dallo stroma del midollo osseo, e necessaria per mantenere la staminalità delle CS del sangue). È probabile che ulteriori ricerche possano mettere in luce altri dettagli (i.e., componenti cellulari) della nicchia delle CS del sangue e che la "lista" dei suoi componenti possa risultare ben più ricca di quella descritta ora. Sarà così possibile comparare distinte nicchie delle CS del sangue sotto il profilo anatomico e funzionale probabilmente attribuendo loro diverse funzioni. A sostenere una simile visione vi sono già dati piuttosto chiari: si pensi ad esempio al fatto che il numero delle CS del sangue si espande in continuazione su base giornaliera nel fegato fetale mentre il loro numero si mantiene pressoché stabile nel midollo osseo (certamente in assenza di lesioni).

Anche la comparazione di nicchie omologhe tra diverse specie potrà aiutare nella piena comprensione della fisiologia delle nicchie: si pensi ai confronti possibili tra le nicchie di una specie longeva (uomo) ed una di breve durata (topo) per ottenere informazioni utili a capire il fenomeno della senescenza e dunque a scoprire i meccanismi legati alla conservazione ed integrità della ematopoiesi in condizioni di stress o in risposta all'invecchiamento. Il confronto tra nicchie di diversi tessuti sarà poi utile per rispondere a domande fondamentali per la piena comprensione della fisiologia della nicchia delle CS: ad esempio il confronto delle popolazioni di cellule mesenchimali ed endoteliali nelle nicchie del midollo osseo, dell'intestino e della pelle permetterà di capire se tessuti adulti sono tutti dotati di nicchie perivascolari per il mantenimento delle CS o se le nicchie dei tessuti dotati di capacità rigenerativa possiedono meccanismi comuni per il mantenimento della capacità di rinnovo delle CS.

Nel corso del mantenimento dei tessuti (omeostasi) e dopo una lesione le CS somatiche vengono attivate e proliferano uscendo dalla loro nicchia (come già detto, lo specifico microambiente nel quale risiedono) a formare nuovo tessuto: i segnali che regolano questo processo di "uscita" dalla nicchia sono ancora oggi poco conosciuti anche se i modelli animali stanno fornendo dati di grande rilievo che con ogni probabilità si riveleranno di grande aiuto per capire gli analoghi fenomeni nell'uomo. Ad esempio, nel famoso moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* è stato di recente messo in evidenza che il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) prodotto dalle cellule in degenerazione dell'epitelio delle tracheole aerifere, è lo stimolo capace di indurre le CS progenitrici delle tracheole a formare nuovo tessuto tracheale (Chen e Krasnow, 2014). Può essere interessante considerare più in dettaglio questo studio poiché pare presentarsi come paradigmatico dei meccanismi che si mettono in atto più in generale nei tessuti durante il loro rinnovo.

Chen e Krasnow hanno studiato la crescita delle tracheole aerifere durante la metamorfosi della *Drosophila*, quando la metà posteriore del sistema tracheale larvale si decompone e le cellule tracheali progenitrici si attivano per rimpiazzare quelle in distruzione. Con una strategia molto creativa i due autori hanno colo-

rato (marcato) le cellule progenitrici attivate con una proteina fluorescente verde (GFP, Green Fluorescent Protein) e le cellule delle tracheole delle larve con una rossa (RFP, Red Fluorescent Protein) riuscendo così ad osservare direttamente al microscopio il fatto che le cellule progenitrici lasciano la nicchia e migrano progredendo lentamente in piccoli gruppi “strisciando” lungo la superficie basale delle tracheole. Questo fenomeno accade a livello della metà posteriore e, poiché le cellule migranti mantengono la propria polarità epiteliale (una sorta di informazione “posizionale”), vanno strisciando verso la metà addominale e, mentre le tracheole larvali posteriori vanno collassando, si differenziano formando così le tracheole addominali della pupa.

A questa precisa descrizione morfologica del fenomeno i due Autori sono stati capaci di abbinare una fine dissezione molecolare per chiarire quali siano le molecole che guidano le cellule progenitrici precisamente lungo le tracheole del sistema tracheale della larva. Hanno così scoperto che una delle tante molecole della numerosa famiglia delle FGF viene prodotta dalle cellule delle tracheole larvali mentre si decompongono e che questa molecola è capace di legarsi ad un recettore sulla membrana delle cellule progenitrici liberandole così dal blocco della migrazione cellulare e della differenziazione. In altre parole, le cellule progenitrici del sistema tracheale larvale si trovano in uno stato di quiescenza (staminale) dovuto al fatto che è attivo un recettore chiamato con grande fantasia Breathless (Btl). Quando Btl è inattivato dal legame con FGF prodotto dalle cellule in decomposizione viene ad essere inibito il blocco e quindi viene a liberarsi la capacità migratoria e di differenziazione delle cellule progenitrici (le progenitrici escono dalla nicchia e si differenziano).

La controprova che il sistema è regolato da queste molecole è stata fornita da una doppia evidenza sperimentale, l'una dovuta ad una interferenza positiva ed una negativa sul sistema: la indotta ed ectopica (in luoghi non permessi) espressione delle molecole FGF causa errate fuoriuscite e migrazioni delle cellule progenitrici mentre il blocco della espressione delle molecole FGF riduce sino ad abolire la formazione delle tracheole della pupa. È così definitivamente provato che queste molecole della famiglia FGF “guidano” le cellule progenitrici fuori dalla nicchia per differenziarsi verso la parte posteriore nel corso della morfogenesi della pupa a partire dallo stadio larvale. La decomposizione delle tracheole larvali funziona così sia come sorgente delle molecole FGF sia come substrato per la migrazione cellulare. Tutto ciò suggerisce che segnali dai tessuti in decomposizione possano essere di più generale uso nel corso del riparo e della omeostasi tessutale, capaci come si dimostrano nel sistema *Drosophila* di dirigere le cellule staminali verso la differenziazione nelle appropriate sedi anatomiche.

La nicchia è dunque definibile nel suo insieme come quel microambiente che include la matrice extracellulare, ormoni, ioni di varia natura, contatti cellulari ed un ampio numero di segnali fisici e chimici sia di natura autocrina sia paracrina. Nel loro insieme tutti questi “partecipanti” regolano la fisiologia della CS sia mantenendola nella nicchia stessa a dividersi simmetricamente (due cellule figlie entrambe CS) oppure asimmetricamente (una cellula CS ed una avviata verso la differenziazione) sia promuovendone la migrazione fuori dalla nicchia ed avvian-

dola così verso uno stato di staminalità transitoria tipico delle cellule progenitrici prodromo della differenziazione terminale. Un esempio chiaro della presenza di diverse sotto-nicchie ove differenti tipi di CS multipotenti presiedono al rinnovo di distinte aree anatomiche è dato dal polmone (Ruiz et al., 2014). Qui sono state descritte diverse nicchie con la presenza di diversi tipi di CS:

- nicchia della trachea, con le CS delle ghiandole mucose, di tipo tubuloacinoso composte le quali presentano adenomeri ricoperti da una tonaca sottomucosa;
- nicchia dei bronchi, ove profondamente nell'epitelio respiratorio le cellule basali si trovano in contatto con la membrana basale; queste cellule sono considerate CS, di forma rotondeggiante il cui citoplasma si presenta alquanto povero di organelli;
- nicchia dei bronchioli con i corpi neuroendocrini (CS);
- nicchia bronchioalveolare ove delle CS presentano la capacità di differenziarsi nelle cellule di tipo 1 (chiare) e tipo 2 (alveolari).

A mantenere in equilibrio le funzioni delle diverse sotto nicchie sono principalmente deputati i segnali paracrini: l'attivazione delle cellule stromali, in particolare modo dei fibroblasti, induce infatti sia la loro migrazione sia la produzione di altri segnali paracrini capaci di creare e mantenere l'equilibrio fisiologico della nicchia. Le cellule stromali rilasciano segnali sotto forma di molecole capaci di regolare la divisione cellulare ed il differenziamento delle CS: l'equilibrio di segnali tra le cellule dello stroma e le CS è alla base della corretta rigenerazione dell'epitelio broncoalveolare così come il disequilibrio è in grado di innescare processi patologici quali la fibrosi e la trasformazione cancerosa dell'epitelio respiratorio.

Se da un lato va sempre più chiarendosi come la staminalità di una cellula sia una funzione a lei assegnata dal contesto della nicchia tissutale ove viene a trovarsi, dall'altro vanno scoprendosi in parallelo i fini dettagli molecolari a livello cellulare che la nicchia è in grado di accendere e/o spegnere nelle CS a diversa gradazione di staminalità o indirizzate ad uscirne per entrare in una via citodifferenziativa. Molti dei processi molecolari alla base dei fenomeni cellulari descritti nella omeostasi tissutale delle diverse nicchie staminali sono oggi infatti alquanto ben conosciuti ed è già possibile tentare di avere una visione unitaria analizzando i corredi molecolari dello stato funzionale di staminalità pluripotente vs quello della determinazione al differenziamento.

A questo proposito, il mondo della regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica da parte del RNA non codificante è quello che svolge un ruolo cruciale nel controllo della staminalità nella nicchia tissutale (Fatica e Bozzoni, 2014). E così sono stati identificati molti dei long non coding RNAs (lncRNAs) associati con lo stato di pluripotenza nelle CS embrionali di topo e di uomo (sia in quelle native sia in quelle indotte ove risultano essere le stesse di quelle riscontrate nelle indotte). In particolare queste molecole di lncRNAs mostrano un profilo di espressione che correla con quello dei fattori di trascrizione della staminalità componenti la circuiteria trascrizionale che controlla la pluripotenza (Plachta et al., 2011): OCT4, la proteina homeobox NANOG e SOX2 (sex-determining region Y-box 2); i promotori di questi lncRNAs si legano ad almeno uno di questi tre fattori

di trascrizione capaci di indurre la pluripotenza. Esperimenti di perdita di funzione (loss-of-function) di questi lncRNAs producono sia l'uscita dallo stato di pluripotenza sia l'accensione delle vie geniche del differenziamento con risultati del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti da esperimenti di "knockdown" dei geni OCT4, NANOG e SOX2. A sostegno di quella che viene chiamata la ipotesi dei "ponteggi modulari" ('modular scaffold' hypothesis) è stato dimostrato che lncRNAs associati alla pluripotenza *lncRNA-ES1* e *lncRNA-ES2* interagiscono con le proteine del complesso Polycomb SUZ12 e SOX2: questa interazione ha portato a suggerire una funzione di ponteggio per gli lncRNAs che sarebbero capaci di legare (reclutare) SUZ12 (come dimostrato nel silenziamento dei bersagli di SOX2 nel differenziamento neuronale delle cellule pluripotenti umane). Tra gli lncRNAs associati alla pluripotenza, *LINC-ROR* (long intergenic non-protein coding RNA, regulator of reprogramming) è particolarmente rappresentato nelle cellule umane indotte alla riprogrammazione, le iPSCs di Yamanaka, indipendentemente dalla origine istologica delle iPSCs.

È oggi chiaro che *LINC-ROR* funziona come un ceRNA (competing endogenous RNA, un RNA capace di regolare la funzione di altri trascritti di RNA grazie ad una competizione per il medesimo microRNA regolativo) nel regolare l'espressione del nucleo centrale dei fattori di trascrizione della pluripotenzialità grazie alla competizione di legame per miR-145. In altre parole, quello che la dissezione molecolare dei fenomeni cellulari della staminalità sta dimostrando è l'esistenza di circuiterie regolative tra i fattori della trascrizione, miRNAs e lncRNAs, circuiterie capaci di controllare finemente la ricezione di tutti i segnali autocrini e paracrini, di natura biofisica e biochimica così da orchestrare una risposta modulata sulle esigenze fisiologiche del tessuto controllando l'impegno cellulare alla proliferazione o al differenziamento delle CS.

Bibliografia

1. Chen F, Krasnow M. Progenitor outgrowth from the niche in *Drosophila* trachea is guided by FGF from decaying branches. *Science*. 2014; 343: 186-189.
2. Davidson EH: Emerging properties of animal gene regulatory networks. *Nature* 2010; 468: 911-922.
3. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*. 2014; 15: 7-21.
4. Marx V. Where stem cells call home. *Nature Methods*. 2013; 10: 111-115.
5. Mikkola H e Orkin S. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*. 2006; 133: 3733-3744.
6. Morrison S, Scadden D. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014; 505: 327-334.
7. Niola F, Zhao X, Singh D, Castano A, Sullivan R, et al. Id proteins synchronize stemness and anchorage to the niche of neural stem cells. *Nat Cell Biol*. 2012; 14: 477-487.
8. Plachta N, Bollenbach T, Pease S, Fraser SE, Pantazis P. Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nat Cell Biol*. 2011;

- 13: 117-123.
9. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005, 434: 843-850.
 10. Ruiz E, Oeztuerk-Winder F, Ventura J. A paracrine network regulates the cross-talk between human lung stem cells and the stroma. *Nature Communications*. 2014; 5: 1-14.
 11. Snippert HJ, Clevers H. Tracking adult stem cells. *EMBO reports*. 2011; 12: 113-122.
 12. Stadtfeld M, Hochedlinger K: Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev*. 2010; 24: 2239-2263.
 13. Ugarte F, Forsberg C. Haematopoietic stem cell niches: new insights inspire new questions. *The EMBO Journal*. 2013; 32: 2535-2547.
 14. Yeo JC, Ng HH. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res*. 2013; 23: 20-32.

Cellule staminali tessuto-specifiche: unità funzionali più che anatomiche

Manuela Monti

Centro di Ricerche in Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Si deve a Robert Hooke nel 1665 la prima osservazione, all'interno di sottili fettine di sughero, della "piccola cella", ovvero una vuota struttura del tutto simile alle celle dei monaci da cui ha preso in prestito il nome. Questa piccola cella, chiamata poi con il termine *cellula* è considerata, da sempre, l'unità funzionale degli organismi viventi. Sarà Antoni van Leeuwenhoek nel 1674 ad osservare, per la prima volta, cellule viventi (probabilmente alghe e protozoi) in campioni di acqua, terra e cibo. Ma, se andiamo ancora più indietro nel tempo, è stato Aristotele a definire che tutti i significati dell'essere implicano un comune riferimento ad una unità e, se trasliamo questo concetto ai tempi nostri, anche biologicamente parlando, non possiamo che essere d'accordo con lui.

Come tutti ben sappiamo, le cellule hanno forma, disposizione spaziale, ancoraggio a una matrice di sostegno e modalità di interazione con le cellule vicine, diverse e dipendenti dall'organo a cui appartengono. È infatti possibile indurre il differenziamento di cellule staminali in un tessuto ben definito, rispettando però le caratteristiche biomeccaniche tipiche del tessuto naturale: nuovo osso verrà formato in un ambiente "duro", tessuto adiposo in un ambiente "morbido" e così via. In questo ambiente, o nicchia, le cellule sono sottoposte a stimoli di diverso tipo che vengono assorbiti e rielaborati grazie all'espressione ed interazione delle proteine YAP (Yes Associated Protein) e TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), che una volta entrate nel nucleo, inducono la cellula ad interagire con l'ambiente in cui è immersa. Il lavoro di Dupont e collaboratori del 2011 (1) ha infatti dimostrato che l'interazione YAP/TAZ media gli effetti biologici cellulari: aumentando o diminuendo i livelli di queste proteine è infatti possibile determinare il destino delle cellule staminali. In particolare, come dimostrato dalla figura 1 (2), la F-actina e le piccole signaling G proteins della famiglia RHO (RHO GTPases), sono i fattori chiave per l'attivazione del complesso YAP/TAZ in risposta alla adesione cellula-substrato e a segnali meccanici imposti dalla matrice extracellulare.

Questo risultato conferma il fatto che è l'ambiente con la sua complessa architettura a governare i destini cellulari ed è da questo presupposto che si potrebbe e

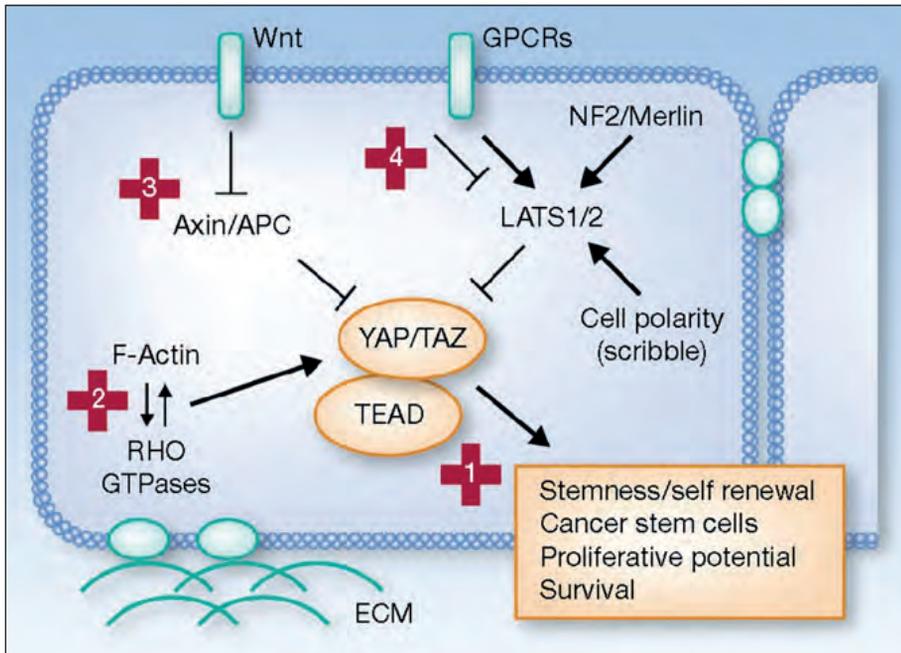


Fig. 1 - YAP/TAZ sono al centro di un complesso network di regolazione che offre diversi targets terapeutici (croci rosse). YAP/TAZ interagiscono con i fattori di trascrizione TEAD per regolare la trascrizione genica e promuovere il potenziale proliferativo delle cellule staminali cancerose (da Piccolo et al., 2013).

dovrebbe partire per studiare il comportamento delle cellule tumorali, ad esempio, studiando le caratteristiche biomeccaniche dei tessuti neoplastici.

Un altro esempio di funzione cellulare mediata da stimoli esterni, interazione cellula con ambiente circostante, è illustrato da un recentissimo studio nel quale si è messo in evidenza come le radio frequenze siano in grado di influenzare il destino differenziativo di una cellula modificandone struttura e funzione attraverso una interazione dinamico-energetica con le molecole con cui entra a contatto. Se pensiamo all'ambiente cellulare, il target del suono (così come il bersaglio di ogni altro stimolo interno o esterno) è rappresentato da geni e proteine che regolano l'architettura fine del DNA. In uno studio pubblicato nel 2013, il gruppo coordinato da Carlo Ventura dell'Università di Bologna, ha dimostrato che fibroblasti umani esposti ad un Radio Electric Asymmetric Conveyer (REAC) che emette una radiofrequenza di 2.4GHz, si sono differenziati in senso cardiaco, neuronale e muscolare (3). REAC sembra indurre la trascrizione di geni tessuto-specifici quali Mef2c, Tbx5, GATA4, Nkx2.5 per il reprogramming in senso cardiaco e myoD e neurogenin 1 per miogenesi e neurogenesi rispettivamente. Al contrario, REAC ha suscitato un effetto bifasico su diversi geni stemness, portando ad un aumento trascrizionale di Oct4, Sox2, cMyc, Nanog e Klf4 dopo 6-20 h di esposizione. Questa riprogrammazione verso uno stato indotto pluripotente comporta anche la attivazione dei pathways dell'ossidasi NADPH e Nox4.

Questo studio, che esula senza dubbio dai canonici esperimenti fatti sin ora, è di una importanza fondamentale per chiarire come le cellule, all'interno di una struttura funzionale, la nicchia, siano in grado di interagire con diversi meccanismi, esterni, paracrini, nervosi, umorali, metabolici, fisici, strutturali, per riprogrammare l'equilibrio atomico e molecolare, l'omeostasi e lo stato di "salute" cellulare.

Se importanti sono gli studi di biologia di base delle cellule staminali, ancora più affascinanti e promettenti sono quelli con un risvolto traslazionale ancora più immediato.

L'ovario si presta come una fantastica struttura funzionale in cui è possibile studiare attraverso diversi approcci, la capacità che la singola cellula staminale totipotente (l'ocita) ha di interagire con le cellule che la circondano (cellule somatiche follicolari), con influenze esterne (ormonali, metaboliti, livelli di ossigeno), con diverse proteine che inducono la maturazione (BMP15, GDF9, WNT e β catenin), con meccanismi di attivazione di DNA repair e di comunicazione tra l'ambiente che circonda il follicolo, dentro il quale l'ocita è protetto sino a maturazione e l'ambiente che circonda e fa da nicchia al follicolo stesso, l'ovario.

Una delle assunzioni di base della biologia della riproduzione afferma che, sin dalla nascita, le gonadi femminili dei mammiferi adulti possiedono un numero fisso e non rinnovabile di oociti bloccati allo stadio di diplotene della prima divisione meiotica.

Questo dato contrasta, come ben noto, con le proprietà delle cellule germinali maschili le quali sono in grado di mantenere la loro capacità proliferativa durante tutta la vita adulta e di rinnovare continuamente il pool di cellule germinali staminali destinate alla formazione di spermatozoi maturi. Va comunque precisato che, per quanto sorprendente possa apparire, molti aspetti basilari della oogenesi sono ancora poco conosciuti: basti pensare che ancora non è del tutto chiarito il processo citodifferenziativo dei "più piccoli" follicoli umani. Sin dal 2004 è emerso il concetto di neo-oogenesi, ovvero della presenza nell'ovario adulto di cellule germinali staminali (FGSCs) in grado di dividersi per formare nuovi follicoli e, di conseguenza, nuovi oociti. Il gruppo del prof. di Jonathan Tilly ha dimostrato che sia negli ovari di topoline di giovane età che in quelli di topoline adulte, cellule germinali mitoticamente attive sono in grado di ricostituire il pool di follicoli presenti alla nascita e, nel 2009, ha inoltre evidenziato la possibilità di produrre in vitro nuovi oociti partendo da cellule staminali (4, 5).

Nel topo, un raro numero di alcune (pochissime) cellule germinali staminali ($\sim 0.014 \pm 0.002\%$ del numero totale di oociti in un topo adulto) sono state isolate nella zona corticale dell'ovario in quanto positive per il gene *Stra8*, normalmente espresso nel testicolo adulto e nell'ovario embrionale. La positività per questo gene, che indica una formazione *de novo* di oociti, è supportata e sostenuta anche da evidenze genetiche dimostrate dall'alto numero di divisioni mitotiche a carico delle cellule germinali staminali progenitrici, presenti negli ovari di topoline adulte. Le FGSCs possono essere coltivate in vitro e formare oociti immaturi e hanno anche la capacità di ripopolare la popolazione oocitaria se impiantate in un ovario murino maturo (6). FGSCs umane trasferite nell'ovario di un topo immuno-

compromesso hanno originato oociti e partecipato alla formazione dell'ambiente follicolare in vivo (6). La possibilità di stimolare una neo-oogenesi potrebbe essere impiegata in medicina traslazionale prevenendo, ad esempio, la perdita totale di oociti dovuta al processo fisiologico della menopausa o alla azione di terapie (chemio e radio) ablative.

Il concetto di cellula staminale come unità funzionale frutto della interazione genoma-ambiente è meglio espresso dal concetto di cellula iPS (induced Pluripotent Stem cell). Ovvero da quella cellula terminalmente differenziata indotta ad essere pluripotente, a ritornare “bambina”, grazie alla sua “interazione” con i *fantastici quattro* fattori di Yamanaka (Nobel per la medicina o la fisiologia insieme a John Gurdon nel 2012) Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc (7).

Le prime linee di cellule indotte alla pluripotenza (cellule iPS) non presentavano la capacità di contribuire alla linea germinale: ora siamo in grado di produrre linee di iPS capaci di una simile operazione, sempre impiegando gli stessi quattro fattori ma con l'aggiunta della espressione di Nanog. Quest'ultimo contribuisce fundamentalmente a modificazioni epigenetiche della conformazione della cromatina (sebbene in un modo ancora poco chiaro), permettendo una accessibilità diversa alla espressione di altri geni, aprendo cioè la via a quella regolazione della staminalità basata sulle circuiterie geniche. In base a questa regolazione è possibile comprendere come un gene (Oct4) possa essere necessario alla funzione di staminalità, un altro (Nanog) non essere indispensabile *per se*, ma necessario, ad esempio, per la riprogrammazione piena delle funzioni del genoma verso la staminalità. Ed ancora, comprendere i ruoli duali che altri geni possono svolgere: è questo il caso di c-myc. Quest'ultimo è soprannominato il “Dr. Jekyll/Mr. Hyde” della riprogrammazione genetica. Un minimo livello di espressione di c-myc è essenziale per la crescita rigenerativa di un tessuto basata sull'attivazione del suo comparto staminale; comunque, anche solo un piccolo eccesso di questa espressione, sia endogena che esogena, può causare la formazione di tumori nelle cellule staminali trapiantate, probabilmente promuovendo la formazione di SC cancerose.

Nel topo, la potenzialità terapeutica delle cellule iPS è già stata dimostrata per molte patologie tra cui l'anemia falciforme, grazie al trapianto di cellule ematopoietiche derivanti da iPS autologhe, nel morbo di Huntington, nella distrofia muscolare di Duchenne e Becker, nel diabete mellito di tipo I, nella sindrome di Down. iPS sono state differenziate anche verso il fenotipo neuronale migliorando il fenotipo di topi con il morbo di Parkinson e aprendo la strada verso scenari terapeutici sempre più promettenti anche per l'uomo.

Proprio nell'uomo, sono state formate librerie di tessuti provenienti da cellule iPS di pazienti e donatori sani con lo scopo di validare e saggiare nuovi farmaci e terapie geniche per standardizzare, in un futuro non troppo prossimo, terapie *ad hoc*.

Bibliografia essenziale

1. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Zanconato F, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011; 474: 179-183.

2. Piccolo S, Cordenonsi M, Dupont S. Molecular Pathways: YAP and TAZ take center stage in organ growth and tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*. 2013; 19: 4925-4930.
3. Maioli M, Rinaldi S, Santaniello S, Castagna A, Pigliaru G, et al. Radio electric conveyed fields directly reprogram human dermal skin fibroblasts toward cardiac, neuronal, and skeletal muscle-like lineages. *Cell Transplant*. 2013; 22 (7): 1227-1235.
4. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004; 428:145-150.
5. Tilly JL, Telfer EE. Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? *Mol Hum Reprod*. 2009; 15 (7): 393-398.
6. White Y, Woods D, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature Med*. 2012; 18: 413-421.
7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-676.

La transizione epitelio mesenchimale: passaggio cruciale nel processo metastatico

Sergio Marchini

Unità di Genomica Traslazionale, Laboratorio di Farmacologia Antitumorale,
Dipartimento di Oncologia, Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri”, IRCCS, Milano

Negli organismi pluricellulari, la transizione epitelio-mesenchimale (EMT, dall'inglese “epithelial to mesenchymal transition”) è un processo fisiologico con un ruolo chiave, sia durante le fasi dello sviluppo embrionale (embriogenesi e/o organogenesi), sia nell'adulto dove coordina processi quali la riparazione dei tessuti danneggiati. Dati recenti riportati in letteratura stanno dimostrando come l'EMT abbia anche un ruolo patologico, in quanto l'anomala attivazione di meccanismi molecolari che regolano la EMT è stata identificata durante le fasi di trasformazione neoplastica e soprattutto nel processo metastatico. L'idea generale è che la progressione del tumore verso una forma sempre più aggressiva sia correlata con la perdita dell'identità epiteliale e l'acquisizione del fenotipo mesenchimale (Thiery e Sleeman, 2006; Lee et al., 2006).

L'EMT è un processo biologico reversibile, coordinato e gerarchicamente organizzato sul piano molecolare e morfologico, che porta alla disaggregazione degli epiteli e alla loro riorganizzazione in strutture morfologicamente distinte con fenotipo mesenchimale. Le principali caratteristiche delle cellule che vanno incontro a EMT sono:

- a) aumento delle capacità migratorie.
- b) Invasività.
- c) Elevata resistenza all'apoptosi.

Le cellule epiteliali sono cellule altamente polarizzate con una forma geometrica precisa e connesse le une alle altre da giunzioni cellulari. Le cellule di fenotipo mesenchimale invece non stabiliscono contatti intercellulari, sono prive di polarità e dotate di movimento. Durante la EMT, le cellule epiteliali perdono le giunzioni intercellulari, con conseguente distacco dalle altre cellule circostanti. Nel caso del processo di metastatizzazione, le cellule neoplastiche, soprattutto quelle presenti al fronte invasivo del tumore primario, mostrano frequentemente una down-regolazione dei marcatori del fenotipo epiteliale e una perdita delle giunzioni intercellulari, risultando nella perdita di polarità tipica delle cellule epiteliali e in una ridotta adesività intercellulare necessaria per invadere la matrice extracellulare (ECM) e migrare lontano dal sito del tumore primario.

Dal punto di vista funzionale la EMT si può verificare in tre condizioni biologiche distinte con esiti funzionali differenti fra loro; è stata pertanto proposta una classificazione della EMT in tre diversi sottotipi a seconda del contesto biologico in cui essa si verifica e che prendono il nome di EMT di “Tipo 1”, “Tipo 2”, “Tipo 3” (Kalluri e Weinberg, 2009). Nel “Tipo 1”, la EMT è associata con le fasi dello sviluppo embrionale. Nel “Tipo 2” la EMT, è associata durante i processi di infiammazione tissutale con la rigenerazione dei tessuti danneggiati, mentre nel “Tipo 3”, il processo di EMT è associato alla progressione dei carcinomi e alla loro metastatizzazione. Sostanzialmente oggi l’EMT è riconosciuto come un meccanismo cardine per disperdere le cellule nell’embrione, riparare i tessuti danneggiati e contribuire al processo di invasività e metastasi dei tumori epiteliali. Dati sempre più solidi in letteratura sul ruolo dell’EMT nella progressione tumorale sottolineano come l’EMT sia coinvolta anche nella comparsa di resistenza all’apoptosi, all’anoikia e alla senescenza, nell’immuno-tolleranza e immuno-soppressione, alla farmaco resistenza conferendo infine proprietà staminali alle cellule tumorali stesse (dall’inglese CSC, *cancer stem cells*).

La conversione fenotipica che accompagna la EMT è il risultato di cambiamenti nella biochimica cellulare caratterizzati dall’attivazione di cascate del segnale che dalla superficie cellulare si irradiano al nucleo dove avviene l’attivazione di un preciso programma trascrizionale; dall’iper-espressione di molecole di superficie e dalla contemporanea internalizzazione di proteine di membrana (Kalluri and Neilson, 2003). Tutto ciò è spesso accompagnato da un’aumentata motilità cellulare (grazie alla formazione di pseudopodi e al rimodellamento del citoscheletro) e dall’espressione di marcatori mesenchimali quali la vimentina e la caderina N (Lang et al., 2002; Thiery, 2003). Viene aumentata l’espressione di proteine del citoscheletro, quali l’ α -SMA, la γ -actina, la β -filamina e la talina, e altre componenti della matrice extracellulare quali la fibronectina ed il collagene (La Gamba et al., 2005). L’aumento della sintesi delle metalloproteasi (MMPs,) permette alle cellule tumorali di invadere il microambiente circostante e di iniziare la colonizzazione a distanza.

Benchè il processo di EMT si configuri come un evento precoce importante nel processo di migrazione delle cellule tumorali, esistono ancora molti dubbi dal punto di vista sperimentale che questo fenomeno interessi tutte le cellule della massa tumorale e che sia condiviso tra tutti i tumori epiteliali. I tumori sono costituiti da una popolazione cellulare altamente eterogenea e molti carcinomi metastatici non sono sottoposti ad una completa transizione ad un fenotipo mesenchimale, ma possiedono ancora caratteristiche molecolari e morfologiche tipiche di un epitelio differenziato, con giunzioni epiteliali e polarità apicale-basolaterale intatta (Christiansen e Rajasekaran, 2006). È opinione largamente condivisa che cellule tumorali inizino una EMT “parziale” per poi revertire da mesenchimali a epiteliali nei siti di metastasi secondo un processo detto MET (transizione mesenchimale-epiteliale); infatti, questi tumori secondari nei siti distali mantengono le stesse caratteristiche istopatologiche del tumore primario, senza mostrare fenotipo mesenchimale (Kalluri e Weinberg, 2009). Queste evidenze mostrano che la transizione ad un fenotipo maligno aggressivo non è un evento “tutto o nulla”

(Christiansen e Rajasekaran, 2006). Per questo è oggi difficile poter delineare per tutti i tipi di tumore dei marcatori univoci di EMT. Generalmente si ritiene che le metastasi derivino da cellule di una neoplasia avanzata che hanno acquisito la capacità di invadere e disseminare. Studi recenti tuttavia indicano che il processo di EMT e la conseguente disseminazione di cellule neoplastiche possono avvenire in maniera continua dall'inizio dello sviluppo del tumore primitivo e non solamente in stadi avanzati come ad esempio nel tumore epiteliale dell'ovaio (EOC) che negli stadi III-IV è metastatico al suo esordio.

L'attivazione del processo EMT si verifica attraverso un'orchestrata serie di eventi che vedono coinvolte sia le cellule epiteliali sia le cellule che colonizzano il microambiente circostante quali cellule stromali, piastrine. La EMT è indotta da numerosi fattori spesso rilasciati dal microambiente stesso, tra cui fattori di crescita dei recettori tirosin chinasi, dalla via di segnalazione di Wnt, da quella di Notch, dalle MMP e dalla ipossia. L'induttore di EMT per eccellenza è il TGF- β , che svolge un ruolo fondamentale sia nei processi ontogenici che nella trasformazione neoplastica e convergono a livello citoplasmatico nella degradazione delle E-caderine, evento chiave associato alla distruzione delle giunzioni cellula-cellula. Possiamo indicativamente riconoscere 4 diversi meccanismi di regolazione dell'EMT:

- Regolazione post trascrizionali.
- Controlli trascrizionali (SNAIL, TWIST, SLUG).
- Diversi meccanismi di splicing.
- Regolazione a livello degli RNA non codificanti (miR-200; miR-34; miR-101).

Il quadro molecolare fin qui descritto è reso ancora più complicato in alcune neoplasie, quali il EOC, in cui non solo non abbiamo ancora un chiaro modello che descriva, a partire dalla lesione primaria, le varie tappe della progressione tumorale, ma che presenta anche un processo di metastatizzazione particolare in quanto le metastasi si formano per "dispersione" nella cavità peritoneale e non per disseminazione ematica.

Come dicevamo prima, il EOC negli stadi avanzati (circa l'80% delle diagnosi annue) si presenta già metastatico all'esordio con una iniziale sensibilità alla terapia al platino per poi progressivamente diventare resistente a qualunque linea terapeutica durante i cicli successivi dopo la ricomparsa della malattia. Il ruolo dell'EMT nell'eziopatogenesi del EOC è stata ampiamente discussa in letteratura in questi ultimi anni con risultati spesso non univoci. Dati pubblicati recentemente sembrano sottolineare come la presenza all'esordio della malattia di cellule tumorali con fenotipo mesenchimale sia da associarsi alla scarsa sensibilità alla prima linea di platino, e quindi alla prognosi. Studi genomici condotti su ampie casistiche di pazienti (TCGAtlas) hanno dimostrato come esista una serie di alterazioni molecolari ("signatures") spesso indipendenti dalla classificazione morfologico funzionale convenzionali (stadio, grado, istotipo) che richiamano al fenotipo mesenchimale e correlano con una prognosi peggiore.

Sfruttando una banca dei tessuti biologici di EOC costruita nell'arco degli ultimi 20 anni in collaborazione con l'ospedale San Gerardo di Monza, abbiamo selezionato una coorte di campioni di tumore epiteliale dell'ovaio, stadio III-IV, di cui

per uno stesso paziente era disponibile la biopsia all'esordio della malattia, cioè quando il tumore non era ancora stato trattato con la chemioterapia e costituito per la maggior parte da cellule sensibili al platino (abbreviato come PSO, Primary Surgery Ovary) e dopo diversi cicli di terapia, quando il tumore ricompariva ed era costituito da cellule tumorali resistenti ad ogni trattamento convenzionale (abbreviato come SCR, Secondary Cyto-Reduction). L'analisi del profilo trascrizionale ha evidenziato un numero elevato di geni differenzialmente espressi tra SCR vs PSO e comune tra i dei pazienti analizzati. L'analisi dei pathway ha invece dimostrato che i geni analizzati afferivano per la maggior parte al pathway dell'attivazione del TGF- β , della riorganizzazione della matrice extracellulare e della motilità cellulare. Visti nel loro insieme questi dati suggerivano che in almeno il 70% dei casi analizzati alla ricomparsa della malattia la popolazione tumorale fosse prevalentemente costituita da cellule non più di natura epiteliale ma altresì che avessero acquisito un fenotipo mesenchimale. Nel restante 30% non avevamo una modulazione del pathway.

Il ruolo del TGF- β nel modulare il processo di EMT nell'ovaio è stato ulteriormente approfondito sul piano molecolare, dimostrando che l'up-regolazione dei livelli di espressione di miR-181^o è la condizione fondamentale per aumentare l'attività di TGF- β e indurre la trasformazione delle cellule tumorali da epiteliali a mesenchimali. miR-181a inibisce i livelli di Smad-7 che è il principale regolatore negativo della funzionalità del TGF- β . Inoltre, utilizzando i livelli di espressione di miR-181a alla prima chirurgia, è possibile stratificare il rischio delle pazienti di andare incontro a recidiva.

In conclusione i dati sperimentali ottenuti e le osservazioni riportate in letteratura sia in modelli pre-clinici (i.e., *in vivo* e *in vitro*), sia su biopsie di pazienti, suggeriscono che tra i diversi fattori molecolari in grado di influenzare la prognosi e la risposta alla terapia nel EOC vi siano sicuramente i meccanismi che guidano la EMT. Da un punto di vista terapeutico queste osservazioni hanno un importante impatto sul disegno e la pianificazione dei futuri approcci terapeutici mirati ad un miglioramento dell'indice terapeutico. La natura reversibile del processo EMT, suggerisce che sia possibile associare le terapie convenzionali con agenti citotossici (sia bersaglio specifici che non) a nuovi composti in grado di revertire il fenotipo da mesenchimale a epiteliale.

Plasticità differenziativa delle cellule staminali emopoietiche umane

Sergio Ferrari

Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

Le cellule staminali emopoietiche dell'adulto costituiscono una piccola sottopopolazione cellulare presente nel midollo osseo. Sono cellule multi-potenti in grado di garantire, in condizioni fisiologiche, la produzione dei diversi tipi di cellule del sangue e degli organi linfoidi per tutta la vita dell'individuo. Morfologicamente sono simili ai piccoli linfociti del sangue periferico con un compartimento nucleare prevalente e un piccolo lembo di citoplasma. Sulla superficie sono presenti numerose e diverse proteine integrali di membrana (molecole di adesione, recettori, trasportatori, canali ionici ecc.) che ne caratterizzano le funzioni. Le proprietà biologiche di queste cellule sono numerose: autorinnovamento, differenziamento, migrazione e adesione. La definizione di cellula staminale emopoietica è funzionale e deriva dalla capacità, mantenuta nel tempo, di ripopolare midolli resi aplastici. Fra le proteine di superficie il CD 34 è sicuramente la più conosciuta fra quelle che caratterizzano il livello di staminalità ed è largamente utilizzata nelle procedure di purificazione. Dal punto di vista cinetico il midollo osseo è un tessuto ad alta capacità rigenerativa e segue la regola generale di un equilibrio dinamico fra quiescenza, proliferazione, differenziamento e apoptosi. Un'alterazione di questo equilibrio omeostatico porta ad una patologia midollare: ipoplasia, aplasia, iperplasia, displasia e neoplasia. Il midollo osseo è contenuto, nell'adulto, all'interno delle ossa ed è in stretto sinergismo con questo tessuto. Il microambiente emopoietico è quindi caratterizzato dalla coesistenza di questi due tessuti: il tessuto osseo e il tessuto midollare. Notevoli sono le differenze delle concentrazioni di calcio o della pressione parziale di ossigeno nei diversi distretti microambientali midollari. Inoltre, la presenza di due diversi tipi di cellule staminali multi-potenti, emopoietiche e mesenchimali, assicura il ricambio di tutte le componenti cellulari del microambiente emopoietico stesso. Le cellule staminali emopoietiche sono circolanti nei capillari midollari e possono stabilire contatti con i diversi tipi cellulari presenti nel microambiente dando origine alle così dette nicchie. Le più studiate sono la nicchia osteblastica e quella vascolare, ma altrettanto importante è la nicchia stromale. Dal punto di vista funzionale le cellule staminali emopoietiche nelle diverse nicchie possono essere quiescenti o proliferanti, ma questo stato funzionale dipende largamente dalle concentrazioni delle citochine

prodotte nel microambiente, dal diverso grado di adesione delle cellule staminali ad altre componenti cellulari delle nicchie quali: cellule staminali mesenchimali nestina positive, macrofagi midollari, osteoblasti, cellule endoteliali, cellule adipose, cellule stromali. Fondamentale è inoltre l'innervazione adrenergica per la modulazione cinetica e funzionale delle staminali in dipendenza del così detto ritmo circadiano. Fatte queste premesse nel seminario verrà trattato il controllo genetico dell'emopoiesi nelle diverse fasi: autorinnovamento, scelta di linea differenziativa, espansione quantitativa dei precursori, differenziamento terminale. In definitiva si discuterà dei meccanismi che, partendo da una unica cellula staminale emopoietica, permettono di ottenere otto tipi di cellule terminalmente differenziate caratterizzate da diverse specializzazioni. Tre sotto-popolazioni di cellule staminali/progenitori emopoietici sono state caratterizzate e studiate. L'approccio metodologico usato è quello definito di "Systems Biology" che si basa sullo studio delle risposte biologiche delle cellule staminali emopoietiche a interferenze di diverso tipo, quali: trattamento in vitro con farmaci, vitamine o altre molecole bioattive; trasferimento genico per interferenze di over-espressione o di silenziamento genico. Gli effetti biologici di queste interferenze sono state studiate utilizzando l'insieme delle tecnologie genomiche, post-genomiche e delle tecnologie cellulari e molecolari. Saranno riferiti i risultati più interessanti. Gli studi del profilo di espressione genica in queste popolazioni di cellule staminali ha permesso di individuare, mediante lo sviluppo di mappe trascrizionali, le regioni del genoma trascritte, silenti o modulabili in corso di differenziamento emopoietico. Lo studio è stato approfondito da esperimenti sull'effetto posizionale dell'espressione genica in cellule staminali emopoietiche e precursori mieloidi. Tali esperimenti si basano sulla caratterizzazione dei territori cromosomici nei nuclei in interfase e sulla mappatura di cluster di geni silenti, costitutivamente espressi o modulati in cellule staminali emopoietiche e precursori mieloidi.

Bibliografia

1. Salati S, Lisignoli G, Manfredini C, Pennucci V, Zini R, et al. Co-culture of hematopoietic stem/progenitor cells with human osteoblasts favours mono/macrophage differentiation of the expense of the erythroid lineage. *PLOS One* 2013; 8 (1): e53496. IF 3.73.
2. Zini R, Norfo R, Ferrari F, Bianchi E, Salati S, et al. Valproic acid triggers erythro/megakaryocyte lineage decision through induction of GFI1B and MLLT3 expression. *Experimental Hematology* 2012; 40 (12): 1043-1054 e6. IF 3.11.
3. Lenzi L, Facchin F, Piva F, Giulietti M, Pelleri MC, et al. TRAM (Transcriptome Mapper): database-driven creation and analysis of transcriptome maps from multiple sources. *BMC Genomics*. 2011; 18: 12-121.
4. Vignudelli T, Selmi T, et al. ZFP36L1 Negatively regulates erythroid differentiation of CD34+ hematopoietic stem cells by interfering with Stat5b pathway. *Mol Biol Cell*. 2010 Aug 11.
5. Tenedini E, Roncaglia E, et al. Integrated analysis of micro RNA and mRNA

- expression profiles in physiological myelopoiesis: role of Hsa-mir-299-5p in CD34+ progenitor cells commitment. *Cell Death and Disease*. 2010; 1: 1-6.
6. Bianchi E, Zini R, et al. c-Myb supports erythropoiesis through the transactivation of KLF1 and LMO2 expression. *Blood*. 2010 Aug 4.
 7. Zanicco-Marani T, Vignudelli T, et al. TFE3 transcription factor regulates the expression of MAFB during macrophage differentiation. *Exp Cell Res*. 2009; 315 (11): 1798-1808.
 8. Coppe A, Ferrari F, et al. Motif discovery in promoters of genes co-localized and co-expressed during myeloid cells differentiation. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37 (2): 533-549.
 9. Salati S, Zini R, et al. Role of CD34 antigen in myeloid differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*. 2008; 26 (4): 950-959.
 10. Gemelli C, Orlandi C, et al. The vitamin D3/Hox-A10 pathway supports MafB function during the monocyte differentiation of human CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol*. 2008; 181 (8): 5660-5672.
 11. Ferrari F, Bortoluzzi S, et al. Genomic expression during human myelopoiesis. *BMC Genomics*. 2007; 8: 264.
 12. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *CELL*. 2007; 131: 324-336.
 13. Zanicco-Marani T, Vignudelli T, et al. Tfe3 expression is closely associated to macrophage terminal differentiation of human hematopoietic myeloid precursors. *Exp Cell Res*. 2006; 312 (20): 4079-4089.
 14. Tagliafico E, Tenedini E, et al. Identification of a molecular signature predictive of sensitivity to differentiation induction in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006; 20 (10): 1751-1758.
 15. Gemelli C, Montanari M, et al. Virally mediated MafB transduction induces the monocyte commitment of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Death Differ*. 2006; 13 (10): 1686-1696.
 16. Montanari M, Gemelli C, et al. Correlation between differentiation plasticity and mRNA expression profiling of CD34+-derived CD14- and CD14+ human normal myeloid precursors. *Cell Death Differ*. 2005 Jun 10.
 17. Manfredini R, Zini R, et al. The kinetic status of hematopoietic stem cell subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment, and engraftment. *Stem Cells*. 2005.
 18. Tagliafico E, Tenedini E, et al. Gene expression profile of Vitamin D3 treated HL60 cells shows an incomplete molecular phenotypic conversion to monocytes. *Cell Death Differ*. 2002; 9 (11): 1185-1195.

Molecular mechanisms of neoplastic B-cell lymphopoiesis

Davide Rossi, Alessio Brusca, Valeria Spina, Sara Monti, Silvia Rasi, Carmela Ciardullo, Michaela Cerri, Stefania Cresta, Gianluca Gaidano

Division of Hematology, Department of Translational Medicine, Amedeo Avogadro University of Eastern Piedmont, Novara

The detection of recurrent chromosomal aberrations has been of key importance for understanding neoplastic B-cell lymphopoiesis and the mechanisms driving the variable clinical phenotype of B-cell malignancies. However, cytogenetic lesions do not entirely explain the molecular pathogenesis and the clinical heterogeneity of these disorders. Whole genome/exome sequencing has disclosed the genetic landscape of lymphoid malignancies as well as of other tumors, providing comprehensive catalogues of somatic mutations and new insights into the genes that contribute to cellular transformation. The molecular pathogenesis of B-cell disorders offer paradigmatic exemplifications of a number of novel mechanisms that are more generally involved in lymphopoiesis and in lymphomagenesis, including, though not restricted to, deregulation of signaling pathways (i.e. B-cell receptor, NF- κ B, NOTCH, toll-like receptor, JAK-STAT), epigenetic deregulation, and immune escape. The role of these novel mechanisms in driving lymphomagenesis will be exemplified in the context of specific types of lymphomas in which they exert a predominant function.

Interaction between antigen stimulation and genetic lesions in extranodal marginal zone lymphoma

Extranodal marginal zone lymphoma (EMZL) is an indolent tumor arising in the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) and accounting for ~10% of NHL. EMZL is considered an antigen driven lymphoid malignancy associated with protracted antigenic stimulation by microbial pathogens, auto-antigens or other unknown stimuli, which trigger a sustained lymphoid proliferation at sites normally devoid of lymphoid tissue (1). (With the progression of disease, chromosomal aberrations may occur, resulting in aberrant activation of signaling pathways which lead to the lymphoproliferation becoming independent of antigenic stimulation. Long term antigenic stimulation sustained by infections or autoimmune inflammation explains how lymphoid infiltrates may appear in extranodal sites that are

normally devoid of lymphoid tissue (i.e. stomach, lungs, salivary glands, thyroid and lachrymal glands) and conceivably represents the first step of the lymphomagenesis process. Bacteria, or at least immune response to bacterial antigens, have been implicated in the pathogenesis of EMZL. These include *H. pylori* in gastric EMZL, *B. burgdorferi* in cutaneous EMZL, *C. psittaci* in ocular adnexa EMZL, and *C. jejuni* in intestinal EMZL (1). Beside epidemiological and *in vitro* evidence, the importance of this stimulation *in vivo* has been consistently documented, at least for *H. pylori*-associated gastric EMZL, by the induction of remission of EMZL with antibiotic therapy tailored at eradication of the bacteria. Epidemiological evidence points also to a role of autoimmune-based chronic inflammation in the pathogenesis of EMZL of certain anatomical sites. Indeed, Sjögren syndrome and Hashimoto thyroiditis may precede EMZL of the salivary glands and thyroid, respectively. Consistently, patients affected Sjögren syndrome have a ~40-fold increased risk of developing an EMZL of the salivary gland, while patients affected by Hashimoto thyroiditis have a ~40-fold increased risk of thyroid EMZL (2).

The acquisition of genetic lesions is associated with progression of EMZL and resistance to treatments tailored towards bacterial eradication, thus suggesting that lymphoma cells gain independence from the microenvironment through the

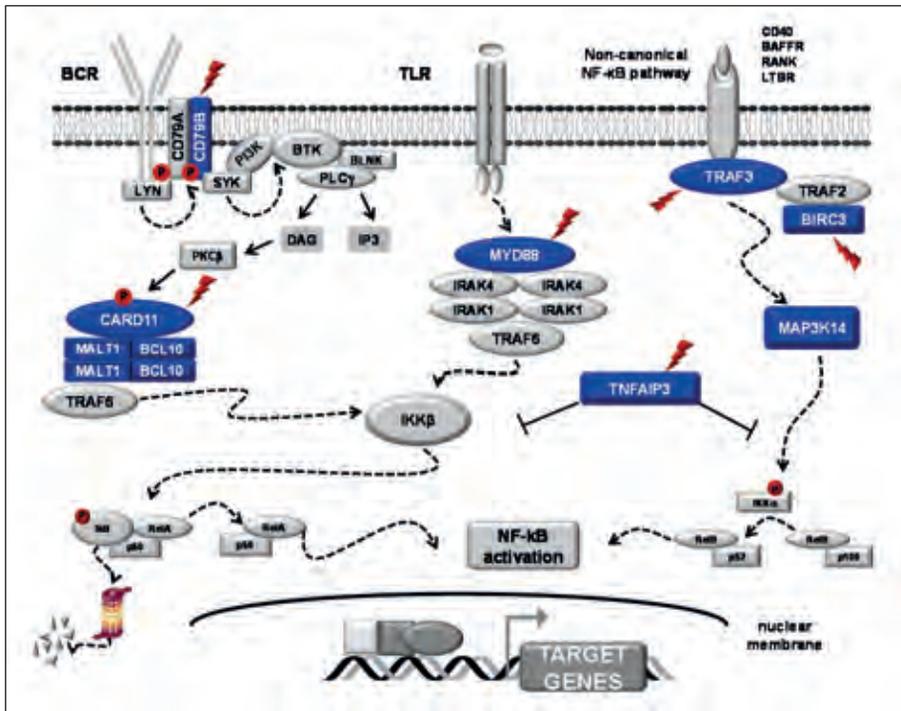


Fig. 1 - NF-κB activation through the B cell receptor (BCR), toll-like receptor (TLR) and non-canonical NF-κB signaling pathway. Genes harboring somatic lesions in extranodal B-cell tumors are highlighted in blue and marked by an arrow.

development of genetic abnormalities surrogating the same stimuli that in the early phases of the disease are provided by antigen stimulation and inflammation. Consistently, EMZL is genetically characterized by different, usually mutually exclusive, genetic abnormalities that surrogate chronic B-cell receptor (BCR) activation towards the constitutive deregulation of NF- κ B.

In normal B-cells, when the BCR is ligated by an antigen, a signaling cascade is initiated that ultimately results into CARD11 phosphorylation and activation. CARD11, along with BCL10 and MALT1, takes part into the CBM signaling complex that is required for triggering NF- κ B signaling downstream of the BCR receptor. Upon BCR engagement-induced phosphorylation, CARD11 acquires an open conformation that allows CARD11 to recruit MALT1 and BCL10 into the CBM multiprotein complex and activate the IKKB kinase, thereby initiating NF- κ B signaling (Fig. 1) (3).

Three mutually exclusive chromosomal translocations have been identified in EMZL, including t(1;14)(p22;q32), t(14;18)(q32;q21), and t(11;18)(q21;q21) (2). These translocations are recurrent, although at considerably variable frequencies in EMZL at different sites, lead to the up-regulation of either *BCL10* or *MALT1* or the generation of the *BIRC3-MALT1* fusion protein, and induce aberrant activation of NF- κ B through the deregulation of the CBM multiprotein complex (Fig. 1). The t(1;14)(p22;q32) translocation brings the entire *BCL10* gene under the regulatory control of the immunoglobulin gene enhancer and hence causes *BCL10* overexpression. Physiologically, BCL10 acts as an adaptor protein linking its upstream protein CARD11 to its downstream molecule MALT1 to form of the CBM complex and activate NF- κ B. Pathological overexpression of BCL10 is capable of activating the NF- κ B pathway through BCR signaling-independent oligomerization of the CBM complex (2).

The t(14;18)(q32;q21) translocation brings the entire *MALT1* gene under the regulatory control of the immunoglobulin gene and hence deregulates its expression. In contrast to BCL10, the overexpression of MALT1 alone is insufficient to induce NF- κ B activation, probably due to a lack of structural domain that can mediate MALT1 self-oligomerization, but requires to synergize with BCL10 in the activation of NF- κ B via CMB complexing (2). The t(11;18)(q21;q21) translocation fuses the N-terminal region of the *BIRC3* to the C-terminal region of the *MALT1* and generates a functional chimeric fusion which gains the ability to activate the NF- κ B pathway through at least two mechanisms. First, unlike wild-type MALT1, the BIRC3-MALT1 fusion oligomerizes through heterotypic interaction between the BIR1 domains of the BIRC3 moiety and the C-terminal region of MALT1 in the absence of any upstream stimulation, and such oligomerization bypasses the CBM complex in constitutively activating NF- κ B.

Second, oligomerization of the BIRC3-MALT1 fusion protein stimulates the proteolytic activity of the caspase-like domain of the MALT1 component. Normally BIRC3 interacts with the kinase MAP3K14, a potent activator of non-canonical NF- κ B signaling, causing its ubiquitination and degradation. The BIRC3-MALT1 fusion lacks the ubiquitin ligase domain of BIRC3 but still binds MAP3K14, which allows the MALT1 caspase-like domain to cleave MAP3K14 near its ami-

no terminus, creating a stable, active kinase that initiates NF- κ B signaling (2, 3). The NF- κ B pathway is also governed by a number of negative regulators. Among these TNFAIP3 can specifically inactivate several molecules that are critical for NF- κ B signaling by targeting these protein for proteasome degradation (Fig. 1). Inactivation of *TNFAIP3* by deletions or disrupting mutations is recurrently associated with EMZL and might be involved in promoting NF- κ B signaling in translocation-negative EMZL (3).

NOTCH signaling and splenic marginal zone lymphoma

Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) is an indolent tumor arising in the spleen and accounting for ~2% of NHL. Epidemiological and molecular evidence point to protracted antigenic stimulation by microbial pathogens or auto-antigens as a mechanism of SMZL initiation/promotion. Indeed, SMZL development is associated with HCV infection in ~15%-20% of cases (1). The contribution of antigen stimulation to SMZL pathogenesis is also suggested by the highly restricted immunoglobulin gene repertoire, including selective usage of the immunoglobulin heavy variable *1-2*04* allele in ~20-30% of SMZL and by the stereotyped B-cell receptor in an additional ~10% of cases (4).

SMZL transcriptional signature is characterized by constitutively deregulation of NF- κ B and NOTCH signaling. The underlying bases of the SMZL transcriptional program are genetic alterations predominantly involving signaling pathways that regulate the physiological marginal zone (MZ) development, including NOTCH signaling, NF- κ B signaling, BCR signaling, and TLR signaling. Thus, the finding that ~60% of SMZL cases display the alternative deregulation of these pathways suggests that a major component of SMZL pathogenesis is the constitutive activation of signals normally deputed to the differentiation and homing of B-cells into the splenic MZ (5).

The NOTCH pathway, especially when engaged by NOTCH2, represent a master regulator of MZ differentiation in normal B-cells, and, consistently, is the most frequently mutated pathway in SMZL, with *NOTCH2* mutations representing the genetic hallmark of this lymphoma type (6). The NOTCH receptor genes encode a family of heterodimeric transmembrane proteins (NOTCH1 to NOTCH4) that function as ligand-activated transcription factors. When the NOTCH receptors interact with their ligands through the extracellular subunit, two consecutive proteolytic cleavages of the NOTCH proteins are initiated and lead to pathway activation (Fig. 2). Upon activation, the cleaved intracellular portion of the NOTCH receptors translocate into the nucleus where they form a complex with the RBPJ transcription factor. In the absence of NOTCH signaling, RBPJ binds DNA in a sequence-specific manner and acts as a repressor of transcription. In the presence of NOTCH signaling, displacement of co-repressors bound to RBPJ by the active intracellular NOTCH allows the recruitment of co-activators, such as MAML1 and MAML2, to create an activation complex and to modify the expression of a number of target genes, including NF- κ B signaling components (6). The most prominent mechanism of NOTCH signal suppression is operated through its PEST

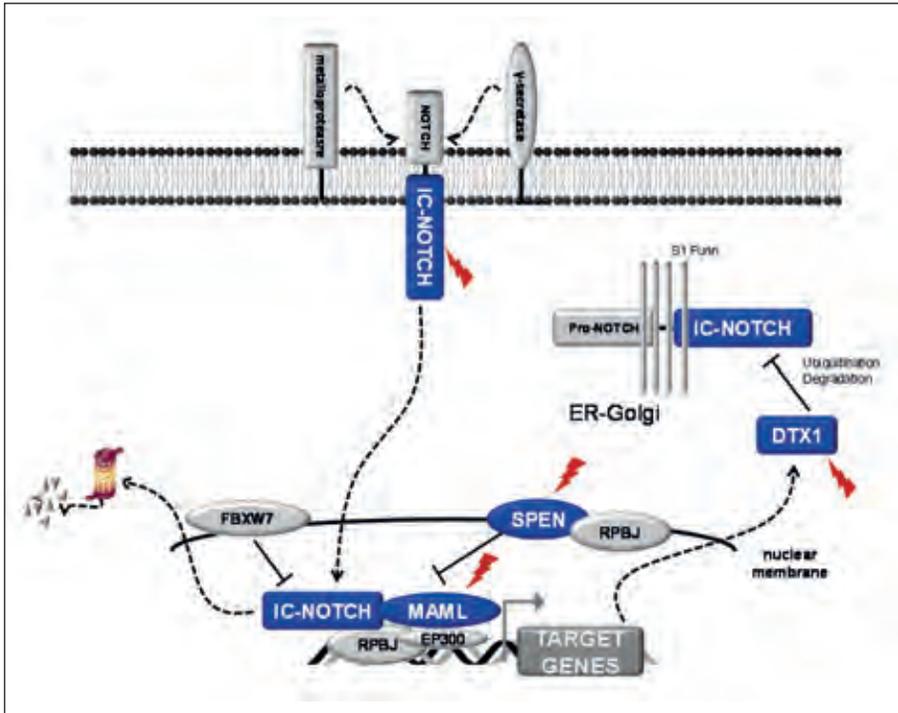


Fig. 2 - NOTCH signaling pathway. Genes harboring somatic lesions in extranodal B-cell tumors are highlighted in blue and marked by an arrow.

domain. The PEST domain of activated NOTCH is recognized by the FBXW7 ubiquitin protein ligase that terminates NOTCH signaling by directing NOTCH towards proteasomal degradation. Other negative regulators of NOTCH signaling include SPEN and DTX1. SPEN represses NOTCH signaling by competing with the active intracellular NOTCH for binding to RBPJ. DTX1 represses NOTCH signaling by binding the NOTCH family proteins and inhibiting their recruitment of transcription coactivators (6).

Genes of the NOTCH pathway are mutated in ~40% of SMZL (Fig. 2) (5). *NOTCH2* shows recurrent mutations in ~20-25% SMZL, establishing *NOTCH2* as the most frequently mutated gene in SMZL. *NOTCH1*, a paralog of *NOTCH2*, is also mutated in additional ~5% SMZL. *NOTCH2* and *NOTCH1* mutations in SMZL are selected to truncate the PEST domain of the protein, thus causing impaired degradation of the NOTCH2 and NOTH1 proteins and, as a consequence, sustained NOTCH signaling. In addition to *NOTCH2* and *NOTCH1*, other genes involved in NOTCH signaling and known to be relevant for normal MZ B-cell differentiation are affected by genomic lesions in SMZL, including *SPEN*, *DTX1* and *MAML2*. *SPEN* physiologically acts in the immune system as a negative regulator of B-lymphocyte differentiation into MZ B-cells by counteracting NOTCH activation. *SPEN* mutations occur in ~5% SMZL, are mostly represented by inactivat-

ing lesions that truncate the C-terminal domain of the protein, which is involved in the interaction between SPEN and RBPJ, and is required for NOTCH signaling inhibition. *DTX1* and *MAML2* mutations occur in ~2% SMZL (5).

NF- κ B activation, which is physiologically required to reprogram mature B-cells towards the MZ, is driven in SMZL by genetic lesions targeting a few key regulators of the non-canonical NF- κ B signaling (*BIRC3*, *TRAF3*, *MAP3K14*) in ~25% of cases (7). In normal B-cells, the non-canonical NF- κ B pathway is engaged by CD40 and BAFF receptors. Upon receptor binding, the TRAF3/MAP3K14-TRAF2/BIRC3 negative regulatory complex of non-canonical NF- κ B signaling is disrupted, allowing the cytoplasmic release and stabilization of MAP3K14, the central activating kinase of non-canonical NF- κ B signaling (Fig. 1) (6). *BIRC3* is recurrently disrupted by mutations, deletions or a combination of both in ~10% SMZL (7). *BIRC3* inactivating mutations cause the truncation of the C-terminal RING domain of the BIRC3 protein, whose E3 ubiquitin ligase activity is required to prime MAP3K14 towards proteasomal degradation. *TRAF3*, another component of the TRAF3/MAP3K14-TRAF2/BIRC3 negative regulatory complex of non-canonical signaling, is targeted in ~5% SMZL. *TRAF3* inactivating mutations cause the elimination of the C-terminal MATH domain of the protein that provides the docking site for MAP3K14, and is required for MAP3K14 recruitment to BIRC3 degradation.

On these bases, the functional consequence of *BIRC3* and *TRAF3* mutations in SMZL is MAP3K14 stabilization in the cytoplasm and the constitutive activation of non-canonical NF- κ B signaling.⁷ The identification of *BIRC3* inactivating mutations in SMZL points to *BIRC3* disruption as a common mechanism across MZ B-cell lymphomagenesis. In fact, disruption of the *BIRC3* RING domain, that in SMZL is produced by inactivating mutations, in EMZL is caused by t(11;18) leading to the formation of the BIRC3-MALT1 fusion protein that lacks the RING domain of BIRC3. In addition to genes specifically attributed to the NF- κ B pathway, mutations also affect *CARD11* (7% of SMZL) and *MYD88* (5% of SMZL), which, among their many functions, act as positive regulators of NF- κ B in signaling from the BCR and TLR (Fig. 1). Overall, mutations of positive and negative NF- κ B regulators accounted for ~30% SMZL cases, implicating activation of NF- κ B as the second major contributor to the pathogenesis of this disease after NOTCH deregulation (7).

JAK2 pathway and immune escape in primary mediastinal large B-cell lymphoma

Primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBL) is an aggressive tumor arising in the mediastinum from putative thymic B-cells and accounting for ~4% of NHL (1). PMBL cells must avoid immune surveillance imposed by thymic microenvironment. Consequently, under the selective pressure of thymic T cells, PMBL cells accumulate genetic lesions to prevent T cell recognition by blocking T cell activation and/or by impairing MHC class II expression. On these bases, immune escape is the mainstay of PMBL cell survival.

PMBL has a unique transcriptional signature characterized by constitutively activated JAK2. Consistently, cell line models of PMBL die when the JAK2 tyrosine kinase is genetically or pharmacologically inhibited, suggesting that PMBL signature and survival stem from the action of JAK2 (8). The underlying genetic basis for these observations is the recurrent amplification involving *JAK2* on chromosome band 9p24 seen in 50-70% of PMBL and representing the genetic hallmark of this lymphoma type (8). Another mechanism of JAK2 activation in PMBL is the disruption by deletions or inactivating mutations of *SOCS1*, a suppressor of JAK signaling. *SOCS1* inactivation co-occur with *JAK2* amplification in a fraction of PMBL and the cooperation between these two lesions in PMBL contributes to JAK2 stabilization in its constitutively phosphorylated and active form (8).

The minimally amplified region at 9p24 in PMBL includes, beside *JAK2*, also *JMJD2C*. *JAK2* and *JMJD2C* are coordinately overexpressed in PMBL and function in concert to epigenetically modify the PD-L1 and PD-L2 genomic loci, which encodes inhibitors of T-cell response essential for the malignant PMBL clone to escape immune surveillance of the thymus microenvironment (Fig. 3) (8).

Indeed, heterochromatin formation and gene silencing is associated with recruitment of HP1-alpha, which binds to the histone H3 at the unphosphorylated tyrosine 41 (H3Y41) and at the heterochromatin mark H3K9me3. Activated JAK2 di-

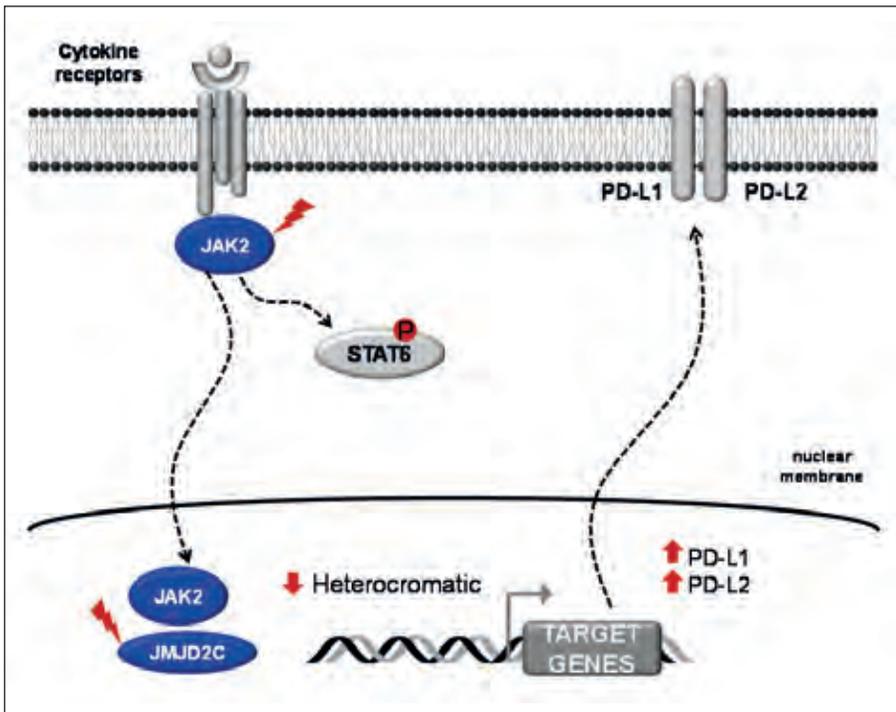


Fig. 3 - JAK2 signaling pathways. Genes harboring somatic lesions in extranodal B-cell tumors are highlighted in blue and marked by an arrow.

rectly phosphorylates the histone H3 at H3Y41, leading to displacement of HP1-alpha from chromatin and increased gene transcription. JMJD2C is a chromatin-modifying enzyme that demethylates trimethylated lysine 9 of the histone H3 tail (H3K9me3), thereby reducing heterochromatin formation. Thus, JAK2-mediated phosphorylation of H3Y41 and JMJD2C-mediated demethylation of H3K9me3 synergize in blocking HP1-alpha recruitment, reduce heterochromatin formation and positively regulate the expression of hundreds of genes in PMBL, including PD-L1 and PD-L2 (8).

Translocations involving *CIITA*, a transactivator of MHC class II genes, occur in ~40% of PMBL and represent a second mechanism of immune escape of this lymphoma. *CIITA* translocations invariably fuse the N terminus of *CIITA* in frame with a variety of other genes. As a result, one copy of *CIITA* is inactivated, and the fusion protein can also act in a dominant-negative manner to extinguish MHC class II expression, thereby limiting the ability of the tumor cells to interact with T cells. In some cases of PMBL, *CIITA* is fused to PD-L1 or PD-L2. The resultant fusion protein is displayed on the cell surface and functionally impairs T cell activation (8).

NF- κ B pathway in diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system

Diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system (CNS-DLBCL) is an aggressive tumor arising in the central nervous system and accounting for ~1% of NHL (1). Consistent with its predominant activated B-cell like (ABC) phenotype, CNS-DLBCL rely on constitutive NF- κ B activation, which is one of the main downstream effectors of BCR and toll-like receptor (TLR) signaling. Various alternative genetic mechanisms of NF- κ B activation have been identified in CNS-DLBCL affecting the TLR and BCR pathways.

Mutations of *MYD88*, the central integrator of TLR signaling, is the genetic hallmark of CNS-DLBCL, where they occur in ~50% of cases (9). In B-cells, TLRs are central to the BCR-independent response to antigens by sensing a variety of pathogen-associated molecular patterns derived from bacteria, viruses, and fungi. Upon ligand binding, TLRs aggregate and initiate intracellular signaling by engaging various cytoplasmic adaptors, including MYD88. After stimulation of the TLRs, MYD88 is recruited to the activated receptor complex as a homodimer and forms complexes with IRAK4, leading to activation of IRAK1 and IRAK2. TRAF6 is then activated by IRAK1, and catalyzes polyubiquitination of the MAP3K7 kinase, which in turns phosphorylates IKKB and triggers activation of NF- κ B (Fig. 1) (9). The MYD88 protein consists of an N-terminal death domain, a linker region and a C-terminal TIR domain, which may mediate contact with TLR TIR domains upon signaling activation. Almost all *MYD88* mutations in CNS-DLBCL affect the TIR domain. Although many different *MYD88* mutations exist, the most prevalent is the L265P missense substitution (9). The L265P mutation, as well as other *MYD88* mutations, cluster in the evolutionary conserved B-B loop of the TIR domain, suggesting that they are selected to change the struc-

ture of MYD88 to allow spontaneous and activation-independent interaction with IRAK4 and IRAK1. Consistently, B-cell tumors harboring *MYD88* mutations show constitutive and deregulated nucleation of a signaling complex that includes phosphorylated IRAK1 and leads to active NF- κ B (9).

In ~20% CNS-DLBCL, the constitutive NF- κ B activity is sustained by mutations affecting *CD79B*, a component of the BCR complex (3). In normal B-cells, when IgM is ligated by an antigen, tyrosine residues in the cytoplasmic ITAM portion of CD79B are phosphorylated by the Src family kinases, including LYN. The tyrosine kinase SYK is activated by binding to the phosphorylated ITAM domains of CD79B, triggering a signaling cascade that involves BTK. BTK forms a complex with the adapter BLNK and PLC-gamma-2. PLC-gamma-2 then produces the second messenger diacyl glycerol, which activates PKC-beta, leading to CARD11 phosphorylation and NF- κ B signaling (Fig. 1) (3). *CD79B* mutations mostly consist of non-synonymous missense substitutions that change the ITAM N-terminal tyrosine of CD79B. *CD79B* mutations result into two distinct functional effects, both able to enhance BCR-mediated NF- κ B signaling. First, mutated *CD79B* render the BCR resistant to negative regulation by the LYN kinase. Second, *CD79A* and *CD79B* mutants enhance surface BCR expression due to diminished BCR internalization, conceivably prolonging BCR-dependent signaling upon stimulation (3). In ~15% CNS-DLBCL, the constitutive NF- κ B activity is sustained by mutations affecting *CARD11*, a key component of the CBM complex that activates NF- κ B upon BCR engagement (3). *CARD11* encodes a multidomain signaling scaffold protein consisting of an N-terminal CARD motif, a coiled-coil domain, an inhibitory domain, and a C-terminal MAGUK domain that contains multiple protein-protein interaction sub-domains. *CARD11* mutations in CNS-DLBCL exclusively affect the coiled-coil domain of the protein, and disrupt the association of the coiled-coil domain with the inhibitory domain that, in resting conditions, keeps CARD11 inactive in the basal state. As a result, mutations spontaneously convert CARD11 into an active signaling scaffold in a manner that is independent of BCR engagement. In this way, mutations promote spontaneous CARD11 multimerization and association with other components of the CBM complex as BCL10 and MALT1, thus leading to IKKB activation and NF- κ B program deregulation (3).

A second genetic hallmark of CNS-DLBCL is the recurrent loss of chromosome 6p21.32 involving the *HLA* locus, that is observed in ~80% of cases (1). This feature seems specific to DLBCL of immune-privileged sites, including CNS-DLBCL and testicular DLBCL, and might represent a mechanism of immune escape from T cells via the down-regulation of HLA class II expression, which is a phenotypic features uniformly observed in virtually all CNS-DLBCL.

Targeting the molecular pathways of B-cell lymphopoiesis

New insights into the genes that contribute to cellular transformation in extranodal NHL provide molecular clues useful for addressing a number of unmet clinical needs in the management of these tumors.

Genetic lesions that are highly recurrent and/or specific for a given clinico-pathologic entity may behave as biomarkers for disease diagnosis and classification improvement. Because of the absence of disease defining clinico-pathologic markers, the diagnosis of SMZL may be only achieved after excluding other mimickers. These uncertainties affect the daily clinical practice by making the diagnosis of this tumor laborious and not easily reproducible. In this regard, *NOTCH2* mutations, which are enriched in SMZL, while rare or absent in other mimicking conditions, are increasingly implemented as biomarkers for improving disease recognition and classification.

The identification and functional characterization of the molecular bases of deregulated NF- κ B, TLR, NOTCH and JAK-STAT signaling provides the preclinical rationale for therapeutic inhibition of these pathways in extranodal NHL. The NF- κ B pathway represents a therapeutic target in many extranodal lymphoid malignancies (i.e. EMZL, SMZL, CNS-DLBCL) in which abnormalities affecting NF- κ B genes cause tumor cells to be addicted to NF- κ B. Inhibition of IRAK4 downstream of MYD88 effectively blocks NF- κ B activation and survival of B-cell tumors harboring *MYD88* mutations, thus representing an ideal target for CNS-DLBCL. The consistent identification of deregulated NOTCH signaling in SMZL provides the preclinical rationale for therapeutic inhibition of the NOTCH pathway in this tumor with antagonists such as inhibitory antibodies and gamma-secretase inhibitors. The notion that PMBL relies on JAK2 constitutive activation provides a strong rationale for the clinical evaluation of JAK2 inhibitors in PMBL. Finally, the notion that PMBL and CNS-DLBCL accumulate genetic lesions to prevent T-cell recognition and escape the immune system provides the rationale for the application of anti-CD19/CD3 bi-specific antibodies in these tumors to re-attract T-lymphocytes to eliminate lymphoma cells.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC).
2. Du MQ. MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor- κ B activation. *Histopathology*. 2011; 58: 26-38.
3. Staudt LM. Oncogenic activation of NF- κ B. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2: a000109.
4. Zibellini S, Capello D, Forconi F, Marcatili P, Rossi D, Rattotti S, et. al. Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica*. 2010; 95: 1792-1796.
5. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Brusca A, Rasi S, Spina V, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med*. 2012; 209: 1537-1551.
6. Rossi D, Ciardullo C, Gaidano G. Genetic aberrations of signaling pathways

- in lymphomagenesis: revelations from next generation sequencing studies. *Semin Cancer Biol.* 2013 May 8.
7. Arcaini L, Rossi D. Nuclear factor- κ B dysregulation in splenic marginal zone lymphoma: new therapeutic opportunities. *Haematologica.* 2012; 97: 638-640.
 8. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med.* 2013; 368: 161-170.
 9. Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5: a011247.

Dissecting the antibody response to pathogens and self antigens

Antonio Lanzavecchia

Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona and Institute of Microbiology, ETH Zurich

Summary

Memory B lymphocytes and long-lived plasma cells represent a repository of the antigenic experience of an individual. By analyzing the specificity and function of these cells we can gain insights into the human immune response to pathogens and vaccines, identify correlates of protection, and isolate neutralizing antibodies and protective T cells.

To interrogate human memory B cell and plasma cell repertoires we developed culture- based high-throughput methods that are used to isolate, with high efficiency, human monoclonal antibodies of distinctive specificities. Unusually potent neutralizing antibodies against human cytomegalovirus were isolated from infected donors and used to identify the viral ligands and to design an experimental vaccine.

Antibodies of exceptional breadth were also isolated, such as a pan-influenza A neutralizing antibody and an antibody that neutralizes both respiratory syncytial virus (RSV) and metapneumovirus (MPV). By targeting conserved structures, these broadly neutralizing antibodies are less prone to select escape mutants and are therefore promising candidates for prophylaxis and therapy of infections as well as tools for the design of improved subunit vaccines.

We also isolated and characterized autoantibodies from patients with pemphigus, pulmonary alveolar proteinosis and other autoimmune diseases. By reverting the antibodies to the germline we investigate the role of somatic mutations in the generation of broadly neutralizing antibodies and autoantibodies.

References

1. Corti D, Lanzavecchia A. Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31: 705-742.
2. Corti D, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Perez L, Agatic G, et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature.* 2013, 501: 439-443.

3. Corti D, Voss J, Gamblin SJ, Codoni G, Macagno A, Jarrossay et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*. 2011; 333: 850-856.
4. Macagno A, Bernasconi NL, Vanzetta F, Dander E, Sarasini A, et al. Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J Virol*. 2010; 84: 1005-1013.
5. Di Zenzo G, Di Lullo G, Corti D, Calabresi V, Sinistro A, et al. Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. *J Clin Invest*. 2012; 122: 3781-3790.

**TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO:
QUESITI ATTUALI DEL PRIMO ESEMPIO
DI TERAPIA RIGENERATIVA**

Trapianto aploidentico: T-depletato o T-repleto?

Franco Aversa

O.C. di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (CSE) è ancora oggi la migliore terapia per pazienti con leucemia acuta ad alto rischio di recidiva. I risultati dipendono dalla fase di malattia e di conseguenza la procedura trapiantologica dovrebbe essere perseguita tempestivamente prima di una ripresa/progressione della malattia anche in coloro che non dispongano di un donatore HLA-identico nella famiglia. Ne consegue che dopo un iniziale e breve tentativo di reperire una valida unità di sangue cordonale o un donatore non-consanguineo fenotipicamente identico, l'unica possibile opzione rimane quella del trapianto da un familiare incompatibile (genitori, figli, fratelli, cugini, ecc), virtualmente disponibile per tutti i pazienti in attesa di trapianto.

Ostacoli al trapianto aploidentico

Per molti anni, i numerosi tentativi di utilizzare, in pazienti leucemici, il midollo osseo di donatori solo parzialmente compatibili (aploidentici, 3-loci incompatibili) sono stati largamente insoddisfacenti a causa dell'elevata incidenza di graft-versus-host disease (GvHD) dopo infusione di midollo osseo non manipolato o di rigetti dopo infusione di cellule midollare preventivamente depletate in T linfociti proprio allo scopo di prevenire la GVHD (1). Il rigetto del midollo incompatibile T-depletato è stato per anni ascritto all'inadeguatezza dei convenzionali regimi di condizionamento nell'immunosoppressione del paziente. Purtroppo, nonostante l'impiego di regimi più aggressivi, il problema del rigetto del trapianto incompatibile T-depletato è rimasto ostacolo insormontabile fino alla dimostrazione, nel modello animale, che l'infusione di una megadose di cellule midollari (10 volte superiore al convenzionale) T-depletate consentiva l'attecchimento e la prevenzione della GvHD (1, 2). Nel 1993, è stato possibile trasferire con successo questi concetti nella pratica clinica e quindi, negli anni successivi, migliorare le metodiche di T-deplezione adeguandole alla manipolazione di grandi volumi di CSE periferiche e disegnare regimi di condizionamento immuno-mieloablativi a tossicità ridotta (3-6). Per quanto concerne la T-deplezione, l'iniziale storica separazione con soybean agglutininina ed E-rosettazione con emazie di montone

ha lasciato il posto all'immunoselezione positiva delle cellule CD34⁺ del sangue periferico che, in poche ore di lavoro e con un sistema completamente automatico, consente di ottenere un inoculo ideale con basso numero di T linfociti (<5x10⁴/kg) e una megadose di cellule CD34⁺ (≥10x10⁶/kg). Con la finalità di potenziare l'immunosoppressione pre-trapianto senza aumentare la tossicità extra-ematologica di un regime di condizionamento basato sulla total body irradiation (TBI), nel 1995 la ciclofosfamide è stata sostituita con la fludarabina che, in modelli murini, si era rivelata immunosoppressiva tanto quanto la ciclofosfamide ma con maggiore tollerabilità (5, 6).

Sulla base delle preliminari esperienze del gruppo di Perugia, il trapianto aploidentico T-depletato è stato progressivamente adottato anche da altri centri che hanno confermato l'elevato grado di attecchimento, la prevenzione della GvHD e una sopravvivenza non diversa da quella riportata in simili categorie di rischio dopo trapianto da donatore non consanguineo o da cordone (7). Nel corso degli ultimi dieci anni si è assistito a un rapido e progressivo incremento sia nei numeri di pazienti trapiantati che di centri con interesse per programmi di trapianto aploidentico. In alcuni centri, la ricerca si è concentrata maggiormente nell'elaborazione di protocolli di condizionamento e di programmi di prevenzione farmacologica della GvHD, in altri è stata preferita la manipolazione ex vivo dell'inoculo allo scopo di garantire attecchimento e abrogazione della GvHD senza la necessità di ulteriore immuno-soppressione post-trapianto. Condizionamenti mieloablativi o a ridotta intensità seguiti dall'infusione di megadosi di cellule staminali ematopoietiche (CSE) periferiche immunoselezionate (in positivo o in negativo) o di dosi standard di CSE midollari o periferiche non sottoposte ad alcuna manipolazione sono oggi diffusamente impiegati con analoga probabilità di attecchimento, prevenzione della GvHD e sopravvivenza. In realtà, le due strategie sono profondamente differenti. Innanzitutto, la praticità e la riproducibilità di quella basata sull'infusione di CSE non manipolate contrasta con la relativa complessità e la necessità di un laboratorio dedicato di quelle basate sulla manipolazione ex vivo delle CSE. Altre importanti differenze tra le due strategie derivano dalla prevenzione della GvHD. Dall'esperienza clinica del trapianto aploidentico T-depletato privo di una profilassi farmacologica della GvHD post-trapianto sono derivate nuove acquisizioni biologiche, quali ad esempio l'alloreattività donatore-vs-ricevente NK-mediata, che rappresenta oggi criterio di selezione del donatore in virtù di uno specifico e potente effetto anti-leucemico (8-10). Dalle più recenti esperienze cliniche del trapianto non manipolato sono emerse conferme circa la capacità di controllare l'alloreattività T cellulare attraverso l'impiego della rapamicina o della ciclofosfamide post-trapianto (11, 12). In particolare, quest'ultima modalità si è affermata per la semplicità dello schema trapianto e per la dimostrazione della non tossicità sulle CSE appena trapiantate per la loro elevata espressione dell'enzima detossificante, aldeide-deidrogenasi (13).

Il trapianto T-depletato continua a rappresentare un modello di ricerca basato sulla comprensione di fenomeni biologici per ottimizzare il rapporto tra assenza di GvHD e ricostituzione dell'immunità anti-infettiva e anti-tumorale. Numerosi studi sono in corso per rispondere a queste esigenze. Il trapianto non manipolato è

prevalentemente un modello clinico che esplora strategie di controllo della GvHD molto differenti tra loro per quantità e qualità dei farmaci impiegati e regimi di condizionamento a diversa intensità per il controllo della tossicità e della malattia neoplastica di base (14-16).

Acquisizioni biologiche e cliniche

Dalla lunga esperienza di trapianto aploidentico basato sull'infusione di una megadose di cellule CD34⁺ dopo un condizionamento ablativo sono emerse importanti considerazioni:

- a) attecchimento nella quasi totalità dei casi in virtù di un'efficace prevenzione del rigetto in parte basato sull'intensità immuno-mielo-ablativa del regime di condizionamento e in parte sul contributo immunologico delle stesse cellule CD34⁺ in grado di contrastare i precursori T citotossici del ricevente diretti contro gli antigeni HLA delle CSE (effetto "veto") (1, 3);
- b) potente effetto antileucemico in assenza di GvHD esercitato dall'alloreattività donatore-vs-ricevente delle cellule NK (rischio di recidiva in pazienti con leucemia mieloide acuta <5%) (10);
- c) sopravvivenza libera da eventi, a circa 20 anni dal trapianto, in circa il 40% dei pazienti trapiantati non in fase avanzata di malattia e che, in virtù dell'assenza della GvHD cronica, possono godere di un'ottima qualità di vita (5-7);
- d) mortalità trapianto-correlata (TRM) sostenuta principalmente da infezioni per il significativo ritardo nella ricostituzione immunologica post-trapianto dovuto all'effetto combinato della profonda T deplezione sia *ex vivo* (selezione positiva delle CD34⁺) che *in vivo* (ATG nel regime di condizionamento) (5, 6).

Nel tentativo di ridurre la TRM dopo selezione positiva delle CD34⁺, sono state esplorate diverse strategie volte ad accelerare la ricostituzione immunologica e basate essenzialmente sull'infusione di linfociti T del donatore senza peraltro reintrodurre il rischio della GvHD. A tal fine sono stati impiegati linfociti T a repertorio ristretto patogeno-specifici (17) o linfociti a repertorio ampio ma depletati della componente alloreattiva (18) o ingegnerizzati con geni suicidi (19). La complessità di queste strategie ha portato i ricercatori a esplorare tecniche alternative, praticabili in tutti i casi e utilizzabili nel momento stesso del trapianto.

Studi clinici in corso

Attualmente sono in corso di avanzata sperimentazione due procedure:

- a) co-infusione di T linfociti alloreattivi e cellule T-regolatorie (20, 21);
- b) selezione selettiva dei T linfociti (TCR- $\alpha\beta$) mediante anticorpo biotinilato anti-TCR- $\alpha\beta$ e anticorpo antibiotina coniugato con biglie magnetiche e B-deplezione con anticorpo anti-CD19 (22).

Questo tipo di deplezione selettiva garantisce un inoculo non solo ricco in cellule CD34⁺ ma anche in altre cellule accessorie utili per l'attecchimento, NK e linfociti T $\gamma\delta$ utili per la risposta anti-infettiva e anti-leucemica senza rischio di GvHD. Le preliminari esperienze in campo pediatrico hanno confermato come questo

tipo di inoculo sia in grado di garantire attecchimento, prevenzione di GvHD e rapida ed efficiente ricostituzione immunologica. Analoghi incoraggianti risultati sono stati riportati anche nel più complicato settore del trapianto adulto (23). Dopo un condizionamento solo chemioterapico (tabella 2), 16 pazienti adulti (età mediana di 45 anni con range 18-65) con leucemia acuta (9 in CR \geq I, 7 in recidiva chemioresistente) hanno ricevuto un trapianto mediamente costituito da $>10 \times 10^6$ /kg CD34⁺, 1.1×10^4 /kg T $\alpha\beta$, 5.3×10^6 /kg T $\gamma\delta$, 30×10^6 /kg NK e 8×10^4 /kg CD19⁺. Attecchimento full-donor è stato raggiunto in tutti (in un caso dopo una seconda infusione) con mediana di ricostituzione dei neutrofili di 11 giorni. GvHD acuta di grado III-IV si è verificata in un solo caso che aveva ricevuto la dose più elevata di T $\alpha\beta$ (5×10^5 /kg). La ricostituzione immunitaria è stata caratterizzata da una rapida crescita dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺ che hanno raggiunto e superato la soglia delle 200 cellule/ μ L a una mediana di 90 giorni dal trapianto con efficace prevenzione delle infezioni da CMV e funghi. In due pazienti è stato possibile documentare la comparsa precoce ($<$ giorno 60) e di cloni linfocitari CD8⁺ CMV-specifici protettivi. Due pazienti sono deceduti per cause non ematologiche (1 GVHD, 1 insufficienza cardiaca), due per recidiva di malattia. Ad una mediana di 5 mesi, 7 pazienti sopravvivono (7/9 in CR e 0/7 in recidiva al trapianto) liberi da malattia. L'esperienza con la selezione negativa, seppur limitata nel numero di pazienti e nel follow-up, conferma i progressi nel campo della ricostituzione immunitaria e giustifica il proseguimento nell'impiego clinico della T deplezione selettiva per il trapianto aploidentico.

Conclusioni

Pazienti con leucemia ad alto rischio che ricevono un trapianto T-depletato da familiare aploidentico hanno un basso rischio di rigetto, di GvHD e anche di recidiva leucemica se trapiantati non in fase terminale di recidiva chemioresistente. L'assenza di GvHD, in particolare cronica, garantisce una qualità di vita normale. La sopravvivenza è sovrapponibile a quella riportata per analoghe categorie di pazienti dopo trapianto da donatore volontario o da cordone. Pazienti trapiantati in fase precoce beneficiano di uno specifico effetto GvL dissociato dalla GvHD. L'interesse per il trapianto T-repleto è stato riaccessato dalle più recenti possibilità di prevebire la GvHD, in particolare con l'introduzione della ciclofosfamida post-trapianto. Di conseguenza, la strategia di considerare il trapianto aploidentico come ultima possibilità terapeutica deve essere sottoposta a revisione critica. Prolungare la ricerca di un donatore compatibile non consanguineo per più di 2-3 mesi in un paziente ad alto rischio di recidiva può avere esito fatale. In queste circostanze dovrebbe essere preferito, per l'immediata disponibilità, un donatore familiare aploidentico.

Bibliografia

1. Reisner Y, Hagin D, Martelli MF. Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood*. 2011; 118 (23): 6006-6017.

2. Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with a megadose T-cell-depleted graft: harnessing natural and adaptive immunity. *Sem Oncol.* 2012; 39: 643-652.
3. Bachar-Lustig E, Rachamim N, Li HW, Lan F, Reisner Y. Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. *Nat Med.* 1995; 1: 1268-1273.
4. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood.* 1994; 84: 3948-3955.
5. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1186-1193.
6. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. Full-haplotype mismatched hematopoietic stem cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk or relapse. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 3447-3454.
7. Ciceri F, Labopin M, Aversa F, et al. Acute Leukemia Working Party (ALWP) of European Blood and Marrow Transplant (EBMT) Group. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. *Blood.* 2008; 112 (9): 3574-3581.
8. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295: 2097-100.
9. Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev.* 2008; 224: 58-69.
10. Velardi A, Ruggeri L, Mancusi A, Aversa F, Christiansen FT. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21 (5): 525-530.
11. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, post-transplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14 (6): 641-650.
12. Leo Luznik, Paul V. O'Donnell, Ephraim J. Fuchs. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Seminars in Oncology.* 2012; 39 (6): 683-693.
13. Christopher G. Kanakry, Sudipto Ganguly, Marianna Zahurak, et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to post-transplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med.* 2013; 5 (211): 211ra157.
14. Huang X, Liu DH, Xu LP, et al. Treatment of acute leukemia with unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17 (6): 821-830.

15. Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, et al. Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies. *Blood*. 2013; 121 (5): 849-857.
16. Anna Maria Raiola, Alida Dominietto, Anna Ghiso, Carmen Di Grazia, et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013; 19: 117-122.
17. Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood*. 2005; 106: 4397-4406.
18. Perruccio K, Topini F, Tosti A, et al. Photodynamic purging of alloreactive T cells for adoptive immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 40 (1): 76-83.
19. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*. 1997; 276 (5319): 1719-1724.
20. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011; 117 (14): 3921-3928.
21. Massimo F. Martelli, Mauro Di Ianni, Loredana Ruggeri, et al. "Designed" grafts for HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Blood*. 2014; 123 (7): 967-973.
22. Handgretinger R, Lang P, Feuchtinger F, et al. Transplantation of TcR $\alpha\beta$ /CD19 depleted stem cells from haploidentical donors: robust engraftment and rapid immune reconstitution in children with high risk acute leukemia [abstract]. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2011; 118 (21). Abstract 1005.
23. Lucia Prezioso, Sabrina Bonomini, Chiara Lambertini, et al. Haploidentical stem cell transplantation after negative depletion of T cells expressing the $\alpha\beta$ chain of the t-cell receptor (TCR) for adults with hematological malignancies. *Blood*. 2013; 122: 4609 (abstract).

La ricerca del donatore alternativo per il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche: donatore non correlato, sangue di cordone ombelicale o donatore aploidentico?

William Arcese, Alessandra Picardi, Laura Cudillo, Gottardo De Angelis, Raffaella Cerretti

Trapianto Cellule Staminali, Policlinico Universitario "Tor Vergata", Roma

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (ASCT) rappresenta un'opzione terapeutica potenzialmente curativa per numerose patologie ematologiche. La disponibilità di un donatore familiare HLA compatibile, limitata a circa il 30% dei pazienti, rappresenta spesso un ostacolo alla realizzazione del trapianto. Negli ultimi decenni i significativi miglioramenti dei regimi di profilassi, di trattamento delle complicanze post-trapianto e delle terapie di supporto, insieme all'introduzione dei regimi di condizionamento a ridotta intensità, hanno contribuito sensibilmente ad estendere l'applicazione della procedura trapiantologica, la cui realizzabilità è stata inoltre potenziata grazie alla evoluzione della strategia di selezione del donatore. I progressi conseguiti nel trapianto da sangue di cordone ombelicale (Cord Blood, CB) (1) e da donatore aploidentico (2) hanno consentito di ottenere risultati paragonabili a quelli raggiunti con il trapianto da Donatore Volontario non Correlato (Volunteer Unrelated Donor, VUD), con il conseguente riconoscimento di queste fonti di cellule staminali ematopoietiche quali valide alternative per i pazienti privi di donatore familiare HLA compatibile. La probabilità per ogni paziente di ricevere il trapianto dipende pertanto essenzialmente dalla politica del Centro Trapianto finalizzata alla identificazione e selezione di un donatore alternativo. Questo tipo approccio allargato nella ricerca di un donatore alternativo supera i limiti della "randomizzazione genetica" basata sulla disponibilità del solo donatore familiare HLA compatibile.

Identificazione e selezione del donatore volontario non correlato

Nei Registri Internazionali dei donatori, progressivamente ampliatisi durante gli ultimi 20 anni, sono attualmente disponibili oltre 20 milioni di VUD. Comple-

sivamente, per circa il 60% dei pazienti originari dell'Europa Nord-Occidentale è possibile identificare un VUD con una compatibilità allelica 10/10, ma questa percentuale risulta estremamente ridotta qualora i pazienti esprimano una combinazione allelica non frequente o un aplotipo non comune, oppure appartengano ad una minoranza etnica. Una stima più precisa della probabilità di individuare un donatore Volontario compatibile nella fase preliminare della ricerca, con la possibilità immediata di classificare i pazienti nelle categorie ad alta o bassa probabilità, può migliorare la strategia terapeutica complessiva. Il Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) è in grado di fornire queste importanti informazioni attraverso uno specifico "matching program". Alla scelta del Donatore Volontario contribuiscono numerosi fattori, quali la sierologia per il CMV, il sesso, la compatibilità di gruppo ABO, l'età e il peso del donatore. Tuttavia il criterio che maggiormente condiziona la selezione è rappresentato dalla compatibilità HLA. Attualmente il gold standard è rappresentato dalla compatibilità allelica donatore/ricevente in alta risoluzione per i loci HLA-A, B, C, DRB1 e DQB1. Essendo tuttavia il livello di compatibilità 10/10 alleli non frequente, un livello di compatibilità $\geq 8/10$ è correntemente accettabile. Uno studio retrospettivo condotto dal NMDP su 1874 coppie di donatori/riceventi ha consentito di trarre le seguenti conclusioni:

- 1) le diversità per i loci HLA-A, -B, -C e DRB1 sono associate nella stessa misura ad aumentato rischio di GVHD e di mortalità, con evidenza di un ruolo rilevante del locus C di cui tener conto nella strategia di selezione del donatore;
- 2) la diversità in alta risoluzione a carico dei loci HLA-A e DRB1 è correlata con un aumentato rischio di mortalità;
- 3) la "transplant-related mortality" (TRM) è più elevata nei casi di incompatibilità determinata solo in bassa risoluzione;
- 4) il rischio di GVHD, rigetto e TRM aumenta con l'aumento del numero di loci non compatibili (3).

Le conclusioni dello studio impongono come indispensabile la tipizzazione donatore/ricevente in alta risoluzione. Le differenze a carico dei loci HLA-DQA1 e DPA1 non sembrano influenzare i risultati del trapianto, mentre il ruolo dei loci HLA-DPB1 e DQB1 rimane ad oggi controverso. In particolare gli alleli HLA-DPB1 sono stati classificati ad alto, intermedio e basso rischio in funzione della loro espressività immunologica (4). Nella condizione di incompatibilità a carico del DPB1, le diverse possibili combinazioni consentono di definire la coppia donatore/ricevente come permissiva o non permissiva nella direzione della reazione Graft-versus-Host (GvH) o della reazione Host-versus-Graft (HvG). Nonostante l'elevato polimorfismo allelico del locus HLA-DPB1, è consigliabile tenerne conto quando sono disponibili numerosi donatori. Il ruolo decisivo degli alleli Cw e DPB1 nel determinare gli effetti GVHD/GVL è stato recentemente confermato in una analisi retrospettiva condotta su una popolazione di 4643 pazienti, nella quale sono state identificate 10 combinazioni di incompatibilità (4 per Cw e 6 per DPB1), risultate essere significativamente correlate con un ridotto rischio di recidiva, rispettivamente $p < .003$ e $p < .002$ (5). Sebbene secondario rispetto al livello di compatibilità HLA, lo stato sierologico per il CMV della coppia donatore/ricevente è considerato un criterio rilevante nella strategia di scelta del donatore.

La sierologia negativa per il CMV, sia nel donatore sia nel ricevente, è correlata con il minore rischio di sviluppare l'infezione da CMV, mentre il più alto rischio di riattivazione del CMV è rappresentato dalla combinazione donatore negativo/ ricevente positivo. Relativamente all'età e al sesso del VUD, è preferibile il giovane maschio. Numerosi studi hanno dimostrato che il donatore di età superiore a 45 anni è associato ad un aumentato rischio di TRM e recidiva, mentre le donatrici sono in generale a rischio di sviluppare allo-immunizzazione dovuta a precedenti gravidanze e/o aborti. Poiché gli antigeni minori di istocompatibilità codificati dal cromosoma Y sono il bersaglio dei linfociti T delle donatrici, la combinazione donatore femmina/ricevente maschio è associata ad un incrementato rischio di insorgenza di GVHD cronica (66% vs 38%; $p=.02$) e ad una ridotta incidenza di recidiva (6% vs 23%; $p=.046$), rendendo pertanto preferibile la scelta del donatore maschio o, in seconda istanza, il donatore femmina con il minor numero di gravidanze. Quando possibile, dovrebbe essere scelta la combinazione donatore/ricevente con compatibilità ABO, oppure, in caso di incompatibilità dovrebbe essere preferita la minore rispetto alla condizione di incompatibilità maggiore. Infine si dovrebbe tener conto anche del paese di origine del donatore, preferendo quello più vicino al ricevente, con l'obiettivo di ridurre i tempi e i costi della ricerca e del trapianto.

Identificazione e selezione dell'unità di sangue di cordone ombelicale

Il numero di trapianti allogenici da CB non correlato è aumentato rapidamente nell'ultima decade, con un esteso utilizzo sia nella popolazione pediatrica che adulta. Il numero di CBU disponibili nel data base del BMDW si è accresciuto più di 10 volte dal 1998 e, ad oggi, è superiore alle 600.000 unità. I principali vantaggi del trapianto da CB sono rappresentati da:

- 1) facile e rapido approvvigionamento di unità criopreservate già dotate di estesa tipizzazione HLA e completamente caratterizzate per dose cellulare e profilo infettivo;
- 2) la presenza di linfociti T "naïve", che consente un maggior grado di disparità HLA donatore/ricevente, senza un significativo incremento della incidenza di GVHD;
- 3) estensione della possibilità di accesso al trapianto a favore di minoranze etniche, grazie ai meno stringenti criteri di compatibilità HLA richiesti.

La ridotta dose cellulare contenuta nelle CBU, con conseguente rischio di ritardo o fallimento dell'attecchimento, rappresenta invece il principale svantaggio a carico del trapianto da CB. La selezione delle CBU è determinata dalla compatibilità per l'HLA donatore/ricevente e dalla dose cellulare misurata prima della criopreservazione. Le raccomandazioni dell'EUROCORD prevedono la selezione di una CBU con grado di compatibilità con il ricevente $\geq 4/6$ loci HLA e con una dose cellulare/kg ricevente $\geq 2.5 \times 10^7$ /kg di cellule nucleate, e/o $\geq 1 \times 10^5$ /kg di cellule CD34+. Con la ricerca preliminare si ottiene una lista di CBU disponibili basata sui migliori criteri di compatibilità con il paziente e di dose cellulare. Di solito le CBU sono tipizzate a livello sierologico per gli antigeni HLA di classe I e a livello

allelico per il DRB1. Le unità già tipizzate in alta risoluzione per il DRB1 sono al primo posto della lista. In uno studio condotto su 525 pazienti, dei quali il 35% non Europei, è stata valutata la disponibilità di un VUD e di CBU per i pazienti di origine Europea e quelli di origine non-Europea per i quali era stata avviata una ricerca simultanea per entrambi le fonti di cellule staminali: l'identificazione di una CBU incrementa la probabilità di accesso al trapianto, in particolare per i pazienti di origine non europea, ma anche per quelli appartenenti a minoranze etniche. In un recente studio che ha valutato i requisiti di un Registro Nazionale delle CBU, è stato calcolato che una Banca con 50000 CBU riesce a fornire almeno un donatore con livello di compatibilità di 4/6, 5/6 o 6/6 loci dell'HLA rispettivamente nel 98%, 80% e 34% dei pazienti dell'Europa Nord-Occidentale. L'estensione a 150.000 unità aumenta leggermente la probabilità di individuare una CBU in questa popolazione, mentre per i pazienti di origine non-Europea la probabilità di individuare almeno un donatore 4, 5 o 6/6 aumenta rispettivamente dal 96% al 99%, dal 49.7% al 77% e dal 8.9% al 17% (6). La selezione di CBU è basata essenzialmente sulla compatibilità per il sistema HLA e sulla dose cellulare determinata pre-criopreservazione. Nell'ambito del trapianto da CBU sono numerosi gli studi che hanno dimostrato una correlazione diretta tra il numero di cellule nucleate e di CD34+ pre congelamento e l'attecchimento di neutrofili e piastrine, o tra dose cellulare e sopravvivenza. In particolare, sia nei pazienti adulti che pediatrici la dose cellulare minima raccomandata per assicurare l'attecchimento è risultata $\geq 2.5 \times 10^7$ /kg di cellule nucleate totali e $\geq 1.7 \times 10^5$ /kg di CD34+. Per la selezione di una CBU le raccomandazioni attuali dell'Eurocord prevedono una compatibilità almeno di 4 su 6 loci HLA con tipizzazione a livello sierologico per la I Classe e ad alta risoluzione per gli antigeni DRB1. Ad oggi, la compatibilità per il locus DQ non risulterebbe rilevante, mentre il ruolo della differenza sul locus C è controverso (7). In termini di risultati, l'incompatibilità per 0-1 loci è più vantaggiosa di quella su 2 loci e una differenza per l'HLA di I classe è preferibile ad una sulla II. Tuttavia 1 o 2 differenze HLA sono correlate con un ridotto rischio di recidiva dopo trapianto, che inoltre, analogamente a quanto osservato nel trapianto aploidentico T-depleto, sembra essere correlato anche alle caratteristiche di allorreattività delle cellule NK del donatore. In caso di doppio trapianto di CBU, ciascuna unità dovrebbe attestarsi su una dose cellulare minima di 1.5×10^7 /kg del ricevente di cellule nucleate totali e le due unità dovrebbero condividere tra loro e con il paziente almeno 4 di 6 loci HLA A, B e DR. Nonostante l'elevato coefficiente di variabilità tra laboratori, il contenuto di Cellule Formanti Colonie (Colony Forming Cell, CFC), sia pre-criopreservazione sia al momento dello scongelamento, rappresenta un fattore che influenza significativamente l'attecchimento e il cut-off di $> 1 \times 10^4$ /kg CFU-GM dopo lo scongelamento risulta essere un fattore prognostico per la TRM e la sopravvivenza. Le colture cellulari in vitro ottenute dallo scongelamento di un segmento allegato alla unità di SCO consentono di ottenere preziose informazioni sul rischio di mancato attecchimento secondario a perdita di efficienza clonogenica delle cellule staminali. Prima di essere introdotti tra i criteri di selezione, i test clono genici, condotti sul segmento allegato all'unità cordonale, richiedono tuttavia ulteriori approfondimenti, essendo ancora limitati i

dati di correlazione tra i test clonogenici e l'outcome del trapianto (8). L'incompatibilità ABO tra donatore e ricevente può contribuire ad un ritardato attecchimento e ad un quadro di emolisi cronica dopo il trapianto. Pertanto, in caso di disponibilità di due unità di SCO, equivalenti per dose cellulare e per compatibilità, è da preferire quella compatibile per il sistema ABO. In accordo con gli standard Fact/Netcord, le CBU risultate positive agli studi microbiologici dovrebbero essere scartate e tutti i previsti markers di malattie infettive devono risultare negativi. Lo studio del CMV non è obbligatorio, tuttavia, essendo virtualmente possibile un'infezione primaria durante la gravidanza, la politica di screening del Centro Trapianti potrebbe prevedere lo studio degli anticorpi IgM materni anti CMV e, in caso di positività, anche del CMV DNA in PCR sul siero materno e sui segmenti allegati alla unità.

La selezione del donatore correlato aploidentico

Negli ultimi anni, i risultati dei trapianti da donatore correlato aploidentico sono stati particolarmente incoraggianti e, almeno per alcune selezionate patologie, sono paragonabili a quelli ottenuti con il trapianto da donatore non correlato e da SCO. Per molti anni la procedura del trapianto aploidentico ha previsto la deplezione dei linfociti T della raccolta di cellule staminali emopoietiche con l'obiettivo di prevenire l'insorgenza di GVHD grave. Recentemente, l'introduzione di regimi intensificati di profilassi in vivo della GVHD ha consentito di realizzare il trapianto da donatore aploidentico, utilizzando cellule staminali da midollo o da sangue periferico non T-deplete (9, 10). Questo tipo di trapianto, che non richiede sofisticate procedure di manipolazione cellulare, peraltro costose e prolungate, si è progressivamente diffuso tra diversi Centri Trapianto. Inoltre, poiché ciascuno ha virtualmente almeno un donatore familiare parzialmente compatibile (genitore, fratello o figlio), per i pazienti con indicazione al trapianto e privi di un donatore HLA compatibile, dovrebbero essere considerati per la tipizzazione HLA ed eventuale valutazione di idoneità, i familiari più stretti. Questa politica di identificazione del donatore aploidentico, integrata con il piano di ricerca del VUD e delle CBU, consente di fornire un quadro di insieme su tutte le potenziali disponibilità di un eventuale donatore e contribuisce effettivamente a guidare il processo di ricerca.

Conclusioni: un modello di ricerca di un donatore alternativo

Per conseguire l'obiettivo di identificare un donatore idoneo per il trapianto allogenico con adeguata tempistica, la politica di ricerca del Rome Transplant Network (RTN), ha considerato tutte le potenziali fonti di cellule staminali ematopoietiche (familiare HLA identico, VUD, CBU e familiare aploidentico). Il principale criterio di selezione del VUD è stata la compatibilità HLA $\geq 8/8$ loci, mentre la selezione di una singola unità di SCO si è basata sulla dose cellulare ($TNC \geq 3 \times 10^7/kg$ e $CD34+ \geq 1 \times 10^5/kg$) e sulla compatibilità $\geq 4/6$ loci HLA. Da aprile 2006 l'opzione donatore aploidentico è stata considerata simultaneamente. Il tempo dall'i-

nizio della ricerca al trapianto è stato fissato a 3 mesi, in particolare per i pazienti con diagnosi di leucemia. Seguendo questa politica di ricerca del donatore, l'analisi eseguita secondo l'intenzione al trattamento (intention-to-treat analysis) ha dimostrato che un trapianto allogenico può essere offerto alla maggior parte dei pazienti: un donatore adeguato è stato infatti identificato per 390 (91%) dei 428 pazienti eleggibili al trapianto, il quale è stato effettivamente applicato nell'84% dei casi ricorrendo alle diverse fonti di cellule staminali ematopoietiche: fratello HLA identico, VUD, CBU o donatore aploidentico. In conclusione, seguendo questa politica della ricerca "allargata", potenzialmente tutti i pazienti con patologie ematologiche che prevedono un programma di trapianto allogenico hanno l'effettiva possibilità di individuare un donatore e di procedere al trapianto allogenico con una adeguata tempistica. Per il disegno di futuri trials clinici prospettici, ogni strategia terapeutica basata sul concetto di "donor vs non donor" dovrebbe essere cambiata con quella basata sul concetto di "transplant vs no transplant".

Bibliografia essenziale

1. Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica*. 2009; 94: 451-454.
2. Reisner Y, Hagin D, Martelli MF. Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood*. 2011; 118: 6006-6017.
3. Flomemberg N, Baxter Lowe LE, Confer D et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation outcome *Blood* 2004; 104: 1923-1930.
4. Crocchiolo R, Zino E, Vago, L et al. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009; 14: 1437-1444.
5. Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K et al, HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism. *Blood*. 2009; 113: 2851-2858
6. Querol S, Mufti GJ, Marsh SG, et al. Cord blood stem cells for hematopoietic stem cell transplantation in the UK: how big should the bank be? *Haematologica*. 2009; 94: 536-541.
7. Barker JN, Byam C, Scaradavou A. How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts *Blood* 2011; 117: 2332-2339.
8. Picardi A, Arcese W. Quality assessment of cord blood units selected for unrelated transplantation: a transplant center perspective. *Transfus Apher Sci*. 2010; 42: 289-297.
9. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14: 641-650.
10. Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, et al. Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies. *Blood*. 2013; 121: 849-857.

GvL senza GvHD: un traguardo possibile?

Andrea Bacigalupo

Divisione Ematologia e Trapianto di Midollo, IRCCS AOU San Martino IST, Genova

La separazione della reazione trapianto contro ospite (GvHD) dalla reazione trapianto verso leukemia (GvL) è l'obiettivo dei programmi trapianto da 3 decenni a questa parte.

Potrà sembrare strano, ma, pur sapendo che il sistema HLA gioca un ruolo importante, non siamo riusciti a identificare gli antigeni bersaglio della GvHD: prova ne è che continuiamo a vedere GvHD - anche molto gravi - in fratelli HLA identici, e abbiamo pazienti che fanno trapianti da donatori con una o più incompatibilità HLA, senza GvHD. Lo stesso dicasi per la GvL: anche qui mancano informazioni sugli antigeni target. Si potrebbe andare avanti con le nostre lacune, dicendo che ci mancano anche informazioni sulle cellule effettrici: sappiamo che sono coinvolti sia i linfociti T, che i B, che le cellule NK. Però studi clinici di "deplezione selettiva" sono spesso stati negativi. Ultimamente un programma di deplezione selettiva delle cellule T alfa-beta, suggerisce che le residue (T gamma delta) non danno GvHD, e quindi indica le alfa beta come responsabili. Poco chiaro ancora il ruolo del compartimento B, mentre molto lavoro è stato fatto e pubblicato sulle cellule NK, specie nel loro ruolo di controllo della leucemia mieloide acuta.

Tuttavia, dopo queste note negative, alcuni segnali per una possibile GvL senza GvHD forse adesso ci sono. Nel corso degli ultimi anni abbiamo assistito ad una riduzione della GvHD acuta, ed anche ad una iniziale riduzione della recidiva leucemica. Abbiamo analizzato solo pazienti trapiantati in remissione 1 e 2 (CR1+CR2): la GvHD acuta II-IV è passata dal 54% prima del 1990 al 23% dopo il 2010 ($p < 0.00001$), mentre la recidiva leucemica è scesa dal 36% al 25% ($p = 0.001$). L'incidenza di GvHD cronica è passata dal 27% al 14% ($p = 0.001$). Sono scese nel contempo mortalità trapiantologica (dal 44 al 13%; $p < 0.0001$) e la mortalità da recidiva (dal 18% al 13%, $p = 0.01$).

È evidente da questi dati che è scesa molto di più l'incidenza di GvHD (acuta e cronica) che non quella di recidiva. Però trovo che sia un segnale importante: ci saremmo aspettati un aumento della recidiva alla riduzione della GvHD. Invece questi dati suggeriscono che è possibile ridurre la GvHD e "mantenere" l'efficacia anti-leucemica (GvL) del trapianto. Questo dato suggerirebbe anche che le cellule responsabili della GvHD e della GvL, potrebbero non essere le stesse.

Abbiamo lavorato su programmi di terapia cellulare per intensificare la GvL: que-

sta è tanto più efficace quanto più precocemente viene utilizzata. In un gruppo di leucemie mieloidi acute (LMA) l'infusione di linfociti del donatore (DLI) sulla base di un marcatore molecolare (WT1) (DLI pre-emptive) non ha sostanzialmente modificato l'incidenza di recidiva leucemica. Dobbiamo utilizzare la DLI ancora più precocemente, o con livelli di malattia minima residua (MRD) più bassi, per ottenere migliore controllo della recidiva leucemica. Un'altra opzione, per la quale stiamo preparando un protocollo prospettico, è l'utilizzo delle cellule NK purificate, da donatori incompatibili, somministrate in via profilattica nel primo periodo post-trapianto.

GRAFT VERSUS HOST DISEASE

Profilassi e nuove terapie della GvHD

Alessandra Sperotto, Renato Fanin

Clinica Ematologica, Centro Trapianti e Terapie Cellulari "C. Melzi",
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine

La malattia da trapianto contro l'ospite (GvHD) acuta e cronica rappresenta una delle maggiori cause di mortalità post trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogene e spesso costituisce comunque una causa di morbilità con gravi sequele sulla qualità di vita del paziente. L'incidenza della GvHD è correlata a numerose variabili, tra cui le più importanti sono:

- HLA compatibilità;
- il regime di condizionamento (in particolare l'impiego della Total Body Irradiation - TBI);
- sesso del donatore;
- sorgente delle cellule staminali;

Se la patogenesi della GvHD acuta è ampiamente dimostrata in modelli animali, rari sono invece gli studi pre-clinici e i modelli fisiopatologici relativi alla GvHD cronica.

Profilassi convenzionale

Numerosi studi randomizzati negli ultimi trent'anni hanno evidenziato e confermato come terapia standard per la profilassi dalla GVHD l'impiego di ciclosporina/tacrolimus e metotrexate. Sebbene l'aggiunta della timo globulina anti-linfocitaria - ATG riduca l'incidenza sia di GvHD acuta che cronica, non è stato dimostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza globale.

Terapia convenzionale

Gli steroidi rimangono la terapia di elezione di prima linea per la GvHD sia acuta che cronica, associati alla terapia con ciclosporina o tacrolimus già in atto nella GvHD acuta. I pazienti non responsivi alla terapia steroidea sono ad alto rischio di morbilità e mortalità.

Nuove indicazioni terapeutiche

I modelli relativi alla fisiopatologia della GvHD prevedono sostanzialmente tre fasi:

- 1) danno tissutale mediato dal regime di condizionamento;

- 2) attivazione di linfociti T, in particolare con stimolazione dei linfociti T CD8+ da parte delle cellule dendritiche del ricevente e dei linfociti T CD4 da parte delle cellule dendrite del donatore;
- 3) danno organo specifico mediato direttamente dai linfociti T e dalle citochine rilasciate nella fase di infiammazione.

Pertanto, la modulazione dell'alloreattività modulata dai linfociti T allogenici rimane il principale obiettivo sia delle strategie di profilassi che di terapia della GvHD.

Inoltre, nel processo fisiopatologico della GvHD sono coinvolte altre cellule e altri tessuti che possono costituire specifici bersagli terapeutici: i linfociti T regolatori, le cellule dendritiche, i linfociti T NK, i linfociti B, l'endotelio vascolare, la cascata citochinica.

Target therapy: regime di condizionamento

Il regime di condizionamento oltre all'aplasia midollare, determina anche un esteso danno tissutale: entrambi correlati all'intensità del regime di condizionamento. I tessuti danneggiati rilasciano citochine pro-infiammatorie in grado di attivare le cellule presentanti l'antigene (APC).

L'apparato gastroenterico è un organo particolarmente predisposto al danno tissutale e al rilascio di citochine pro-infiammatorie: si crea un'interruzione della barriera tra la zona sottomucosa - sterile - e il lume intestinale con possibile passaggio dei germi. Inoltre le citochine rilasciate dai linfociti T attivati possono a loro volta attivare sia i meccanismi dell'immunità innata che dell'immunità adattiva (Fig. 1).

I segnali di attivazione avvengono tramite toll-like receptors (TLRs) o tramite NOD - like receptors espressi dalle cellule dell'immunità innata. Un ruolo fon-

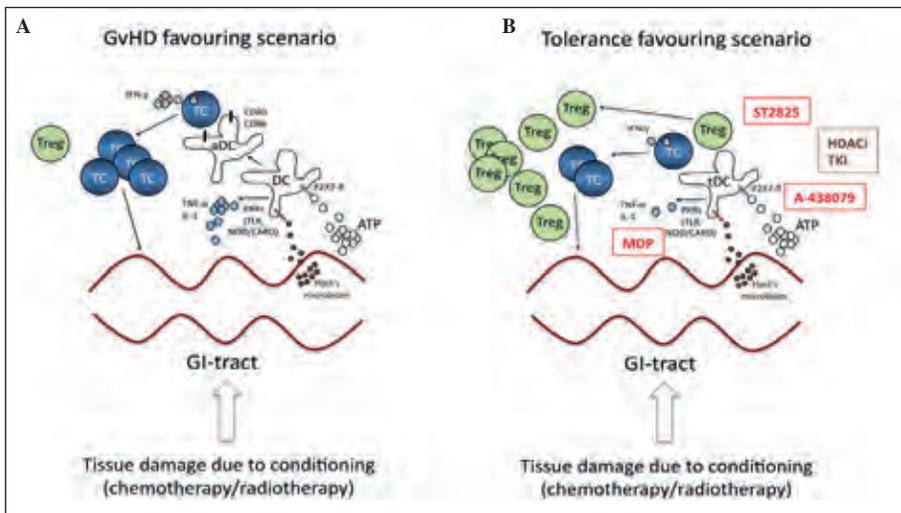


Fig. 1

damentale è svolto dal recettore per l'ATP la cui attivazione determina una iperespressione delle molecole CD80 e CD86 sulle cellule dendritiche (CD): il recettore per l'ATP sulle cellule dendritiche è P2X7R. Il blocco farmacologico di tale recettore (P2X7R) riduce l'attività delle CD, e l'incidenza della GvHD, aumentando contemporaneamente numero e attività dei linfociti T regolatori (Treg). Lee KH et al. hanno confermato, in 152 pazienti, il ruolo del recettore per l'ATP nelle cellule dendritiche: pazienti omozigoti per P2X7R, o reinfusi da donatori omozigoti per P2X7R hanno una più elevata incidenza di GvHD e di TRM. Inoltre l'omozigosi P2X7R è risultata un fattore prognostico sfavorevole per la sopravvivenza globale dei 152 pazienti. L'inibizione dei segnali P2X7R correlati potrebbe permettere la prevenzione della GvHD acuta conseguente al danno da regime di condizionamento (Fig. 1).

Nella fase legata al regime di condizionamento altre vie di attivazione si sono rilevate altrettanto importanti. Studi relativi al polimorfismo dei Toll - like - receptors (TLRs) come il TLR4 (Thr399Ile) sia nei pazienti che nei donatori hanno una correlazione con l'incidenza di GvHD acuta severa, suggerendo un ruolo fondamentale dei TLRs. Inoltre, un cotrattamento nel modello animale con agonisti del TLR9 determina un incremento della GvHD severa legato all'iperproduzione da parte del ricevente di IFN- γ . Topi con deficit di TLR9 hanno bassa incidenza di GvHD e miglior sopravvivenza globale. Studi preclinici in quei è previsto l'utilizzo di inibitori dei TLRs come ST2825 costituiscono un approccio razionale per modificare l'attivazione dei TLRs nella fase del regime di condizionamento e quindi nel controllo della GvHD acuta (Fig. 1).

Un altro regolatore della fase di attivazione della GvHD acuta è rappresentato dai recettori NOD - like. Il polimorfismo NOD/CARD15 è correlato all'insorgenza di GvHD acuta: un singolo polimorfismo (SNPs) determina una riduzione dell'attività NOD/CARD15 con conseguente iperattivazione delle APC e quindi dei linfociti T. Topi con deficit di NOD2 hanno un'iperattività dei linfociti T.

Studi in corso stanno valutando il ruolo di una stimolazione continuativa di NOD2 nella prevenzione della GvHD (Fig. 1).

Target therapy: antigen presenting cells - APC

Numerosi studi hanno evidenziato il ruolo fondamentale delle APC sia nell'insorgenza della GvHD acuta che nello sviluppo della tolleranza.

Le cellule APC del ricevente sopravvivono per un lungo periodo post regime di condizionamento ed hanno un ruolo chiave nell'attivazione dei linfociti T del donatore in quanto presentano antigeni minori di istocompatibilità (miHA) che inducono un'attivazione T allo - miHA - specifica.

Ciclosporina, micofenolato e steroidi, modificano l'attività delle APC. Più recentemente sono state proposte nuove strategie per modulare l'attività della APC.

Un approccio riguarda il tentativo di selezionare le APC in senso tolleragenico: modulando l'azione dell'istone deacetilasi è possibile da un lato modulare l'attivazione dei linfociti T, dall'altro immunomodulare l'attività della APC. Gli inibitori dell'istone deacetilasi (HDAC1) bloccano la differenziazione delle APC:

agiscono inibendo l'espressione del CD1a e delle molecole di costimolazione e di adesione). L'azione degli HDAC1 si esplica anche con una riduzione della cascata citochinica (ridotta produzione TNF- α , IFN- γ , IL-1b, IL-2), ridotta espressione CD40 e CD80 e riduzione della capacità di allo-stimolazione delle APC.

Inoltre gli HDAC1 agiscono promuovendo l'azione delle Treg. Gli HDAC1 potrebbero pertanto avere un ruolo fondamentale sia nella prevenzione che nella terapia della GvHD acuta: sono attualmente in corso studi clinici di fase 2 atti a valutare il ruolo del Panobinostat da solo o in combinazione con gli steroidi nella profilassi o nella terapia della GvHD acuta (Fig. 1).

Infine gli inibitori della tirosinchinasi (TKI): a partire dall'imatinib che inibendo l'azione del PDGF-R modula il danno tissutale causato dall'infiammazione cronica: pazienti con GvHD cronica hanno elevati livelli di PDGF-R.

Oltre all'azione sul PDGF-R, è stata dimostrata la capacità dell'imatinib nell'inibire le APC, nel modulare l'azione dei monociti e conseguentemente anche dei linfociti T.

Le APC esposte all'azione dell'imatinib hanno una ridotta capacità di attivare i linfociti T in quanto viene bloccata la loro differenziazione mediata dalla fosfatidilinositolo 3 - chinasi.

Le varie vie di azione descritte verosimilmente spiegano solo in parte le buone risposte osservate nei pazienti con GvHD cronica trattati con imatinib che andrebbe valutato in studi prospettici sia in mono terapia che in associazione (es rituximab) (Fig. 1a).

Target therapy: linfociti T

Varie sono le sottopopolazioni di linfociti CD4 coinvolti nella GvHD acuta e cronica. Inoltre l'azione delle sottopopolazioni T linfocitarie varia sia in base agli organi bersaglio sia in base alle citochine pro-infiammatorie presenti nel microambiente di azione.

Il ruolo dei linfociti T è stato analizzato determinando i livelli di citochine sieriche, tramite analisi SNPs dei geni delle citochine sieriche, e anche mediante biopsia dei tessuti danneggiati.

Per esempio, nei modelli animali, i linfociti TH1 allogeneici mediano principalmente la GvHD acuta intestinale ed epatica. I linfociti TH2 e TH17 sembrano invece implicati nella GvHD cutanea e polmonare.

Nell'uomo l'interazione è decisamente più complessa: per esempio il rapporto TH17/Treg nelle biopsie di lesioni intestinali in corso di GvHD acuta si è rilevato direttamente correlato con la severità della GvHD. Mentre la concentrazione di TH17 non si è rilevata differente fra biopsie di cute affetta da GvHD e cute integra. Pur essendo complesso, tuttavia chiarire il ruolo delle sottopopolazioni CD4 e delle citochine coinvolte nello sviluppo della GvHD è fondamentale sia per la prevenzione che per la terapia.

Recenti studi hanno enfatizzato il ruolo dell'IL-21 rilasciata dai linfociti T alloge-nici. Il blocco della via IL-21 mediata determina una ridotta incidenza di GvHD acuta intestinale mantenendo l'effetto GVT. Il blocco della via IL-21 mediata non

interferisce con la produzione di IL-17, riduce la produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T della mucosa intestinale ed infine attiva i linfociti TH2 e le Treg.

Un ruolo fondamentale è svolto inoltre dai segnali di costimolazione con conseguente differenziazione dei linfociti T. STAT1 per esempio interferisce con la differenziazione dei linfociti TH1, come rilevato da una ridotta attivazione cellulare in vivo con conseguente riduzione nella produzione di IFN- γ .

Inoltre STAT1 è un fisiologico inibitore di FoxP3: la sua inibizione determina in vivo una attivazione ed espansione delle Tregs (Fig. 2).

Un altro target, nella modulazione della GvHD, è la proteina C chinasi (PKC): proteina che ha un ruolo nella sopravvivenza dei linfociti T e nella loro attivazione. AEB071 è un potente e selettivo inibitore di PKC, riducendo la produzione da parte dei linfociti T allogenici di IL-2 e di IFN- γ . In studi pre-clinici è emerso come la somministrazione p.o. di AEB071 in monosomministrazione o in combinazione riduca il rischio di rigetto di cuore e rene trapiantati. Inoltre il blocco dell'attivazione T linfocitaria mediato da AEB071 avviene tramite meccanismi differenti rispetto gli inibitori della calcineurina (CNI), senza conseguentemente gli effetti collaterali di questi ultimi. AEB071 è attualmente testato in combinazione con tacrolimus vs micofenolato nel trapianto d'organo. Sono previsti studi per valutarne l'efficacia nella prevenzione e nel trattamento della GvHD nell'uomo (Fig. 2).

Un altro interessante gruppo di nuovi agenti in grado potenzialmente di limitare l'alloreattività dei linfociti T sono quelli che interferiscono con la migrazione e la localizzazione dei linfociti T, come avviene per esempio quando i linfociti T migrano negli organi linfoidi secondari (SLO), dove si attivano e successivamente determinano una alloreaazione GvHD mediata con danno del tessuto interessato.

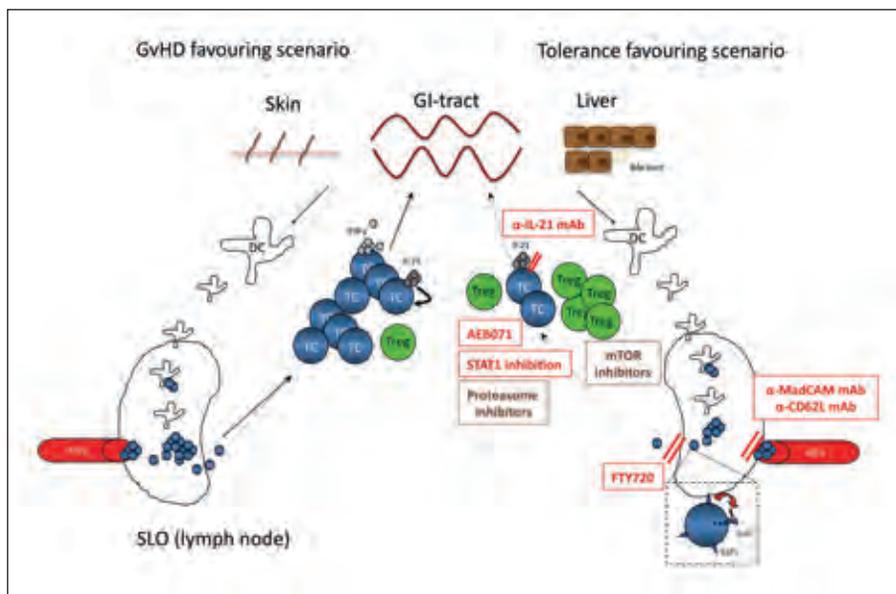


Fig. 2

Per esempio FTY720, un analogo della sfingosina, è in grado di prevenire la GvHD bloccando il recettore che media l'ingresso dei linfociti T dal circolo ai SLO.

Un altro approccio è rappresentato dal blocco dell'accesso ai SLO tramite anticorpo monoclonale (Fig. 2).

Infine, gli inibitori del proteosoma sono potenzialmente in grado di polarizzare l'alloreattività dei linfociti T in senso tolleragenico.

Bortezomib si è dimostrato - in vitro - in grado di indurre un'apoptosi selettiva dei linfociti T attivati tramite la disattivazione della proteina anti-apoptotica bcl2. Inoltre, nel modello animale l'effetto GVL sembra preservato. Mateos - Mazon et al. hanno trattato con Bortezomib 5 pazienti con mieloma in progressione e con GvHD: 4 hanno ottenuto un netto miglioramento della GvHD. In corso i primi studi clinici relativi all'utilizzo del Bortezomib come profilassi della GvHD.

Target therapy: neovascolarizzazione

I linfociti T infusi reagiscono immediatamente con le cellule presenti in circolo e con le cellule endoteliali (EC). Le cellule endoteliali vengono danneggiate dal regime di condizionamento (in particolare la TBI). Il danno endoteliale del ricevente viene in parte ricostituito dalla neovascolarizzazione mediata anche dalle cellule endoteliali del donatore. Si è inoltre dimostrato che alcune specifiche cellule endoteliali (per esempio le cellule endoteliali sinusoidali) possono avere un effetto immunomodulatore. Inoltre, il tessuto endoteliale può direttamente determinare un'attivazione dei linfociti CD8 sia in vitro che in vivo, in assenza delle APC.

Questa iniziale alloattivazione è considerata un evento importante per l'attivazione e l'espansione dei linfociti T che successivamente invadono lo spazio interstiziale. Pertanto il danno endoteliale mediato dal regime di condizionamento e la successiva ricostituzione dell'endotelio tramite l'attivazione dei progenitori delle cellule endoteliali, rappresenta un interessante campo di azione terapeutica della GvHD.

In modelli animali di GvHD acuta, tramite l'utilizzo di inibitori della neovascolarizzazione mediata da cellule endoteliali del donatore (per esempio tramite utilizzo dell'anticorpo anti neovascolarizzazione endoteliale E4G10, si è osservato una riduzione/assenza di GvHD acuta e anche una inibizione della crescita tumorale con conseguente incremento della sopravvivenza globale.

È inoltre noto come una elevata espressione del fattore di crescita endoteliale (VEGF) sia negativamente associata sia alla severità della GvHD che all'incremento della TRM.

Sono necessari ulteriori studi pre-clinici e studi clinici per esplorare le potenzialità terapeutiche del blocco dell'angiogenesi e della vasculogenesi in quanto vi sono dati discordanti come quelli che emergono dall'utilizzo della talidomide: mentre gli studi iniziali che ne prevedevano l'impiego nella GvHD cronica si sono dimostrati molto promettenti, successive pubblicazioni hanno evidenziato risposte inferiori al 40% nella GvHD cronica, nessuna efficacia invece nella GvHD acuta e in profilassi.

Target therapy: immunoterapia adottiva

Infusione di cellule T reg del donatore (DTI)

Le cellule TregCD4+CD25+ agiscono bilanciando l'autoimmunità e l'immunità anti neoplastica. Le Treg regolano l'alloreattività in vitro e in vivo. In modelli animali, l'infusione delle Treg previene lo sviluppo della GvHD acuta, senza ridurre l'effetto GVT. Non si è inoltre osservato un incremento nell'incidenza di episodi infettivi in pazienti infusi con dosi elevate di Treg.

Il primo studio clinico con l'utilizzo delle Treg come profilassi della GvHD acuta riguardava 28 pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche da donatore aploidentico: le Treg sono state infuse il giorno -4; il giorno 0 sono state infuse le cellule CD34 positive con la quota residua di linfociti T. Non era prevista nessuna profilassi farmacologica.

Tutti i pazienti hanno attecchito: 2 pazienti hanno sviluppato una GvHD acuta di grado II; nessun paziente ha sviluppato GvHD cronica. Gli autori concludevano sottolineando la fattibilità e la bassa tossicità della procedura: ovviamente i dati richiedono conferma con casistiche più numerose e in studi randomizzati (Fig. 3).

Espansione in vivo delle Treg tramite inibizione mTOR

L'azione delle Treg può essere modulata anche per via farmacologica. È stato recentemente dimostrato che l'espansione in vivo delle Treg è cruciale per la loro

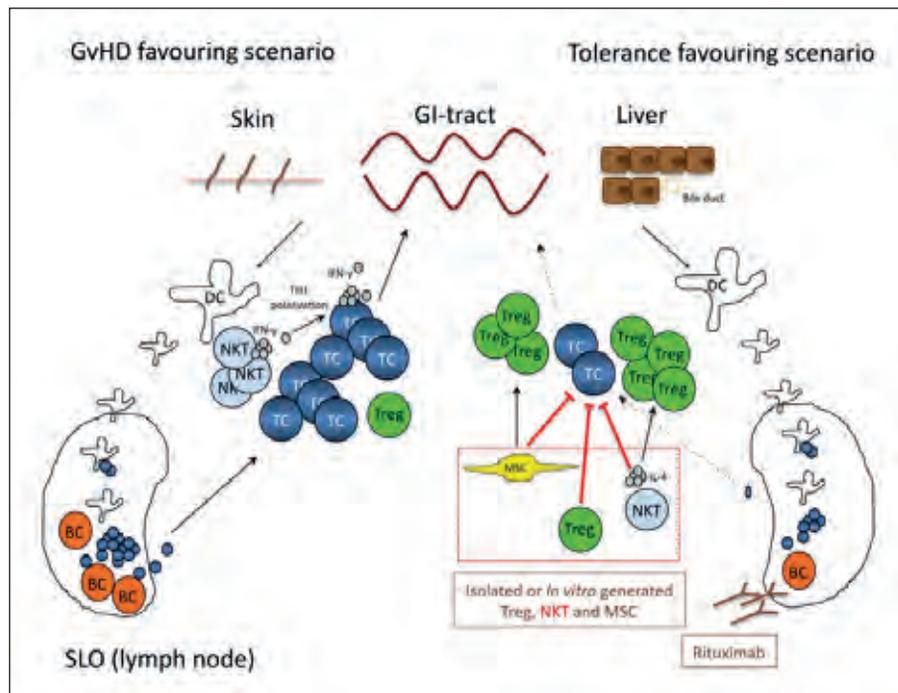


Fig. 3

attività immunologica, in articolare anti GvHD: mTOR, target della rapamicina, regola questo processo.

La regolazione di mTOR è un processo dinamico e oscillatorio caratterizzato da una iniziale dawn-regolazione e da un successivo incremento dell'attività, prerequisito per l'espansione delle Treg. La rapamicina agendo su mTOR, determina in vitro un'espansione delle Treg.

Inoltre, la rapamicina in sinergia con l'IL-2 determina un'espansione delle Treg del donatore e una conversione dei linfociti T CD25- in CD25+ Treg, potenzialmente in grado di inibire l'instaurarsi della GvHD in vivo.

Pertanto, l'infusione delle Treg associata all'utilizzo della rapamicina, oppure l'utilizzo della rapamicina e dell'IL2 possono rappresentare un'importante strategia di modulazione farmacologica dell'attività delle Treg per prevenire o per trattare la GvHD (Fig. 3).

Le potenzialità cliniche dell'inibizione di mTOR sono ampiamente dimostrate in numerosi studi.

Linfociti TNK (NKT)

I linfociti NK (NKT) esprimono una variante Va24 del TCR e secernono larghe quantità di IL-4 e/o IFN- γ dopo attivazione via TCR. Numerosi lavori riportano come Linfociti NKT sia del donatore che del ricevente agiscono prevenendo l'insorgenza della GvHD. Questa azione dipende prevalentemente dall'IL4 secreta dai linfociti NKT che determinano una polarizzazione in senso TH2 dei linfociti T del donatore.

È stato dimostrato, nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche con condizionamento ad intensità ridotta (TBI + ATG), che le cellule NKT del ricevente cooperano con le Treg del donatore inducendone una espansione con conseguente prevenzione della GvHD. Inoltre, nel modello animale, l'infusione di linfociti NKT previene l'insorgenza della GvHD tramite l'inibizione della secrezione di citochine pro infiammatorie da parte dei linfociti T, mentre si preserva l'effetto GVT.

Cellule mesenchimali

Il midollo osseo contiene cellule di derivazione fibroblastica (con capacità di differenziarsi in adipociti, osteoblasti e condrociti), denominate cellule mesenchimali o cellule stromali (MSC). Le MCS hanno spiccata capacità immunoregolatoria, da qui gli studi clinici nella prevenzione - terapia della GvHD.

I meccanismi d'azione delle MCS non sono del tutto chiari: si presume che l'inibizione della proliferazione dei linfociti T sia mediata dalla secrezione di TGF β , HGF, PGE2 e induzione di attività tollerogena delle cellule dendritiche.

Dati recenti hanno inoltre dimostrato che le MCS inducono l'attivazione delle Treg.

MCS non presentano molecole MHC di classe I e II ed hanno una bassa espressione di molecole di costimolazione: questo fa sì che il loro utilizzo non richieda una compatibilità HLA.

I due studi di fase II che prevedevano l'utilizzo delle MCS nella GvHD acuta

refrattaria allo steroide, hanno evidenziato risposte superiori al 60%, senza effetti collaterali.

Linfociti B

Un'alterata funzionalità dei linfociti B è stata evidenziata nella GvHD cronica: spesso i pazienti con GvHD cronica presentano un numero elevato di cellule B CD27+, elevati livelli di citochine attivanti i linfociti B, di TNF e di allo-anticorpi. Inoltre, nella GvHD cronica è evidente una ricostituzione più veloce dei linfociti B. È stato inoltre evidenziato come micofenolato, steroidi, fotoafèresi e ATG, hanno tra i meccanismi d'azione anche un effetto diretto sui linfociti B. Sono stati riportati efficaci risposte con l'impiego del Rituximab in pazienti con GvHD cronica, in particolare con interessamento cutaneo, verosimilmente per un'azione di B deplezione con conseguente mancata T attivazione.

Partendo da questi presupposti, numerosi altri anticorpi monoclonali sono attualmente in corso di studio per la prevenzione/terapia della GvHD: ocrelizumab, GA101, ofatumumab.

È ancora attuale la fotochemioterapia extracorporea?

Cesare Perotti, Claudia Del Fante

Servizio di Immunoematologia, Medicina Trasfusionale, Laboratorio di Manipolazione Cellulare, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Alla domanda se la fotochemioterapia extracorporea sia ancora terapia attuale la risposta è: naturalmente sì. Il numero di pubblicazioni su riviste indicizzate è cresciuto esponenzialmente negli ultimi 5 anni raggiungendo 1020 “published papers” nel febbraio 2014.

La domanda, comunque, merita una risposta molto più articolata in quanto ci troviamo di fronte ad un approccio terapeutico relativamente giovane che nel corso degli ultimi dieci anni ha subito importanti cambiamenti sia dal punto di vista delle indicazioni e dei ritmi di trattamento, che da quello dell’innovazione tecnologica (separatori cellulari automatici di terza generazione, irradiatoria a luce ultravioletta con raffinato controllo della temperatura ecc.).

Allo stato dell’arte la fotochemioterapia extracorporea è la sola terapia cellulare unitamente al trapianto allogenico di cellule staminali e alla DLI (donor lymphocyte infusion) davvero utilizzata su larga scala in campo medico.

L’interesse notevole che questa moderna terapia ha suscitato e continua a suscitare è principalmente legato ai buoni/ottimi risultati clinici ottenuti in patologie poco responsive al tradizionale approccio farmacologico a fronte di effetti collaterali molto modesti anche in pazienti in condizioni critiche.

Proprio per questi motivi stiamo attualmente assistendo ad un ampliamento delle patologie per le quali valga la pena di applicarla.

Storia

La fotochemioterapia extracorporea (FCE) è una terapia immunomodulante introdotta da Edelson nel 1987 per il trattamento di una patologia tumorale relativamente rara come il linfoma cutaneo a cellule T. Attualmente è riconosciuta come terapia di prima linea per questa patologia dalla FDA americana ed almeno un centinaio di Centri specialistici nel mondo utilizzano questa tecnica.

Partendo da questa esperienza, molti investigatori hanno cercato di ampliare i campi di applicazione della FCE, utilizzandola nel trattamento di alcune malattie autoimmuni come il lupus sistemico, la dermatomiosite, il pemfigo volgare ed il

lichen planus resistenti alla terapia immunosoppressiva standard. I risultati più eclatanti sono però stati ottenuti nel dominio del rigetto acuto e cronico dei pazienti trapiantati di cuore e nella terapia della malattia del trapianto contro l'ospite (GvHD) sia acuta che cronica, una grave patologia che colpisce circa il 60% dei pazienti trapiantati.

Definizione

La fotochemioterapia extracorporea (FCE) è una raccolta aferetica con successiva irradiazione cellulare; infatti si basa essenzialmente sulla raccolta, mediante separatore cellulare, di cellule mononucleate (lifociti e monociti), aggiunta al prodotto cellulare raccolto di una sostanza foto attivabile come l'8 metoxi-psoralene (8-MOP) e successiva irradiazione del buffy coat con raggi UV-A.

Il preparato cellulare così manipolato ex vivo viene infine reinfuso al paziente immediatamente dopo la sua irradiazione.

In particolare la procedura di aferesi viene eseguita processando al paziente 1,5-2 volumi ematici, impostando la pompa di raccolta delle cellule a 0.8 ml/min, cercando di ottenere un prodotto finale non superiore a 150 ml, con un ematocrito inferiore al 5%, in un tempo massimo di 120/130 minuti. Il prodotto così ottenuto viene manipolato sotto cappa a flusso laminare aggiungendo la quantità di soluzione fisiologica necessaria a portare la sacca da leucaferesi ad un volume finale massimo di 300 ml. Il preparato viene successivamente trasferito in una speciale sacca permeabile ai raggi UV-A e miscelato con 8-MOP alla dose di 200 ng/ml. La sacca viene, infine, irradiata a 22°C con raggi UV-A alla lunghezza d'onda di 365 nm per un tempo di circa 15 minuti.

Meccanismo d'azione

L'efficacia terapeutica dei raggi UVA si basa sulla presenza di molecole (8-metoxypsoralene) che assorbono le radiazioni UV e indirettamente producono una serie di effetti biologici. Questa molecola entra rapidamente nel nucleo della cellula e rimane biologicamente inerte fino al momento in cui viene esposta ai raggi UVA. In conseguenza dell'irradiazione l'8-MOP diventa "attivo, si lega alle basi pirimidiniche del DNA inducendo apoptosi.

Il preciso meccanismo che sta alla base dell'efficacia terapeutica della FCE non è ancora completamente noto, e merita alcune osservazioni di fondo:

- l'ECP induce apoptosi dei linfociti trattati entro 24-72 ore dall'avvenuta irradiazione. I monociti invece paiono più resistenti.
- Poiché viene trattato non più del 5-10% dei linfociti circolanti appare evidente che l'effetto terapeutico non possa essere attribuito direttamente alla morte delle cellule patogene/ auto aggressive.
- A seguito dell'infusione delle cellule allogeniche la risposta immune che si ottiene può essere immunogenica o tollerogenica in relazione al fatto che le cellule infuse siano in fase apoptotica precoce o invece già necrotiche.
- Le cellule dendritiche immature residenti nei tessuti possiedono grandi capacità

endofitiche quando esposte ai cosiddetti “danger signals”, possono maturare e promuovere una attivazione del sistema immunitario. Questo fenomeno viene esaltato dall’infusione di cellule del sistema linfocitario UV trattate.

- Eleganti studi in vitro hanno dimostrato come la FCE sia capace di indurre la differenziazione dei monociti in cellule dendritiche immature.
- La FCE è capace di stimolare la generazione di cellule T regolatorie (Tregs) attraverso la secrezione di citochine antiinfiammatorie come IL-10 e TGF_β.
- I pazienti in terapia con FEC a volte mostrano un aumento significativo di cellule Treg circolanti (dal 9% al 29%) con espressione di elevati valori di CD62L, CD45RO, FoxP3.
- Considerati tutti insieme i fenomeni sopra descritti possono in parte spiegare come la FCE sia una terapia cellulare con buona efficacia e sicurezza. D’altra parte però non sono ancora esaustivi nel chiarire come la FCE possa essere efficace in contesti clinici molto diversi e come una quota di pazienti (circa il 20-25%) a parità di patologia, trattamento farmacologico e gravità delle lesioni risulti invece non responsivo.

INDICAZIONI TERAPEUTICHE

Malattia del trapianto contro l’ospite (GvHD)

La GvHD è una complicanza che si verifica frequentemente dopo il trapianto di cellule staminali allogeniche. Essa è definita come una reazione immunitaria sostenuta dalle cellule contenute nel graft diretta contro i tessuti bersaglio dell’ospite. Più frequentemente vengono aggrediti e, conseguentemente, distrutti la cute e gli annessi, le mucose, il fegato, il tubo gastroenterico, più raramente il polmone ed il rene.

La cascata di eventi che porta al manifestarsi della GvHD è legata, da un lato, alle caratteristiche del tessuto trapiantato e dall’altro a quelle del ricevente: il graft deve contenere cellule immunologicamente competenti e, allo stesso tempo, il ricevente non deve essere in grado di montare una efficace risposta contro le cellule trapiantate (immunoincompetenza). Inoltre l’ospite deve esprimere antigeni tissutali diversi da quelli del donatore con conseguente mancato riconoscimento da parte delle cellule del graft. Attualmente la GvHD rappresenta la maggior complicanza del trapianto allogenico di cellule staminali. Essa è definita come acuta (aGvHD) quando si verifica entro 100 giorni dalla data del trapianto e cronica oltre i 100 giorni. A sua volta, la GvHD cronica (cGvHD) è suddivisa in 3 categorie: *progressiva* quando rappresenta la continuazione, oltre i 100 giorni, della condizione acuta, *post-acuta* quando, dopo la risoluzione della fase acuta si ripresenta nuovamente in veste di malattia cronica, *de novo* quando insorge dopo i 100 giorni dal trapianto senza essere preceduta da una fase acuta. Recentemente una nuova classificazione è stata proposta dal NIH e comincia ad essere adottata. Molti studi hanno cercato di individuare tutti i possibili fattori favorevoli all’insorgenza della GvHD. Sicuramente la presenza di disparità per gli antigeni maggiori di istocompatibilità incide nel determinare l’insorgenza della malattia. Studi re-

centi sembrano dimostrare inoltre che la disparità per alcuni antigeni minori di istocompatibilità come l'HA-1 incide in modo significativo sullo sviluppo della GvHD. Importante risulta essere anche l'età del ricevente (l'età avanzata favorisce lo sviluppo di GvHD).

Il sesso del donatore è importante nel determinare la comparsa di GvHD: si ha, infatti, maggior probabilità di sviluppare la malattia quando il trapianto viene effettuato impiegando cellule staminali da donatrice a favore di un ricevente di sesso maschile. Un altro importante fattore in grado di influenzare l'insorgenza della malattia del trapianto contro l'ospite è la sorgente di cellule staminali: midollo, sangue periferico o sangue placentare. Recenti studi hanno documentato come le cellule staminali midollari diano uguali probabilità di sviluppare una aGvHD rispetto alle cellule ottenute da sangue periferico, mentre è dimostrato come queste ultime favoriscano l'insorgenza di cGvHD. L'impiego invece delle cellule staminali placentari, d'altro canto, diminuisce la probabilità di sviluppare sia una GvHD acuta che cronica.

La aGvHD colpisce complessivamente circa il 30-50% dei pazienti trapiantati da familiare HLA identico ed il 50-80% di quelli trapiantati da donatore identico non correlato. La cGvHD è presente in circa il 50% di tutti i trapiantati sopravvissuti a lungo termine.

Nel tentativo di diminuire la morbilità e la mortalità legate alla GvHD sono state impiegate diverse strategie di immunosoppressione.

Al momento, profilassi e terapia della aGvHD si basano sia sull'impiego di tecniche immunomagnetiche, che permettono di depletare il graft dai linfociti T contaminanti, sia sulla somministrazione di farmaci immunosoppressivi variamente combinati tra loro (Ciclosporina, Corticosteroidi, Metotrexate, Tacrolimus, Globulina antilinfocitaria) o in associazione con anticorpi monoclonali (anti IL2 α , CD3, CD2). La terapia della cGvHD si basa, oltre che sull'uso di farmaci immunosoppressori (Prednisone e Ciclosporina, Azatioprina, Talidomide, derivati della vitamina A, Clofazimine e Rapamicina) anche sull'impiego della PUVA terapia nel caso di un interessamento esclusivamente cutaneo da malattia. La somministrazione prolungata della terapia immunosoppressiva espone il paziente ad un elevato rischio infettivo e di ricaduta della malattia di base, favorendo, inoltre, l'insorgenza di neoplasie secondarie. Nei pazienti pediatrici, poi, a tutti questi rischi si associano le gravi limitazioni della crescita, legate alla terapia steroidea ed un impatto fortemente negativo sulla normale vita di relazione. Risulta quindi evidente come uno degli obiettivi primari nella gestione del paziente trapiantato sia rappresentato dalla riduzione o, meglio, dalla possibilità di sospendere la terapia immunosoppressiva mantenendo un adeguato controllo della GvHD.

Rigetto del trapianto di cuore

Il trapianto cardiaco è una tecnica ormai consolidata ma ancor oggi gravata da morbilità e mortalità causate dal rigetto dell'organo trapiantato che si manifesta in forma acuta (durante i primi mesi dopo il trapianto) e cronica (vasculopatia aterosclerotica del trapianto). Il successo dei trapianti d'organo è legato alla possibilità

di immunosoppressione del ricevente con lo scopo di evitare o ridurre al minimo la reazione di rigetto. Le cellule del sistema immunitario coinvolte nel meccanismo del rigetto sono le cellule del sistema monocitico macrofagico e i linfociti T e B. Le reazioni cellulari di rigetto post trapianto sono spesso legate all'esistenza di una incompatibilità nell'ambito del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA I e II). La sopravvivenza dei pazienti è drammaticamente migliorata grazie dopo l'introduzione di farmaci immunosoppressivi quali Ciclosporina, Azatioprina, Prednisone ed eventuale associazione di anticorpi mono o policlonali. Tali presidi, d'altro canto, esplicano una immunosoppressione aspecifica esponendo il paziente al rischio di infezioni opportunistiche, neoplasie secondarie, nonché ai pesanti effetti collaterali dei farmaci stessi. La FCE è indicata nel rigetto del trapianto di cuore, rene e cuore polmone nell'ottica di individuare trattamenti alternativi mirati a sopprimere specifici cloni T cellulari nel ricevente così da ridurre l'incidenza del rigetto senza aumentare la tossicità della terapia immunosoppressiva.

Dopo esperimenti su modelli animali e trials clinici sull'umano, in particolare nel trapianto di cuore, è emerso che la FCE è strategia utile sia nel trattamento che nella prevenzione del rigetto del trapianto di cuore e rene in associazione alla terapia immunosoppressiva standard.

Rigetto del trapianto di polmone

La sola opzione per pazienti con patologie polmonari end-stage è spesso rappresentata dal trapianto di polmone (mono o bilaterale). Nonostante una pesante terapia immunosoppressiva l'incidenza di rigetto cronico che quasi invariabilmente consiste nella bronchiolite obliterante (BOS) è molto elevata.

La BOS è una condizione irreversibile poco responsiva al trattamento farmacologico e i risultati clinici basati sulla sola terapia immunosoppressiva risultano desolanti in termini di sopravvivenza a 5 anni. Una terapia immunomodulante e non immunosoppressiva è approccio attrattivo con la possibilità di controllare la malattia limitando al contempo i gravi effetti collaterali di una immunosoppressione prolungata.

Diversamente dal contesto della GvHD l'obiettivo terapeutico che in questo caso ci si propone è quello di rallentare nel tempo il decadimento dell'organo trapiantato e di scalare contemporaneamente la terapia corticosteroidica e/o degli inibitori delle calcineurine.

Gli ultimi 5 anni hanno registrato un notevole aumento delle procedure di FCE (più di 300 pazienti trattati) con questa indicazione (riconosciuta categoria II secondo ASFA 2013) con risultati incoraggianti soprattutto nel trattamento di lungo periodo (oltre un anno).

Rigetto del trapianto di rene

Il trapianto di rene è storicamente e numericamente la pratica trapiantologica più consolidata e verso la quale si è accumulata l'esperienza più ampia. Nonostante tutto, la problematica della perdita di funzione dell'organo trapiantato unitamente

alla ricomparsa della patologia di base (spesso la glomerulo nefrite) rimangono un problema importante e di elevato impatto sia sociale che economico. L'impatto che la FCE possa avere in questo contesto clinico è ancora da verificare ma i primi risultati segnalati in letteratura, in particolare come riduzione della proteinuria e della cretinemia, incoraggiano l'impostazione di trials clinici ben disegnati.

Malattie diffuse del connettivo

Gli incoraggianti risultati che la FCE ha permesso di ottenere nel trattamento dei linfomi T4 cutanei, nel rigetto del trapianto di cuore e nella GvHD hanno incentivato progetti di studi pilota che prevedono la FCE come terapia di malattie diffuse del connettivo quali la sclerosi sistemica progressiva, il lupus eritematoide e la dermatopolimiosite. I presupposti teorici di tale indirizzo terapeutico risiedono nel tentativo di controllare, mediante la immunomodulazione indotta dalla FCE, malattie per le quali gli attuali farmaci immunosoppressivi, da soli o in associazione, a stento dominano l'evoluzione della malattia stessa.

La FCE è stata proposta in associazione alla classica terapia immunosoppressiva nell'ottica di potenziare la risposta terapeutica e, successivamente, di scalare i farmaci, fino ad individuare la dose minima efficace di mantenimento. Un'altra categoria di pazienti che potrebbe beneficiare della FCE è quella per la quale esista una controindicazione assoluta o relativa all'impiego degli immunosoppressori; la FCE può essere presa in considerazione come terapia di seconda linea dopo una documentata inefficacia degli stessi. D'altra parte, i risultati finora riportati sono sporadici e necessitano di trials clinici controllati. Sarebbe interessante infine valutare l'eventuale efficacia della FCE in pazienti non gravemente compromessi, con malattia non ancora inveterata e con danni d'organo o di tessuto ancora reversibili. I ritmi di trattamento in queste patologie sono tutti da definire: a noi sembra ragionevole passare da un trattamento inizialmente intensivo (es. 2 procedure settimanali per 3-4 settimane, seguiti da 2 procedure quindicinali per 3 settimane a un mantenimento con 2 procedure al mese per almeno 6 mesi). La valutazione della risposta al trattamento dovrà basarsi per ciascun tipo di malattia su criteri internazionali comunemente utilizzati per definire la risposta e tenere conto anche della possibilità di ridurre o abolire la terapia immunosoppressiva.

Le patologie autoimmuni nelle quali la FCE è stata ad oggi proposta sono:

- lichen planus erosivo,
- l'artrite reumatoide,
- l'artrite psoriasica,
- la dermatite atopica intrattabile,
- la sclerosi multipla,
- la miastenia gravis.

FCE: schemi di trattamento

Non esistono attualmente regole precise che stabiliscano la frequenza delle sedute di FCE. Il protocollo ideato ed attualmente in uso presso il nostro Centro prevede

che vengano eseguite inizialmente 2 sedute consecutive settimanali per 3 settimane, seguite, quindi, da 2 sedute quindicinali per 2-3 volte ed infine da 2 sedute mensili. Naturalmente questo schematismo non esclude affatto che si possano trovare altre frequenze di trattamento più o meno intensive secondo caratteristiche del paziente e tipologia di malattia.

La durata complessiva del trattamento è legata alla risposta clinica del paziente, all'andamento dei marcatori bioumorali e strumentali della malattia.

FCE: effetti collaterali e criteri di esclusione

Gli effetti collaterali di questa terapia, nella nostra esperienza, sono minimi e sono stati confermati da uno studio effettuato dal Canadian Study Group. In oltre 15.000 trattamenti eseguiti ad oggi presso il nostro Centro, i brividi risultavano essere presenti nello 0.05%, la cefalea nello 0.01% e la febbre $<38^{\circ}\text{C}$ nello 0.03% delle procedure. Poichè l'FCE consiste nella raccolta di cellule mononucleate, non deve essere presente grave leucopenia (GB possibilmente non inferiori a 1000/ml e conta linfocitaria non inferiore a 200/ml). Vengono inoltre esclusi i pazienti con grave coagulopatia, infarto miocardico recente, compromissione grave dell'apparato cardiovascolare, insufficienza renale e respiratoria gravi, accertata allergia agli psoraleni, infezione in atto e febbre $>38^{\circ}\text{C}$.

Efficacia terapeutica

I risultati clinici più riportati in letteratura riguardano il trattamento della GvHD acuta e cronica sia nel contesto pediatrico che nell'adulto. Negli altri contesti esistono esperienze numericamente meno consistenti. I dati più recenti riguardanti trials clinici controllati nei pazienti (adulti e pediatrici) affetti da aGvHD refrattaria allo steroide o steroide dipendente hanno mostrato una risposta completa nell'86% dei pazienti affetti da aGvHD grado II, nel 55% dei pazienti con grado III e 30% di quelli con grado IV, con trend favorevole sulla mortalità relativa al trapianto nei pazienti che avevano ottenuto una risposta completa (14%) rispetto a quelli che non l'avevano ottenuta (73%). Nei pazienti affetti da cGvHD estesa viene riportata una elevata percentuale di risposta al trattamento con FCE (complessivamente superiore al 70%). Sia nella aGvHD che nella cGvHD responsiva è stato possibile diminuire e in alcuni casi abolire, la terapia immunosoppressiva. I dati ottenuti su 160 pazienti trattati presso il nostro Centro, 65 pediatrici (43 con aGvHD e 22 con cGvHD) e 95 adulti (4 con aGvHD e 91 con GvHD) si attestano sui valori riportati in letteratura dagli altri gruppi.

FCE: quando iniziare?

Considerando gli incoraggianti risultati ottenuti anche nei casi di aGvHD non responsiva ai trattamenti standard è lecito chiedersi se sia auspicabile l'introduzione della FCE come prima linea di trattamento nel paziente affetto da GvHD, in associazione alla classica terapia immunosoppressiva.

La dimostrazione dell'effetto immunomodulante dell'FCE potrebbe far considerare il suo impiego preventivo in quei pazienti riconosciuti a più alto rischio di sviluppare una aGvHD. Nel caso, invece, di cGvHD il nostro gruppo ritiene ragionevole l'introduzione della FCE come seconda linea di terapia, senza aspettare la scarsa risposta o il fallimento delle terapie standard, che spesso portano il paziente ad iniziare il trattamento fotochemioterapico con danni d'organo o tissutali già avanzati (fibrosi). Recentemente ha riscontrato interesse la proposta di utilizzare la FCE addirittura come parte del regime di condizionamento con l'intento di prevenire la GvHD modulando l'attività delle cellule presentanti l'antigene dell'ospite (APC), inducendo di conseguenza la tolleranza al tessuto trapiantato.

FCE: quando smettere e come smettere?

Non esistono dati che indichino come sia meglio agire: sospendere ex abrupto la FCE piuttosto che dilazionare nel tempo le procedure seguendo gli stessi schemi utilizzati per la terapia immunosoppressiva. È difficile stabilire quale sia il miglioramento massimo ottenibile per ciascun paziente e, di conseguenza, prendere la decisione di interrompere il trattamento. Nel nostro Centro si tende a scalare progressivamente la frequenza delle procedure in modo da limitare l'eventuale rischio di ricadute successive. La nostra esperienza ha documentato, infine, nei pazienti responsivi ricaduti, la possibilità di intraprendere nuovamente e con successo, un nuovo ciclo di trattamento.

Il trattamento mediante fotoafèresi dei pazienti affetti da GvHD, aveva come pregiudiziale il timore che questa terapia potesse aumentare i rischi di ricaduta della malattia di base e predisporre il paziente a sviluppare infezioni. In realtà non nessuno studio ha mai evidenziato un rischio infettivo aumentato né un'aumentata incidenza di ricaduta.. Talvolta, a causa della modesta emodiluizione, si possono osservare una moderata piastrinopenia ed anemia indotta, soprattutto nei pazienti di piccolo peso (al di sotto dei 30 kg). Il basso peso corporeo di alcuni pazienti pediatrici (sotto i 10 kg) inoltre, non controindica la procedura, a patto che vengano adottate alcune norme prudenziali (priming del separatore con globuli rossi concentrati) al fine di ridurre al minimo i rischi di scompenso emodinamico legati al volume di extracorporea.

Conclusioni

La fotochemioterapia extracorporea dopo una fase iniziale di diffidenza e perplessità ha conquistato un ruolo importante nel trattamento di gravi patologie immuni ed autoimmuni. La sicurezza del trattamento unitamente ad effetti collaterali davvero modesti hanno incoraggiato la diffusione di questo approccio terapeutico e invitato ad impostare trials clinici di ampio respiro.

Da ultimo, considerati i buoni risultati ottenuti in patologie come la GvHD e il rigetto del trapianto d'organo solido, stanno concretizzandosi diverse proposte innovative volte ad utilizzare la FCE come approccio di prima linea con la filosofia di prevenire il danno d'organo piuttosto che ripararlo.

Bibliografia

1. Sniecinski I. Extracorporeal photochemotherapy: a scientific overview. *Transfus Sci.* 1994; 15: 429-437.
2. Smith EP, Sniecinski I, Dagens AC, Parker PM, Snyder DS, Stein AS, Nademanee A, et al. Extracorporeal photochemotherapy for treatment of drug-resistant graft-vs.-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation. J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 1998; 4: 27.
3. Heshmati F, Andreu G. Extracorporeal photochemotherapy: a historical perspective. *Transfus Apher Sci.* 2003; 28: 25-34.
4. Edelson R, Berger C, Gasparro F. Treatment of cutaneous T-Cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N Engl J Med.* 1987; 316: 297-303.
5. Transplantation Study Group, Barr ML, Meiser BM, Eisen HJ, Roberts RF, Livi U, Dall'Amico R, Dorent R, Rogers JG, Radovancević B, Taylor DO, Jeevanandam V, Marboe CC. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. *Photopheresis N Engl J Med.* 1998; 339 (24): 1744-1751.
6. Socie G, Stone JV, Wingard JR, Weisdorf D, Henslee-Downey PJ, Bredeson C, et al. Late effects working committee of the international bone marrow transplant registry. Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1999; 341: 14-21.
7. Messina C, Locatelli F, Lanino E, Uderzo C, Zacchello G, Cesaro S, et al. Extracorporeal photochemotherapy for paediatric patients with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2003; 122: 118-127.
8. Curtis RE, Metayer C, Rizzo JD, Socié G, Sobocinski KA, Flowers ME, Travis WD, et al. Impact of chronic GVHD therapy on the development of squamous-cell cancers after hematopoietic stem-cell transplantation: an international case-control study. *Blood.* 2005; 105: 3802-3811.
9. Andreu G, Leon A, Heshmati F, Tod M, Menkes CJ, Baudelot J, Laroche L. Extracorporeal photochemotherapy: evaluation of two techniques and use in connective tissue disorders. *Transfus Sci.* 1994; 15: 443-454.
10. Perotti C, Torretta L, Viarengo G, Roveda L, Bernuzzi S, Carbone S, Del Fante C, et al. Feasibility and safety of a new technique of extracorporeal photochemotherapy: experience of 240 procedures. *Haematologica.* 1999; 84: 237-241.
11. Greinix HT, Socie G, Bacigalupo A, Holler E, Edinger MG, Apperley JF, et al. Assessing the potential role of photopheresis in hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38: 265-273.
12. Flowers ME, Apperley JF, van Besien K, Elmaagacli A, Grigg A, Reddy V, et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2008; 112: 2667-2674.
13. Foss FM, DiVenuti GM, Chin K, Sprague K, Grodman H, Klein A, et al. Prospective study of extracorporeal photopheresis in steroid-refractory or steroid-resistant extensive chronic graft-versus-host disease: analysis of response and

- survival incorporating prognostic factors. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35: 1187.
14. Del Fante C, Scudeller L, Viarengo G, Bernasconi P, Perotti C. Response and survival of patients with chronic graft-versus-host disease treated by extracorporeal photochemotherapy: a retrospective study according to classical and National Institutes of Health classifications. *Transfusion.* 2012; 52 (9): 2007-2015.
 15. Remund K, Rechsteiner T, Guo Z, Hofer M, Boehler A. Extracorporeal photopheresis in a rat model of pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res.* 2009; 35 (5): 359-370.
 16. Morrell MR, Despotis GJ, Lublin DM, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. The efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2010; 29 (4): 424-431.
 17. Russo GE, D'Angelo AR, Testorio M, Mazza F, Borzacca B, Cicchinelli A, et al. New therapeutic prospects for renal transplant: extracorporeal photochemotherapy. *G Ital Nefrol.* 2012; 29 (Suppl.) 54: S36-339.

**TERAPIA CELLULARE RIGENERATIVA
PER DANNI D'ORGANO:
ALCUNI ESEMPI**

Le terapie con cellule staminali per la cura dell'infarto del miocardio: dal bancone al letto del paziente

Massimiliano Gnechchi^{1,2,3}, Patrizia Danieli², Manuela Mura², Maria Chiara Ciuffreda², Federica Pisano², Giuseppe Malpasso², Francesco Copes², Kamilia Laarej², Riccardo Bariani², Martina Rabino²

¹Dipartimento di Medicina Molecolare, Unità di Cardiologia, Università di Pavia;

²Divisione di Cardiologia, Laboratorio di Cardiologia Sperimentale (C.C.U), Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico San Matteo, Pavia;

³Dipartimento di Medicina, Università di Cape Town, Sudafrica

L'uso delle cellule staminali è emerso come una potenziale alternativa terapeutica per la rigenerazione/riparazione tissutale in diverse malattie, tra le quali patologie cerebrali, muscolari, pancreatiche e cardiache. La scoperta che le cellule staminali embrionali e adulte (ASC) sono in grado di differenziare in cardiomiociti (CMC), cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) e cellule endoteliali (EC) ha stimolato studi focalizzati sull'uso delle cellule staminali come terapia rigenerativa per le malattie cardiovascolari. Le terapie rigenerative e riparative rivestirebbero particolare importanza per il trattamento delle patologie cardiache le quali, nonostante i progressi nelle terapie mediche e interventistiche, rimangono ad oggi tra le principali cause di morbilità e mortalità (1). In particolare, gli attuali approcci terapeutici per la cura dell'insufficienza cardiaca congestizia (ICC) sono solamente in grado di ritardare la progressione della malattia (2). L'infarto del miocardio (IM) è la più comune causa di ICC, specialmente nei pazienti colpiti da un infarto di grosse dimensioni. La terapia cellulare è stata quindi proposta come possibile strategia alternativa per trattare l'IM e guarire o prevenire l'ICC. In questo capitolo, esaminiamo la ricerca di base e i primi risultati clinici della terapia con ASC per l'IM.

Vecchi e nuovi dogmi sull'infarto del miocardio

L'infarto miocardico acuto (IMA) è causato dall'improvvisa chiusura di un'arteria coronarica causata nella maggior parte dei casi dalla formazione di un trombo intracoronarico. La riperfusione dell'arteria correlata all'infarto (ACI) tramite intervento percutaneo primario o trombolisi rappresenta la più efficace terapia per l'IMA. Con l'avvento delle terapie riperfusivo, l'istituzione delle unità di cure

intensive e l'introduzione di nuovi farmaci efficaci tra cui i beta-bloccanti e gli ACE-inibitori, l'insorgenza di complicanze nei pazienti colpiti da IMA è stata ridotta e l'aspettativa di vita migliorata. Nonostante questi progressi, l'IMA produce ancora una significativa morbidità e mortalità specialmente nei pazienti che non riescono ad essere ripersi in tempo utile. Nei pazienti con un infarto di grandi dimensioni, subentra un processo di rimodellamento ventricolare patologico che nella maggior parte dei casi conduce a ICC. Infatti, in seguito a IMA, i CMC iniziano a morire a partire dall'endocardio. Se il flusso sanguigno non è ripristinato entro 6 ore, tutto il tessuto cardiaco perfuso dall'ACI va incontro a necrosi o apoptosi. La perdita di miocardio innesca un complesso processo multicellulare atto a riparare il tessuto danneggiato e a mantenere l'integrità strutturale del ventricolo sinistro. Differenti tipi di cellule infiammatorie sono chemo-attratte nell'area infartuata e partecipano al riparo tissutale (3). Questa fase infiammatoria precoce è normalmente seguita da una fase fibrogenica che conduce alla formazione della cicatrice infartuale. Inoltre, i CMC sopravvissuti diventano ipertrofici per compensare la perdita di tessuto contrattile. Nell'uomo, il processo di guarigione richiede da 6 a 8 settimane e determina cambiamenti progressivi nella dimensione, nella forma e nella funzione ventricolare. Fino a poco tempo fa si riteneva che il rimodellamento del ventricolo sinistro fosse un processo irreversibile dal momento che il cuore era considerato un organo post-mitotico privo di qualsiasi capacità di autorinnovamento. Tuttavia recenti evidenze di CMC proliferanti identificati nel cuore postnatale (4), la scoperta di cellule staminali cardiache residenti (CSC) (5, 6) unite alla dimostrazione che cellule staminali derivate dal midollo osseo (BM) sono in grado di attecchire nel cuore e transdifferenziare in CMC (7), hanno messo in discussione il vecchio dogma secondo il quale il cuore è un organo post-mitotico e suggeriscono l'affascinante ipotesi che sia possibile ottenere una rigenerazione miocardica terapeutica.

Cellule staminali per il riparo cardiaco

La cellula staminale ideale per la rigenerazione e il riparo cardiaco dovrebbe essere facilmente isolabile, utilizzabile in maniera autologa, mostrare controllo proliferativo ed essere in grado di differenziare in CMC, VSMC ed EC. Le due principali categorie di cellule finora considerate sono le cellule staminali embrionali (ES) e le ASC.

Le ES umane vengono isolate dalla massa cellulare più interna nelle fasi precoci dello sviluppo della blastocisti embrionale (8) e soddisfano tutti i criteri più stringenti stabiliti dalla definizione di cellule staminali: sono clonogeniche, in grado di autorinnovarsi e pluripotenti, cioè in grado di dare origine a tipi cellulari differenziati e funzionalmente maturi appartenenti a tutti e tre i foglietti embrionali. Queste proprietà renderebbero le ES ottimali per la medicina rigenerativa. Tuttavia, l'uso delle ES è associato a rilevanti problematiche etiche, legali e di sicurezza che limitano la loro applicazione in clinica. Ad esempio, le ES trapiantate sono soggette a rigetto immunologico e il trapianto di ES può causare la formazione di teratomi.

Le ASC esistono nella maggior parte dei tessuti e sono responsabili del rinnovamento e della rigenerazione tissutale nel corso della vita. Rispetto alle ES, le ASC sono multipotenti e non pluripotenti. Un'altra differenza risiede nel fatto che le ASC non possono essere espanse indefinitamente in coltura come le ES. Nonostante questi limiti le ASC offrono diversi potenziali vantaggi per la rigenerazione tissutale. In primo luogo, le ASC possono essere prontamente isolate ed espanse *ex vivo* da prelievi tissutali biotipici, offrendo quindi la possibilità di un trapianto autologo senza la necessità di terapie immunosoppressive. In secondo luogo, le ASC sono adatte al trapianto allogenico. Inoltre, le ASC possono essere modificate geneticamente e sono quindi utilizzabili come vettori di geni terapeutici in grado di potenziare le loro proprietà terapeutiche (9). Inoltre, l'uso terapeutico delle ASC non è ostacolato dalle restrizioni legali ed etiche cui sono soggette le ES. Infine, è stato suggerito che le ASC possiedono un certo grado di plasticità e potrebbero essere in grado di transdifferenziare (10). I tre tipi di cellule più importanti per il riparo cardiaco sono: le cellule mononucleate derivate dal BM (BM-MNC), le cellule staminali mesenchimali (MSC) e le cellule staminali cardiache (CSC). Le BM-MNC sono ben caratterizzate e sono state utilizzate nella maggioranza dei trials clinici effettuati finora. In origine si riteneva che lo stroma del BM fosse principalmente un supporto strutturale per le cellule staminali ematopoietiche e progenitrici. L'ipotesi che la rigenerazione/riparo tissutale potesse essere ottenuta da cellule circolanti nel flusso sanguigno è stata proposta già a partire dalla metà del diciannovesimo secolo da Cohnheim (11), e le recenti osservazioni sulla plasticità di queste cellule hanno largamente rivitalizzato questa ipotesi. Infatti, è ora chiaro che le BM-MNC sono una popolazione eterogenea di cellule che comprende cellule staminali ematopoietiche (HSC), le cosiddette "side population cells" (7), MSC (12), cellule progenitrici adulte multipotenti (MAPC) (13) e cellule progenitrici endoteliali (EPC). L'uso di BM-MNC per le malattie cardiovascolari presenta il vantaggio che il BM è di facile accesso ed è una fonte autologa. Inoltre, le BM-MNC sono piuttosto semplici da isolare, generano un numero di cellule sufficiente per l'utilizzo in clinica e la loro preparazione non necessita manipolazione *ex vivo* prolungata.

Le MSC sono molto rare, esistono ad una frequenza stimata di circa 1 su 100.000 cellule del BM (12), e vengono identificate come cellule in grado di aderire alla plastica. Le MSC possono essere facilmente isolate ed espanse *ex vivo* per numerosi passaggi senza alterazioni del fenotipo e delle proprietà biologiche. Colture di MSC sono state caratterizzate utilizzando un pannello di anticorpi specifici: tuttavia ad oggi non esiste una definizione di MSC univoca dal momento che il medium di coltura e il siero utilizzato per coltivare le cellule, la densità di semina e la tensione dell'ossigeno ne influenzano il fenotipo. In generale è ampiamente accettato che le MSC sono negative per i marcatori CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 e HLA-DR ma esprimono SH2 (CD105), SH3 and SH4 (CD73), CD90, CD29 e CD166 (15). Caratteristiche peculiari rendono le MSC particolarmente interessanti per la terapia cellulare e per applicazioni in ingegneria tissutale. Ad esempio, le MSC possono essere isolate, espanse *ex vivo* e utilizzate in maniera autologa, senza il problema di trovare un donatore compatibile. Inoltre, è stato

suggerito che le BM-MSC siano immunoprivilegiate (16) e la sicurezza e l'efficacia del trapianto allogenico di BM-MSC è stato dimostrato dal trial POSEIDON (17). Un'altra caratteristica vantaggiosa delle MSC è la facilità con cui possono essere modificate *ex-vivo* mediante vettori virali (18); sovraesprimendo specifici geni d'interesse, la funzionalità delle MSC può essere aumentata (19). Inoltre, le MSC possono essere utilizzate come piattaforme per traghettare specifiche proteine solubili nel sito del danno. (9). Oltre che dal BM, le MSC sono state isolate da svariati altri tessuti: grasso, sangue cordonale e placenta sono i più comuni (12). La scoperta di CSC residenti ha fornito una possibile spiegazione al rinnovamento dei CMC nel miocardio adulto. Numerose popolazioni di CSC sono state identificate e caratterizzate incluse le cellule c-Kit⁺, cellule derivate dalle cardiosfere (CDC), cellule Sca-1⁺, cellule SP e cellule esprimenti la proteina Islet-1 (5, 6). Le CSC sono in grado di autorinnovarsi a lungo termine e sono in grado di differenziare in EC, VSMC e CMC funzionalmente integrati con il miocardio nativo circostante. Inoltre, queste cellule sono autologhe e possono essere espanse *ex vivo*, pertanto sembrano possedere tutte le proprietà necessarie per ottenere la rigenerazione cardiaca.

Effetti funzionali e strutturali delle ASC su cuori infartuati

ASC isolate da topo, ratto, suini e umani sono state somministrate in modelli sperimentali di legatura coronarica permanente, ischemia/riperfusion (I/R) e criodanno. In questi studi, il tempo di somministrazione varia da pochi minuti a 4 settimane. Inoltre, sono state testate diverse vie di somministrazione: iniezione intramiocardica diretta (IM), iniezione trans-coronarica, infusione sistemica intravenosa. Una gran varietà di parametri è stata impiegata per quantificare l'effetto del trapianto di cellule staminali nei cuori infartuati: le analisi morfometriche tradizionali hanno documentato una generale riduzione della dimensione dell'infarto, un rimodellamento ventricolare patologico meno severo e un'aumentata vascolarizzazione (20).

Inoltre, la somministrazione di ASC migliora la funzionalità ventricolare nella maggioranza dei casi, determinata con misurazione della pressione intra-ventricolare, ecocardiografia, risonanza magnetica nucleare, mappatura NOGA endo-ventricolare o cristalli ultrasonici, utilizzati per determinare il movimento della parete lungo la regione infartuata dei cuori di grossi animali in seguito a trapianto cellulare.

Meccanismo di azione delle ASC nel riparo cardiaco

Il transdifferenziamento delle cellule trapiantate in CMC e in cellule della linea vascolare è stato originariamente proposto come il principale meccanismo d'azione terapeutico delle ASC (21, 22). Tuttavia, altri ricercatori non hanno rilevato un attecchimento permanente delle cellule midollari trapiantate (23, 24). Inoltre, sono stati riportati eventi di fusione delle cellule del donatore derivate dal BM con i CMC riceventi (24, 25). Infine, ad oggi non è stato possibile indurre in modo

riproducibile le ASC verso un fenotipo cardiaco maturo *in vitro* utilizzando fattori di crescita fisiologici o composti chimici non-tossici. Questi risultati negativi hanno messo in discussione la plasticità delle ASC sia endogene che trapiantate. In diversi casi è stato evidenziato che il numero di cardiomiociti generati *de novo* dalle ASC è troppo basso per giustificare i significativi miglioramenti della funzionalità cardiaca osservati. È stato quindi proposto che i benefici funzionali fossero prodotti dall'azione paracrina di fattori solubili rilasciati dalle ASC sul tessuto cardiaco nativo e sui progenitori endoteliali residenti (19, 26-29). Questi fattori sono in grado di favorire la neovascolarizzazione, la citoprotezione e la rigenerazione cardiaca endogena. Inoltre, l'infiammazione post infartuale e i processi fibrogenici, la contrattilità cardiaca e il metabolismo cardiaco possono anch'essi essere positivamente influenzati per via paracrina.

Il nostro gruppo ha tra i primi proposto l'ipotesi paracrina dimostrando che le BM-MSc esercitano azioni citoprotettive sui CMC ischemici. In particolare, abbiamo dimostrato che il brodo di coltura condizionato dalle MSC ipossiche può ridurre l'apoptosi e la necrosi di CMC isolati da ratto esposti a bassa tensione di ossigeno (19). L'effetto citoprotettivo era fortemente aumentato in MSC over-esprimenti il gene Akt-1 (Akt-MSc) *in vitro*. Per validare ulteriormente le proprietà protettive delle Akt-MSc, abbiamo studiato gli effetti del CM *in vivo*, utilizzando un modello sperimentale di ratto. Abbiamo riportato che la dimensione dell'infarto e l'indice apoptotico dei CMC era significativamente ridotto in animali trattati con medium condizionato concentrato ottenuto da Akt-MSc rispetto ai controlli. Questi risultati sono stati replicati con successo in un modello di grosso animale: Akt-MSc iniettate in cuori infartuati di maiale limitano la dimensione dell'infarto e preservano la funzione cardiaca (30). Inoltre, altri gruppi hanno confermato gli effetti paracrini citoprotettivi esercitati dalle cellule staminali derivate dal BM sui CMC ischemici (31).

Oltre ad esercitare effetti citoprotettivi, i fattori paracrini rilasciati dalle cellule staminali trapiantate sono in grado di alterare la matrice extracellulare e indurre un rimodellamento post-infartuale più favorevole e un rafforzamento della cicatrice infartuale (27). È stato inoltre suggerito che le ASC possano influenzare il metabolismo e la contrattilità cardiaca (32). Altre prove suggeriscono un'ulteriore interessante ipotesi: il trapianto di cellule staminali esogene può attivare le CSC residenti e/o stimolare la replicazione delle CMC per via paracrina, migliorando pertanto la rigenerazione cardiaca endogena, stimolando le CSC c-kit⁺ e promuovendo la replicazione dei CMC (33).

Studi clinici con l'uso di cellule staminali adulte per l'IMA

Sulla base dei risultati positivi ottenuti nei modelli animali, i clinici hanno iniziato a testare le terapie basate sull'uso delle ASC anche nell'uomo. Per la prima volta nel 2001, BM-MSc autologhe non frazionate sono state usate nel trattamento clinico dell'insufficienza del ventricolo sinistro (LV) conseguente ad IMA in un paziente di 46 anni (34). Nello stesso anno è stata effettuata la prima iniezione intramiocardica di BMC(CD133⁺) ad un paziente che aveva sviluppato ICC dopo

IM durante l'impianto di un bypass coronarico (35). Sono stati in seguito intrapresi una serie di trials clinici di fase I di sicurezza e fattibilità su piccola scala finalizzati a valutare l'uso delle ASC per il trattamento delle malattie cardiache acute e croniche (36). Una grande varietà di cellule e strategie sono state utilizzate in questi studi.

La maggior parte degli scienziati si è focalizzata sulle BMC totali e sulle MNC. Altri hanno somministrato sottopopolazioni CD34⁺ o CD133⁺ isolate da BM-MNC o MNC isolate da sangue periferico. La via di somministrazione maggiormente utilizzata in pazienti con IMA è stata l'infusione intracoronarica ma anche l'iniezione intramiocardica è stata testata. I risultati ottenuti finora suggeriscono che la terapia cellulare basata sull'uso di ASC ottenute da BM sia fattibile e sicura. Tuttavia, da questi primi trials clinici di fase I non-randomizzati, limitati in termini di numero di pazienti e spesso non controllati, non è possibile estrapolare nessun dato definitivo circa l'efficacia clinica della terapia con ASC. Nondimeno, la quasi totalità di questi studi ha riportato un miglioramento dei parametri clinici e strumentali dei pazienti che ricevevano la terapia cellulare.

Informazioni circa la potenziale efficacia clinica della terapia cellulare in pazienti colpiti da IMA possono essere ricavati dagli studi randomizzati controllati effettuati finora. Il trial BOOST è stato il primo studio randomizzato controllato che ha testato il trapianto di cellule staminali in pazienti con IMA trattati efficacemente mediante intervento coronarico percutaneo (PCI) (37).

La MRI cardiaca a 6 mesi ha mostrato un miglioramento della frazione di eiezione (FE) del LV e della wall motion in pazienti trattati con infusione intracoronarica di BM-MNC autologhe rispetto ai controlli. Tuttavia, tale differenza non era più presente dopo 18 mesi (38). È importante notare che il trapianto cellulare non era associato con avventi clinici avversi. Il REPAIR-AMI è attualmente uno dei più grandi trial multicentrici, randomizzati per la terapia cellulare cardiaca (39). I pazienti arruolati dopo essere stati sottoposti a procedura PCI coronata da successo, sono stati randomizzati al trattamento con infusione intracoronarica di cellule da BM o placebo.

Dopo 4 mesi è stato osservato un miglioramento della FE assoluta, misurata con angiografia, nei pazienti che ricevevano il trattamento con le cellule rispetto ai controlli. Tale effetto benefico era maggiore nei pazienti in cui la FE di partenza era peggiore. A 12 mesi gli end-point pre-specificati di morte, IM o necessità di rivascolarizzazione è risultata significativamente ridotta nel gruppo BM-MNC (40). Inoltre, la somministrazione di BM-MNC risultava essere un indicatore indipendente della prognosi clinica.

L'ottimismo scaturito dai risultati del REPAIR-AMI è parzialmente controbilanciato dai risultati di uno studio randomizzato placebo-controllo più piccolo che non ha registrato alcun miglioramento significativo della FE misurata con MRI, dopo somministrazione di cellule derivate da BM (41). Tuttavia, in questo studio la dimensione dell'infarto e la wall motion regionale risultava migliorata nel gruppo trattato con cellule da BM. È stato suggerito che le discrepanze tra i risultati dei due trials possa essere in parte spiegato dalle differenze nei protocolli di preparazione e conservazione delle cellule (42). Più recentemente,

due trials clinici multicentrici randomizzati di fase II condotti in doppio cieco e con gruppo placebo di controllo (TIME e LateTIME) sono stati effettuati utilizzando due tempi di somministrazione intracoronarica delle cellule: pochi giorni o poche settimane dopo IMA (43, 44). Con disappunto, è stato osservato che la somministrazione di BMC non aveva effetti significativi sul recupero della funzionalità globale o regionale del LV indipendentemente dal tempo di somministrazione. Inoltre, i risultati dello SWISS-AMI, un trial multicentrico di fase II randomizzato e controllato condotto in Svizzera, non hanno evidenziato differenze nella FE tra pazienti trattati con BMC o con le terapie convenzionali allo stato dell'arte (45).

Un potenziale limite di questi studi è rappresentato dal fatto che le cellule da BM non selezionate somministrate ai pazienti non sono caratterizzate. Riteniamo che la risposta definitiva circa l'efficacia clinica delle BM-MNC sarà fornita dal trial BAMI (The Effect of Intracoronary Reinfusion of Bone Marrow-derived Mononuclear Cells on all-cause Mortality in Acute Myocardial Infarction), uno studio di fase III internazionale, multicentrico, randomizzato, open-label e controllato (Trial Registration: clinicaltrials.gov - Identifier: NCT01569178). Lo studio arruolerà 3000 pazienti eleggibili, con IMA da moderato a esteso già sottoposti ad intervento di PCI coronato da successo entro 24 ore dall'insorgenza dei sintomi e con $FE \leq 45\%$.

Un totale di 1.550 partecipanti riceveranno infusione intracoronarica di BM-MNC non selezionate e il loro esito clinico sarà confrontato con un gruppo di controllo di 1500 pazienti trattati con le migliori cure mediche disponibili.

L'obiettivo primario dello studio è dimostrare che una singola infusione intracoronarica di BM-MNC autologhe è sicura e riduce la mortalità. Entro sei-sette anni probabilmente sapremo se la somministrazione di BM-MNC potrà rappresentare un'alternativa terapeutica per i nostri pazienti oppure se questa strategia è solamente un approccio troppo semplicistico per traslare la terapia cellulare dal bancone al letto del paziente.

Nel frattempo è stato effettuato il primo trial di fase I, randomizzato, controllato per determinare la sicurezza e la fattibilità dell'infusione intracoronarica di una popolazione di progenitori cardiaci dopo IMA (46). Il CADUCEUS ha dimostrato che l'isolamento di CDC da biopsie endomiocardiche è fattibile e la loro infusione è sicura. I risultati suggeriscono che l'infusione delle CDC migliora la funzione ventricolare, riduce la dimensione dell'infarto e aumenta la vitalità del tessuto. Tuttavia, questi incoraggianti risultati dovranno essere confermati in più grandi trials placebo-controllo.

Infine, nella metà del 2012 è stato completato uno studio di fase I, non-randomizzato, open-label, multicentrico per determinare la sicurezza del trattamento con dosi crescenti di MultiStem[®], un prodotto derivato da cellule staminali allogeneiche da BM, somministrate tramite catetere endomiocardico in pazienti colpiti da IMA recente e sottoposti all'impianto di uno stent. I risultati dimostrano che la terapia con MultiStem[®] è ben tollerata e sicura. In particolare, in pazienti con un grave danno miocardico, la somministrazione di MultiStem[®] aumenta significativamente la FE e lo stroke volume dopo 4 mesi (47).

Prospettive future

Sebbene la terapia con cellule staminali rappresenti una promessa per il trattamento dell'IM, il suo utilizzo è attualmente limitato da difficoltà biologiche e tecnologiche. Uno dei più principali problemi è rappresentato dall'estensiva perdita di cellule dopo il trapianto.

Molti studi hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule efficacemente indirizzate al cuore muoiono entro le prime settimane (27). Le cause della morte cellulare nell'area infartuale sono multifattoriali ed influenzate dall'ambiente ischemico, che è privo di nutrienti ed ossigeno, combinato con la perdita di segnali di sopravvivenza cellulare provenienti dal legame con la matrice e dalle interazioni cellula-cellula.

Il nostro gruppo insieme con altri ha concettualizzato l'idea di migliorare la sopravvivenza cellulare over-esprimendo geni protettivi (9). Al fine di ottimizzare questo approccio, si potrebbe pensare di utilizzare geni citoprotettivi multipli che agiscono su diverse pathways di morte cellulare e apoptosi.

Recentemente, è stato inoltre proposto che il pre-condizionamento delle cellule staminali con diverse citochine potrebbe risultare in un aumentato attecchimento cellulare (48). La combinazione della modificazione genetica e del pre-condizionamento potrebbe fortemente intensificare la sopravvivenza cellulare e l'attecchimento. Un metodo alternativo potrebbe essere seminare le cellule *ex vivo* su matrici polimeriche biodegradabili da iniettare nel sito del danno al posto delle sole cellule (49).

Altre problematiche irrisolte sono i dubbi di efficacia e sicurezza correlati a cambiamenti nell'espressione genica e nelle proprietà funzionali delle ASC isolate da pazienti di età avanzata o affetti da patologie. Le proprietà di auto-rinnovamento e la potenzialità differenziativa di cellule isolate da pazienti ad alto rischio potrebbe essere compromessa. Sia l'età del donatore che la presenza di vari stati patologici potrebbero influenzare negativamente le caratteristiche delle ASC. Ad esempio, EPC da pazienti con malattie cardiovascolari mostrano diversi gradi di compromissione funzionale ed è stata riportata una correlazione inversa tra il numero di EPC circolanti e la prevalenza di fattori di rischio per CAD (50). Se queste deficienze fossero dimostrate anche per altri tipi di ASC, il trattamento individualizzato basato sull'uso autologo delle cellule isolate dal paziente stesso potrebbe non essere una strategia terapeutica efficace.

Lo sviluppo di protocolli basati sull'uso delle cellule per il trapianto cardiaco deve considerare la complessità morfologica ed istologica del miocardio. L'idea che iniettare cellule staminali possa risultare nella rigenerazione di nuovo tessuto cardiaco funzionalmente competente potrebbe essere eccessivamente semplicistica. Il miocardio comprende una gran varietà di tipi cellulari tra cui CMC, fibroblasti, cellule endoteliali e altre cellule vascolari inserite in una complessa matrice extracellulare che fornisce la struttura portante per la corretta disposizione tridimensionale dei vari componenti necessaria per il corretto funzionamento meccanico e strutturale. Questo livello di complessità suggerisce cautela nel disegnare protocolli di trapianti di un singolo tipo cellulare. È infatti possibile che la procedura di

trapianto ottimale per il riparo cardiaco richieda più di un tipo cellulare e/o biomateriali per produrre un innesto che sia in grado di riprodurre la normale funzione cardiaca. A tal proposito, crediamo fortemente che l'ingegneria tissutale potrebbe giocare un ruolo chiave e determinare un sostanziale avanzamento nel campo della medicina rigenerativa (51). Recentemente sono state sviluppate tecnologie per derivare scaffold naturali da organi tra cui membrana amniotica della placenta, la strato submucoso intestinale, scaffold di cuore decellularizzato, matrice naturale combinata con fibrina, gelatina e fibronectina oppure hydrogel ingegnerizzati e acido poli-(lattico-co-glicolico, PLGA) che potrebbero essere utilizzati sia per migliorare la ritenzione cellulare intrappolando le cellule in situ sia per ricostruire strutturalmente l'area danneggiata. La tecnologia degli scaffold consente anche di combinare specifiche citochine o fattori di crescita per incrementare la capacità miogenica o angiogenica delle cellule impiantate, al fine di proteggere sia le cellule impiantate che i CMC sopravvissuti nell'area peri-infartuale dall'ambiente ischemico (52).

Infine, la dimostrazione di meccanismi autocrini/paracrini ha migliorato la nostra comprensione della biologia e dell'azione delle ASC nel riparo e nella rigenerazione tissutale. È ormai evidente che il miglioramento nella funzionalità cardiaca conseguente alla terapia cellulare può essere attribuita principalmente al rilascio di fattori paracrini chiave da parte delle cellule staminali nel microambiente del miocardio infartuato. Sempre nuove evidenze suggeriscono che queste molecole secrete mediano numerosi meccanismi protettivi tra cui la sopravvivenza cellulare, la neovascolarizzazione, il rimodellamento e la proliferazione. I meccanismi regolatori che governano il rilascio di fattori paracrini sembrano essere complessi e influenzati da parametri spazio-temporali. Progressi nel campo delle tecnologie di profiling identificano sempre nuovi fattori secreti che mediano meccanismi di riparo cardiaco.

La somministrazione dei soli fattori solubili in sostituzione delle cellule staminali potrebbe essere traslato più facilmente alla pratica clinica dal momento che presenta numerosi ovvi vantaggi. Questa strategia consentirebbe infatti di by-passare la maggior parte delle problematiche associate alla terapia cellulare, ovvero la compatibilità immunitaria, la tumorigenicità, le infezioni xeno- e zoo-geniche e i tempi d'attesa richiesti per l'espansione cellulare *ex-vivo* delle preparazioni cellulari autologhe. In maniera più pragmatica, potrebbe essere possibile produrre medium condizionato di grado clinico da cellule che hanno dimostrato specifiche capacità paracrine e approfittare degli effetti benefici di tutti i fattori secreti da queste cellule piuttosto che selezionarne solo alcuni. Un tale approccio avrebbe un enorme potenziale per lo sviluppo di prodotti "off-the-shelf" derivati dalle cellule staminali.

Ringraziamenti

Massimiliano Gnechi è finanziato dal "Ministero Italiano della Sanità" (GR-2008-1142871, GR-2010-2320533 e RF-IAI-2008-1216776), dal "Ministero italiano degli Affari Esteri", dal "Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca" (2010-BWY8E9) e dalla "Fondazione Cariplo" (2007-5984).

Bibliografia

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380: 2095-2128.
2. McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet*. 2005; 365: 1877-1889.
3. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res*. 2000; 46: 250-256.
4. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1750-1757.
5. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*. 2005; 85: 1373-1416.
6. Parmacek MS, Epstein JA. Pursuing cardiac progenitors: regeneration redux. *Cell*. 2005; 120: 295-298.
7. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001; 107: 1395-1402.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282: 1145-1147.
9. Melo LG, Pachori AS, Gneocchi M, Dzau VJ. Genetic therapies for cardiovascular diseases. *Trends Mol Med*. 2005; 11: 240-250.
10. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003; 102: 3483-3493.
11. Cohnheim JF. *Über Entzündung und Eiturgung*. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*. 1867; 40: 1-79.
12. Gneocchi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol*. 2012; 57: 48-55.
13. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418: 41-49.
14. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999; 85: 221-228.
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8: 315-317.
16. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005; 2: 8.
17. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesen-

- chymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*.2012; 308: 2369-2379.
18. Dzau VJ, Gneocchi M, Pachori AS. Enhancing stem cell therapy through genetic modification. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 1351-1353.
 19. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005; 11: 367-368.
 20. Melo LG, Pachori AS, Kong D, Gneocchi M, Wang K, Pratt RE, et al. Molecular and cell-based therapies for protection, rescue, and repair of ischemic myocardium: reasons for cautious optimism. *Circulation*. 2004; 109: 2386-2393.
 21. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410: 701-705.
 22. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002; 105: 93-98.
 23. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, et al. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004; 428: 664-668
 24. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. 2004; 10: 494-501.
 25. Noiseux N, Gneocchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*. 2006; 14: 840-850.
 26. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006; 20: 661-669.
 27. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008; 103: 1204-1219.
 28. Mirosou M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gneocchi M, Dzau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 50: 280-289.
 29. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996; 166: 585-592.
 30. Lim SY, Kim YS, Ahn Y, Jeong MH, Hong MH, Joo SY, et al. The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model. *Cardiovasc Res*. 2006; 70: 530-542.
 31. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res*. 98: 2006; 1414-1421.

32. Gneocchi M, He H, Melo LG, Noiseaux N, Morello F, de Boer RA, et al. Early beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. *Stem Cells*. 2009; 27: 971-979.
33. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010; 107: 913-922.
34. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, et al. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001; 126: 932-938.
35. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-46.
36. Dauwe DF, Janssens SP. Stem cell therapy for the treatment of myocardial infarction. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 3328-3340.
37. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004; 364: 141-148.
38. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. 2006; 113: 1287-1294.
39. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006; 355: 1210-1221.
40. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. REPAIR-AMI Investigators. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J*. 2006; 27: 2775-2783.
41. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006; 367: 113-121.
42. Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007; 28: 766-772.
43. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, et al. Cardiovascular cell therapy research network. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute

- myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA*. 2011; 306: 2110-2119.
44. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, et al. Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA*. 2012; 308: 2380-2389.
 45. Surder D, Manka R, Lo Cicero V, Moccetti T, Rufibach K, Soncin S, et al. Intracoronary injection of bone marrow-derived mononuclear cells early or late after acute myocardial infarction: effects on global left ventricular function. *Circulation*. 2013; 127: 1968-1979.
 46. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012; 379: 895-904.
 47. Penn MS, Ellis S, Gandhi S, Greenbaum A, Hodes Z, Mendelsohn FO, et al. Adventitial delivery of an allogeneic bone marrow-derived adherent stem cell in acute myocardial infarction: phase I clinical study. *Circ Res* 2012; 110: 304-311.
 48. Pasha Z, Wang Y, Sheikh R, Zhang D, Zhao T, Ashraf M. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovasc Res*. 2008; 77: 134-142.
 49. Davis ME, Hsieh PC, Grodzinsky AJ, Lee RT. Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials. *Circ Res*. 2005; 97: 8-15.
 50. Dzau VJ, Gneocchi M, Pachori AS, Morello F, Melo LG. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2005; 46: 7-18.
 51. Eschenhagen T, Zimmermann WH Engineering myocardial tissue. *Circ Res*. 2005; 97: 1220-1231.
 52. Chiu LL, Iyer RK, Reis LA, Nunes SS, Radisic M. Cardiac tissue engineering: current state and perspectives. *Front Biosci*. 2012; 17: 1533-1550.

Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection

Donatella De Feo, Arianna Merlini, Cecilia Laterza, Gianvito Martino

Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico Universitario San Raffaele, Milano

Purpose of review

Transplantation of neural stem/precursor cells (NPCs) has been proposed as a promising therapeutic strategy in almost all neurological disorders characterized by the failure of central nervous system (CNS) endogenous repair mechanisms in restoring the tissue damage and rescuing the lost function. Nevertheless, recent evidence consistently challenges the limited view that transplantation of these cells is solely aimed at protecting the CNS from inflammatory and neurodegenerative damage through cell replacement.

Recent findings

Recent preclinical data confirmed that transplanted NPCs may also exert a 'by-stander' neuroprotective effect and identified a series of molecules - for example, immunomodulatory substances, neurotrophic growth factors, stem cell regulators as well as guidance molecules - whose in-situ secretion by NPCs is temporally and spatially orchestrated by environmental needs. A better understanding of the molecular and cellular mechanisms sustaining this 'therapeutic plasticity' is of pivotal importance for defining crucial aspects of the bench-to-beside translation of neural stem cell therapy, that is route and timing of administration as well as the best cellular source. Further insight into those latter issues is eagerly expected from the ongoing phase I/II clinical trials, while, on the other hand, new cellular sources are being developed, mainly by exploiting the new possibilities offered by cellular reprogramming.

Summary

Nowadays, the research on NPC transplantation in neurological disorders is advancing on two different fronts: on one hand, recent preclinical data are uncover-

ing the molecular basis of NPC therapeutic plasticity, offering a more solid rational framework for the design of clinical studies. On the other hand, pilot trials are highlighting the safety and feasibility issues of neural stem cell transplantation that need to be addressed before efficacy could be properly evaluated.

Reference

Riassunto della rassegna pubblicata su *Curr Opin Neurol.* 2012; 25: 322-333.

Terapia rigenerativa in ortopedia-traumatologia: indicazioni ed impiego attuale

Francesco Benazzo, Matteo Marullo

Clinica Ortopedica e Traumatologica, Università degli Studi di Pavia,
IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo, Pavia

A seguito di un danno, diretto o indiretto, i tessuti umani attivano un processo di rigenerazione. L'entità e l'efficienza di questo processo sono dipendenti essenzialmente dal tipo di tessuto coinvolto, dall'entità della lesione e dalla capacità reattiva dell'individuo, principalmente legata all'età. Ad esempio il tessuto osseo ha notevoli capacità rigenerative se viene messo in condizioni di guarire con un corretto affrontamento dei capi ossei ed una razionale osteosintesi. Diversamente, la cartilagine articolare ha una limitatissima capacità rigenerativa dovuta essenzialmente alla sua complessa architettura e alla mancanza di vascolarizzazione propria.

Vi sono poi situazioni particolari ma sempre più frequenti nella pratica clinica che oltrepassano le naturali capacità rigenerative dell'organismo; queste sono, ad esempio una perdita di sostanza dovuta ad asportazione di tumore, una frattura esposta con perdita ossea, il fallimento protesico con deficit osseo, necrosi ossea primitiva o secondaria, lesioni tendinee o muscolari massive.

Inoltre le lesioni di carattere degenerativo basate sull'invecchiamento (artrosi, osteoporosi) o sui microtraumi ripetuti, tendono per loro natura ad essere più difficilmente riparate a causa della mancanza di fattori locali (fattori di crescita, cellule, vascolarizzazione) in grado di reagire al progressivo danno tissutale.

In ambito ortopedico è quindi evidente la necessità di disporre di fattori che incrementino la rigenerazione intrinseca dei tessuti muscoloscheletrici anziché farli tendere alla semplice riparazione, cioè la sostituzione rapida ma incompleta del tessuto danneggiato con tessuto cicatriziale. Quando invece la riparazione tissutale non è possibile a causa dell'entità del danno o della limitata capacità reattiva intrinseca, sarebbe utile poter sostituire funzionalmente la porzione lesa con un tessuto ingegnerizzato identico a quello nativo, evitando quindi di dover ricorrere a "pezzi di ricambio" non biologici come le protesi articolari o intercalari.

Negli ultimi anni si è quindi notevolmente sviluppata la cosiddetta medicina rigenerativa. Essa rappresenta un nuovo approccio terapeutico finalizzato alla rigenerazione biologica dei tessuti, con conseguente ripristino della piena funzionalità, anziché alla loro semplice riparazione. La ricerca in questo ambito coinvolge tutti i fattori in gioco nel processo di riparazione tissutale, e quindi:

- Cellule
- Fattori di crescita e comunicazione intercellulare
- Struttura extracellulare tridimensionale
- Stimoli meccanici funzionali
- Vascolarizzazione.

Riguardo alla fonte cellulare, l'utilizzo a scopo rigenerativo di cellule staminali appare una concreta e valida opzione alle cellule terminalmente differenziate, come ad esempio i condrociti, da anni impiegati in tecniche di rigenerazione di lesioni condrali. Per motivi pratici e anche etici, le cellule staminali che trovano più concreto utilizzo sono quelle cosiddette staminali adulte, cioè risiedenti in tessuti già differenziati di individui adulti. Nella medicina rigenerativa dell'apparato muscoloscheletrico vi è ampio interesse per le cellule di derivazione midollare, che Caplan nel 1991 definì cellule staminali mesenchimali [*Mesenchymal Stem Cells* (MSC)]. Oltre che nel midollo osseo, esse risiedono, seppur in concentrazioni diverse, in numerosi tessuti e organi, tra cui il tessuto adiposo, la membrana sinoviale, il muscolo scheletrico, il cordone ombelicale e la placenta. Questa popolazione cellulare, posta in opportune condizioni di crescita, è in grado di differenziare verso cellule della linea mesenchimale, dando origine a osso, cartilagine, tessuto adiposo, muscoli, cute, tendini. Le MSC rappresentano dunque un ottimo candidato per applicazioni di medicina rigenerativa nell'ambito delle patologie muscoloscheletriche.

L'utilizzo di fattori di crescita (Growth Factors, GF) è fondamentale per espandere la popolazione cellulare e farla differenziare verso i componenti di un tessuto maturo. I GF, o l'insieme delle MSC ed i GF, possono essere inseriti con chirurgia aperta o addirittura con la semplice iniezione, nell'ambito di un tessuto in fase di riparazione. Normalmente la consistenza desiderata del prodotto da iniettare viene ottenuta attraverso un biomateriale come il collagene o l'acido ialuronico (*carrier*), che permette di fare aderire il fattore di crescita e le MSC.

I tessuti scheletrici sono dotati di una precisa configurazione tridimensionale e dunque, per permettere alle cellule di crescere e distribuirsi correttamente nello spazio, deve essere fornito loro un supporto (ingl. *scaffold*), naturale o artificiale, in grado di riprodurre la matrice extracellulare, fornendo così alle cellule idonei segnali per il differenziamento. Questo può essere fornito direttamente alle cellule in laboratorio (bioreattore) e poi tutto il costruito viene inserito chirurgicamente nella mancanza tissutale oppure solo alcune componenti tissutali (*scaffold*, cellule o fattori di crescita) sono inserite nel difetto.

Tutti i tessuti muscoloscheletrici sono oggetto di ricerca della medicina rigenerativa, ma il tessuto osseo e cartilagineo sono quelli in cui si sono maggiormente concentrati gli studi e sono stati ottenuti maggiori risultati.

L'osso è il tessuto muscoloscheletrico che possiede la maggior capacità innata di crescita controllata (rimodellamento), regolata da stimoli biologici e meccanici, e l'abilità di riparare un danno mediante fenomeni di rigenerazione tissutale. Il processo di riparazione dell'osso dopo una frattura ricapitola gli eventi dello sviluppo embrionale e fetale. Nonostante questo, nell'ortopedia e traumatologia odierna la capacità rigenerativa dell'osso è spesso prevaricata dall'entità del danno, come

dopo fratture esposte, mancata unione di fratture, mobilizzazione di protesi articolari, tumori ossei. Negli anni si sono utilizzati innesti ossei, autologhi o eterologhi, ma questi hanno limiti ben conosciuti. Ad esempio sia la matrice ossea demineralizzata che l'osso omologo possono persistere per anni nel tessuto di riparazione sotto forma di frammenti avvolti da tessuto fibroso reattivo, dunque non riassorbiti né sostituiti da nuovo osso. Negli ultimi anni si stanno sviluppando diversi scaffold per osso. Oltre ai materiali naturali, la maggior parte degli *scaffold* sono di natura polimerica o ceramica, con una degradazione controllata che consente di assolvere la funzione meccanica durante la rigenerazione del tessuto. Questi fungono da supporto alle MSC con potenzialità osteogenica, derivate essenzialmente da midollo osseo o tessuto adiposo. L'entità dell'attività proliferativa delle MSC non dipende dall'età o dal sesso del paziente ma dal numero di passaggi in coltura. Questo dato suggerisce che l'espansione in coltura di MSC, volta a ottenere un elevato numero di precursori da impiantare nel sito di danno, può ridurre la capacità osteoinduttiva delle stesse. Ed è questo il limite più difficile da superare, poiché occorre un'elevata quantità di cellule per riparare un volume di tessuto relativamente piccolo.

Il maggior campo di ricerca è quello dei fattori di crescita in grado di indurre il differenziamento e la proliferazione in senso osteogenico. Tali fattori sono stati identificati (bone morphogenic proteins (BMP), PDGF, TGF, FGF2, IGF) e di alcuni è reperibile in commercio la molecola ricombinante. La loro ampia disponibilità in combinazione fisiologica dopo rilascio dalle piastrine costituisce la base razionale per l'utilizzo clinico di derivati piastrinici autologhi, o plasma ricco in piastrine (platelet rich plasma, PRP); nonostante questo, la loro efficacia clinica rimane ancora oggetto di discussione. L'estrema variabilità di concentrazione dei vari fattori nel sangue dei pazienti è una delle cause più probabili di tale discordanza.

Sono stati ottenuti ottimi risultati infondendo MSC e BMP nei siti di pseudartrosi, evenienza che può accadere sino al 30% dei casi nella tibia distale. Una delle più estese applicazioni in ortopedia della combinazione MSC-biomateriali è il trattamento dell'osteonecrosi della testa femorale.

Anche il tessuto cartilagineo è oggetto di estensivi studi. Diversamente dall'osso, la cartilagine possiede limitatissime capacità rigenerative, legate essenzialmente alla mancanza di vascolarizzazione e alla sua elevata specializzazione. Difatti è un tessuto che deve possedere caratteristiche lubrificanti e ammortizzanti, oltreché resistere alle notevoli forze in gioco nei capi articolari. La maggior difficoltà nel ricreare un tessuto cartilagineo ingegnerizzato sta quindi nel ricreare questa complessa differenziazione. Diversi scaffold sono stati sviluppati: a partire da collagene, acido ialuronico, acido polilattico, fosfato tricalcico, idrossiapatite, fibre di carbonio; a singolo, doppio o triplo strato; solidi o gelatinosi. Questi possono essere impiantati direttamente nel difetto cartilagineo (condrogenesi indotta da matrice, AMIC) oppure prima seminati in laboratorio con condrociti prelevati dal paziente (impianto di condrociti associati a matrice, MACI). Sempre per la notevole complessità del tessuto cartilagineo, le cellule di scelta per la sua ingegnerizzazione sono i condrociti stessi. Essi vengono prelevati e implementati in

laboratorio per poi essere reimpiantati, oppure stimolati direttamente in situ per riempire il difetto cartilagineo. Sono stati studiati diversi fattori di crescita, ma la maggior complessità risiede nel trovare il giusto mix di fattori e la corretta sequenza temporale in cui somministrarli. Anche in questo campo si fa largo impiego di fattori di crescita piastrinici, sia associati a scaffold che direttamente iniettati in articolazione per il trattamento della gonartrosi, con risultati clinici discordanti e quindi ancora in fase di studio.

Una branca molto affascinante e promettente, anche se senza ancora risvolti clinici pratici è la terapia genica. La transfezione di cellule adulte o di cellule staminali pluripotenti con adenovirus che trasportano cDNA codificante fattori di crescita potrebbe stimolarle a produrre specifici componenti della matrice extracellulare e impedirne la loro dedifferenziazione. I primi risultati clinici si dovrebbero avere nel prossimo futuro.

In conclusione, la medicina rigenerativa è un campo di notevole sviluppo, seppure i suoi prodotti arrivino molto lentamente all'applicazione clinica. Questa discordanza è legata alla complessità della funzione richiesta: più complicata la domanda clinica, più difficile, lungo e costoso il processo di sviluppo e validazione. I continui progressi derivanti dalla combinazione dell'ingegneria tissutale, della biologia cellulare e molecolare, e della scienza dei materiali offrono soluzioni tecnologicamente avanzate e clinicamente affidabili, il cui successo crescente conferma il valore della strada intrapresa.

Bibliografia essenziale

1. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9: 641-650.
2. Dimitriou R1, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011; 9: 66.
3. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res.* 2014; 9 (1): 18.
4. Mithoefer K, McAdams TR, Scopp JM, Mandelbaum BR. Emerging options for treatment of articular cartilage injury in the athlete. *Clin Sports Med.* 2009; 28 (1): 25-40.
5. Gersbach CA, Phillips JE, García AJ. Genetic engineering for skeletal regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007; 9: 87-119.

CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NELLA TERAPIA CELLULARE

Origine, definizione ed eterogeneità biologica delle cellule staminali mesenchimali

Manuela Monti

Centro di Ricerche in Medicina Rigenerativa, IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo, Pavia

Definizione e caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali

Il termine cellule staminali mesenchimali (MSC) si riferisce ad una popolazione di cellule staminali adulte in grado di differenziarsi in diversi tipi cellulari, quali osteoblasti, adipociti e condrociti.

La loro identificazione risale agli anni '70 grazie al contributo di Friedenstein e collaboratori (1) con la caratterizzazione, nel midollo osseo, di progenitori osteogenici in grado di crescere e formare colonie in vitro e formare tessuto osseo eterotopico in vivo. La successiva dimostrazione della loro capacità di differenziarsi in diversi altri tipi cellulari, ha fatto sì che a queste cellule venisse dato il nome utilizzato oggi: cellule staminali mesenchimali. Successivi esperimenti hanno mostrato che le MSC possiedono potenti proprietà riparative tissutali dovute alla secrezione di fattori paracrini che agiscono sui programmi di riparazione tissutale endogena e che modulano la maturazione e funzione della risposta immunitaria sia innata che adattativa delle cellule (2). Molti sono i trials clinici che impiegano terapie basate sull'utilizzo delle MSC nonostante si abbia una scarsa informazione su come le loro diverse caratteristiche funzionali siano specificate a livello di popolazione cellulare e rimanga da capire quale sia la loro azione paracrina a fini terapeutici.

Oggi si conoscono i regolatori trascrizionali che specificano la via differenziativa in senso osteogenico (RUNX), adipogenico (PPAR-g) e condrogenico (SOX9), così come i fattori estrinseci che modulano le attività anti infiammatorie e immunologiche ma ciò che resta da scoprire sono i fattori che stanno a monte di questi pathways differenziativi.

Ci si auspica che le terapie ora in fase clinica avanzata, possano diventare presto una scelta terapeutica per il trattamento di molte patologie quali: patologie cardiovascolari, lesioni di midollo danneggiato dopo un trauma, processi infiammatori cronici e acuti, malattie neurodegenerative, lesioni ossee e malattie metaboliche. In normali condizioni di coltura in vitro, le MSC sono una popolazione eterogenea di cellule fibroblasti-simili aderenti al supporto di coltura (capsule petri/flask con il fondo di plastica) e in grado di formare colonie. Le cellule MSC ama-

ne sono positive agli antigeni di superficie CD73, CD90, CD105 e negative agli antigeni specifici per la linea ematopoietica tra cui, CD14, CD34, CD45, CD79 e HDLA-DR. Nonostante chiara sia la loro caratterizzazione dal punto di vista citofluorimetrico, grazie alla suddetta positività/negatività a determinati antigeni, esiste ancora una grande variabilità dipendente dalle condizioni di coltura e dal tessuto da cui vengono isolate. Proprio per ovviare a questo problema di identificazione delle MSC da fonti diverse, la società internazionale per la terapia cellulare (ISCT), ha pubblicato nel 2006 un articolo nel quale sono elencati i criteri minimi che definiscono una cellula staminale mesenchimale (3).

Le MSC possono essere isolate da diversi organi o tessuti tra cui il midollo osseo, il cordone ombelicale, la Wharton's jelly, la placenta, il tessuto adiposo e molti altri. In condizioni di coltura e crescita standard le MSC cambiano gradualmente forma: dall'essere sferiche (e non adese) in sospensione, divengono allungate quando aderiscono al fondo dei supporti di coltura, espandendosi rapidamente. Come le cellule aderenti si propagano, solo una frazione di cellule rimane clonogenica (formando colonie) suggerendo la presenza di una vera e propria nicchia per le MSC.

A differenza di altre cellule di tipo staminale, quali le cellule staminali embrionali umane, molte MSC hanno una limitata capacità di espansione in vitro (~5/10 passaggi) coincidente con una diminuzione della capacità di differenziamento: gli staminologi stanno ancora studiando se questa caratteristica sia dovuta al loro modo di isolamento o coltura in vitro. Tessuto adiposo e midollo osseo sono le fonti principali da cui è possibile isolare MSC con una altissima frequenza (circa il 100%) di formazione delle colonie, il cordone ombelicale è costituito da circa il 63% di MSC che hanno una minore capacità di formare colonie ma una maggiore capacità proliferativa e rimangono in coltura per un tempo più lungo. Qualunque sia la fonte di isolamento, non si hanno differenze di morfologia, fenotipo e immunosoppressività ma, a differenza delle MSC ottenute dalle altre fonti, quelle isolate da cordone ombelicale hanno una limitata capacità di differenziarsi in senso adipogenico.

L'origine della linea mesenchimale durante lo sviluppo embrionale è ancora dubbia sebbene alcuni studi indichino che le MSC esprimono gli stessi antigeni espressi dai periciti, dalle cellule endoteliali e perivascolari, indicando una comune origine embrionale. Altri studi, invece, suggeriscono una origine neuro-epiteliale. Takashima et al. hanno dimostrato che cellule staminali embrionali (ESC) coltivate in presenza di sieri specifici per la linea mesenchimale, si differenziano in senso adipogenico così come ESC coltivate in presenza di acido retinoico si sono differenziate in senso mesenchimale presentando tutte le caratteristiche conosciute per questo tipo cellulare (4). Mendez-Ferrer et al. hanno dimostrato che cellule del midollo osseo positive alla nestina (specifica per il tessuto neuro-epiteliale) si comportano come MSC e sono in grado di rigenerare tessuto osseo eterotopico in vivo (5). Si può dunque pensare che la specificazione della linea mesenchimale passi attraverso una transizione neuro-epiteliale ben specifica durante lo sviluppo embrionale dovuta all'azione del fattore TWIST1. L'ectopica espressione di TWIST1 blocca il differenziamento delle MSC umane in senso

osteogenico e condrogenico mentre la sua forzata espressione nelle cellule epiteliali mammarie induce il differenziamento di cellule con caratteristiche mesenchimali. Esistono quindi evidenze molto forti a supporto della teoria secondo cui le MSC si originano dalla cresta neurale via una transizione epitelio-mesenchimale in cui il fattore TWIST1 gioca un ruolo fondamentale (6).

Eterogeneità biologica delle cellule staminali mesenchimali

L'eterogeneità biologica delle cellule mesenchimali è stata messa in evidenza da uno studio pubblicato nel 1990 e in cui sono state analizzate MSC isolate dal midollo osseo di 17 donatori sani e da un altro studio, pubblicato nello stesso anno e dagli stessi autori, condotto su diversi ceppi di topi (7, 8). Le analisi hanno dimostrato una grande disparità di crescita in coltura, diversa potenzialità osteogenica e diversa positività alla fosfatasi alcalina, attribuibili a vari fattori tra cui l'età dei donatori di midollo ed i metodi usati per coltivare ed espandere le cellule in vitro. Per essere definita mesenchimale staminale, una cellula deve quindi rispondere alle caratteristiche stabilite dalla ISCT ed esprimere ben 113 trascritti e 17 proteine specifiche, sebbene controversi siano ancora i metodi di classificazione. Diversi studi hanno dimostrato che la perdita di multi potenza coincide con l'aumento del numero di passaggi in coltura, altri hanno dimostrato che una alta percentuale di MSC che si differenzia in senso osteogenico in vitro, non è in grado di formare tessuto osseo eterotopico in vivo. Altri studi ancora riportano che l'espressione di determinati antigeni di superficie cambia in accordo al numero di cellule seminate in partenza.

La perdita di multipotenza non è il solo problema che si origina coltivando MSC in vitro: diversi lavori hanno dimostrato il loro spontaneo differenziamento in miofibroblasti durante colture a lungo termine (9) che portano alla formazione di tessuto cicatriziale fibrotico invece di rigenerare la funzione dell'organo danneggiato.

Gli studi pionieristici che hanno mostrato l'eterogeneità delle MSC sono stati condotti agli inizi di questo secolo, come riportato da Muraglia et al. (10). Nelle loro analisi, effettuate su 185 cloni di MSC umane non immortalizzate, la popolazione cellulare era costituita principalmente da progenitori osteo-condrogenici e osteogenici tri-potenti e non da progenitori osteo-adipogenici, adipo-condrogenici, adipogenici, o condrogenici, suggerendo che la specificazione verso la linea connettivale segue una progressione lineare. In uno studio più recente, gli autori hanno messo a punto delle condizioni di coltura in grado di originare tutte le 8 possibili categorie di progenitori tri-lineage utilizzando la tecnica del clone splitting-assay (11) a dimostrazione che la differenziazione tri-lineage è possibile grazie ad una specificazione gerarchica all'interno della popolazione cellulare. È importante ricordare che solo approssimativamente il 50% delle cellule di una popolazione cellulare va incontro ad espansione clonale e che solo il 50% dei cloni possiede un potenziale di differenziamento tri-lineage. Ciò comporta che solo una di quattro cellule può essere classificata come progenitore tri-potente e circa la metà delle cellule di una popolazione cellulare ha una funzione indeterminata.

MSC utilizzano meccanismi paracrini ed endocrini per inibire l'attivazione di pathways che promuovono la specificazione in vie diverse, come dimostrato dall'analisi dei trascritti di cloni di MSC umane: alcuni di essi codificano per antagonisti naturali dei pathway delle proteine BMP e WNT.

MSC sono tutt'oggi impiegate per trattare un buon numero di malattie ed il loro impiego si espanderà sicuramente negli anni a venire. Ad oggi, le facilities che impiegano cellule staminali devono rispondere ad una serie di criteri (sterilità, vitalità, stabilità cromosomica) stabiliti dalla Food and Drug Administration americana e dalle altre agenzie regolatorie quali l'europea EMA e l'italiana AIFA anche se casi recentissimi hanno mostrato che, non sempre, questi importantissimi criteri vengono tenuti in considerazione prima delle infusioni di staminali (MSC) in persone malate (si veda il recentissimo e sconvolgente caso italiano della Stamina Foundation).

Le cellule staminali mesenchimali giocano dunque un ruolo molto importante in medicina rigenerativa essendo in grado di riparare e rigenerare tessuti danneggiati sia attraverso la loro iniezione diretta (riparo della zona necrotica cardiaca, 12), sia attraverso uno scaffold (cartilagine e osso, 13). Per evitare reazioni immunitarie, è generalmente preferito l'utilizzo di MSC autologhe sebbene il numero di cellule ottenute dalle biopsie sia troppo basso per una diretta infusione. Si stima, infatti, che per ogni terapia con MSC si abbia bisogno di 1-10 milioni di cellule per kg di peso corporeo e l'unico modo per soddisfare questo criterio è sicuramente la loro espansione in vitro.

L'uso delle MSC in medicina è dunque destinato a crescere rapidamente nonostante i meccanismi molecolari responsabili della self-renewal e del differenziamento cellulare non siano ancora completamente svelati, rendendo difficile la previsione di come la espansione in coltura alteri la composizione e la funzione della popolazione cellulare. Più una popolazione cellulare è omogenea e più consistenti e ripetibili saranno gli outcomes clinici. Un primo passo in questa direzione sarebbe la messa a punto di saggi in grado di valutare la funzionalità eterogenea cellulare, utilizzando, in primis, modelli animali per poi traslare eventuali cure dalla provetta al letto del paziente.

Bibliografia

1. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970; 3 (4): 393-403.
2. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells.* 2007; 25: 2896-2902.
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8 (4): 315-317.
4. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S.

- Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 2007; 129: 1377-1388.
5. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. 2010. Mesenchymal and hematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010; 466: 829-834.
 6. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139: 871-890.
 7. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem*. 1999a; 75: 424-436.
 8. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999b; 72: 570-85.
 9. Kinner B, Zaleskas JM, Spector M. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2002; 278: 72-83.
 10. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 2000; 113: 1161-1166.
 11. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 2010; 28: 788-798.
 12. Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008; 451: 937-942.
 13. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng*. 2005; 11: 1198-1211.

Preparazione delle CSM per impiego clinico

Lorenza Lazzari

Cell Factory, Unit of Cellular Therapy and Cryobiology, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

La Cell Factory “Franco Calori” è una facility per lo studio e la manipolazione di cellule staminali. Nasce nel 1998 con le prime attività volte alla ricerca traslazionale di cellule staminali adulte, il classico *from bench to bedside*. E inizia le sue attività cliniche nel 2004. Il 5 luglio 2007 la Cell Factory è stata la prima tra le istituzioni pubbliche italiane ad essere autorizzata dall’AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) per la fornitura di prodotti cellulari, ponendosi in tal modo anche a livello Europeo come struttura autorizzata per la produzione di questi nuovi “farmaci” cellulari (decreto autorizzativo N. 120/2007 del 05.07.2007 e successive conferme, l’ultima nel 2013).

La Cell Factory ad oggi ha fornito prodotti di terapia cellulare per protocolli clinici in neurologia, reumatologia, cardiologia ed ematologia, per il trattamento di malattie come la sclerodermia, infarto miocardico acuto e varie malattie del sangue.

Rilevante per il successo lavorativo di una Cell Factory è avere le due “anime”, quella di ricerca e quella di applicazione clinica, unite all’interno della stessa facility. Questa è la forza di una struttura GMP (Good Manufacturing Practice)



Fig. 1

perché sin dai primi esperimenti in vitro il ricercatore studia, pianifica e progetta con l'ottica di andare in clinica.

Le attività del nostro laboratorio di ricerca e sviluppo (R&D) sono dedicate principalmente allo studio delle cellule staminali umane adulte, il loro potenziale terapeutico e la loro capacità di differenziarsi. Le cellule staminali vengono isolate da diversi tessuti, tra cui il sangue placentare, il cordone ombelicale, il liquido amniotico, tessuto adiposo e il midollo osseo. I nostri sforzi mirano ovviamente a future applicazioni cliniche e quindi vogliamo “conoscere” tutto il possibile sulle cellule staminali, le caratterizziamo e le studiamo per poi utilizzarle per la riparazione dei tessuti nel campo della medicina rigenerativa. Ciò che si chiama “identity definition”.

E che cos'è? *“The cell identity is a global cell ID that is used to identify the cell”*. Questo step è cruciale per la produzione delle cellule staminali per impiego clinico. Infatti le cellule staminali mesenchimali ad esempio non sono una popolazione omogenea e non sono nemmeno simili tra loro all'interno di una singola sorgente. E quello che ci occorre per andare in clinica è la conoscenza, l'ID, di un prodotto cellulare per rendere il suo utilizzo il più “tailored” possibile per il paziente e per l'applicazione clinica in oggetto.

La ricerca traslazionale della nostra Cell Factory è iniziata nel 1998, prima come gemmazione della Milano Cord Blood Bank, una delle più grandi banche pubbliche di sangue placentare in Europa. Oltre al continuo voler conoscere in dettaglio le cellule staminali mesenchimali, il goal di migliaia di ricercatori, compresi quelli che lavorano presso la nostra Cell Factory, è quello di comprendere i meccanismi alla base degli effetti terapeutici osservati in diversi modelli animali sia di danno acuto che cronico e trattati con cellule staminali mesenchimali.

La nostra facility si occupa in particolare di cellule staminali mesenchimali da sangue placentare (CBMSC) avendo l'appoggio della Milano Cord Blood Bank all'interno della stessa Fondazione. Ormai è assodato che è una valida sorgente di cellule staminali ematopoietiche che viene utilizzata per trapianto in pazienti onco-ematologici.

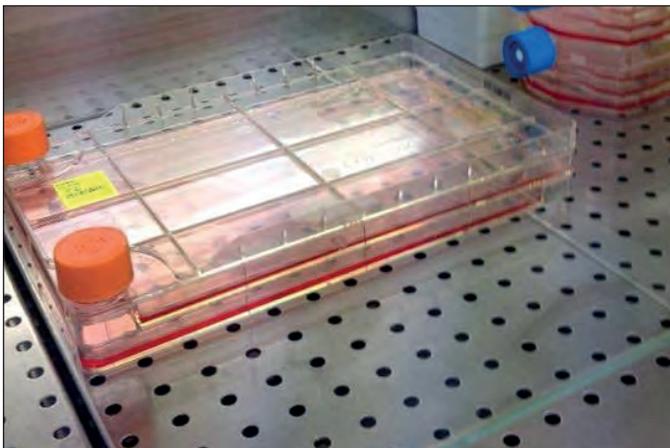


Fig. 2

Da alcuni anni si parla anche di cellule staminali mesenchimali circolanti nel sangue placentare e il nostro gruppo ha speso gli ultimi 9 anni con l'obiettivo di isolare, conoscere, caratterizzare, espandere e portare in GMP queste potenziali CBMSC.

Prima di arrivare a questo step finale di utilizzo clinico tutti i passi necessari per costruire l'*identity definition* delle CBMSC sono stati fatti tra cui studiare i loro effetti terapeutici in modelli animali di diverse patologie (1, 2).

Il nostro gruppo ha sviluppato la prima banca off-the-shelf (OTS) dove le CBMSC sono espanse e imbancate in condizioni di GMP e sono disponibili proprio come un "prodotto farmaceutico" da distribuire in singole dosi a pazienti in seguito a richiesta clinica. Le CBMSC vengono coltivate ed espanse utilizzando un particolare device (CellSTACK) che è costituito da diversi piani di coltura in un sistema chiuso utilizzando siero fetale di origine australiana oppure platelet lysate di EMEA-grade.

La nostra Cell Factory ha messo a punto questo innovativo processo di coltura cellulare delle CBMSC e attraverso una serie di opportuni passaggi è in grado di produrre centinaia di migliaia di potenziali dosi da un singolo donatore. Prima, durante e dopo il processo di espansione, sono stati definiti opportuni controlli di qualità tali da garantire che tutte le operazioni previste nella produzione siano state attuate e completate in maniera soddisfacente.

Durante alcuni steps intermedi e alla fine del processo di produzione prima di procedere con la criopreservazione, le CBMSC vengono analizzate e qualificate secondo criteri prestabiliti (conta cellulare, vitalità, ampio pannello immunocitofluorimetrico, CFU-F assay, cariotipo, CGHArray, attività telomerasica, sterilità, micoplasma e saggi endotossine) per garantire che il "farmaco" corrisponda ai criteri definiti in validazione. Vials di CBMSC sono disponibili per effettuare eventuali ulteriori tests pre-clinici e ulteriori convalide in modo da poter correttamente stendere l'Investigational Medicinal Product Dossier (Dossier del Prodotto Medicinale Sperimentale, IMPD) per effettuare la richiesta di autorizzazione della sperimentazione clinica.

Bibliografia essenziale

1. Morigi M, Rota C, Montemurro T, Montelatici E, Lo Cicero V, Imberti B, Abbate M, et al. Life-sparing effect of human cord-blood mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells*. 2010; 28: 513-522.
2. Zanier ER, Montinaro M, Viganò M, Villa P, Fumagalli S, Pischiutta F, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells protect mice after brain trauma. *Crit Care Med*. 2011; 39: 2501-2510.

Trials clinici: risultati attuali e prospettive

Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano, Irene Dambruoso, Barbara Rocca, Rita Zappatore, Celeste Calvello, Ilenia Giardini, Antonella Orlando, Marilena Caresana, Mirko Farina, Francesco Ripamonti

Divisione di Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università degli Studi di Pavia

Le cellule staminali mesenchimali (CSM) sono caratterizzate in vitro dalla capacità di differenziarsi in cellule di tessuto osseo, cartilagineo e adiposo ed in vivo dalla capacità di svolgere una funzione trofica, paracrina ed immuno-modulatoria (1). A differenza dei trattamenti farmacologici convenzionali che impiegano un dato farmaco ad un particolare dosaggio, l'attività delle CSM è determinata dal tipo di tessuto in cui esse si trovano poiché è quest'ultimo a fornire gli stimoli necessari alla CSM per la secrezione di ben definite concentrazioni di molecole bioattive e per l'attivazione di particolari vie di segnale. Una sempre più approfondita conoscenza dei meccanismi biochimici e metabolici operanti nella CSM ha permesso di chiarirne con precisione la capacità anti-infiammatoria e immuno-modulante assolutamente necessaria per la guarigione di lesioni localizzate e sistemiche e per la rigenerazione tissutale (2). CSM allogene, considerate alla stregua di un farmaco dalle agenzie nazionali del farmaco, sono ormai ampiamente impiegate in trials clinici controllati, mentre CSM autologhe sono state solo di recente impiegate. In questa breve trattazione verranno analizzati i risultati oggi raggiunti dai trials clinici che hanno impiegato CSM e le possibilità future.

Trials clinici in ortopedia

È ormai ben noto che il midollo osseo contiene progenitori ossei che una volta trapiantati possono formare tessuto osseo ectopico, caratteristica sfruttata sul piano clinico dal trattamento mini-invasivo di fratture a monconi ossei disuniti ("non-union fractures") (3). Il primo studio che aveva mostrato l'efficacia di tale procedura terapeutica aveva impiegato un piccolo volume di sospensione cellulare midollare autologa ed aveva riportato una riparazione della frattura dopo un trattamento di 14 settimane nel 75% dei pazienti. Uno studio successivo che aveva impiegato un volume maggiore di sospensione cellulare midollare aveva riportato una riparazione di "non-union fractures" nell'88% dei pazienti dopo quattro mesi di trattamento. Questo studio pur non avendo stabilito quale fosse la dose di CFU-F realmente efficace per la riparazione della frattura aveva indicato che questo

risultato terapeutico era stato raggiunto solo dai pazienti che avevano ricevuto una media di 55.000 CFU-F. Un altro studio aveva arruolato sei pazienti che avevano ricevuto iniezioni di CSM autologhe di origine midollare espanse dopo coltura in vitro. Quattro pazienti avevano mostrato una riparazione della frattura a 5-14 mesi dalla procedura e l'età media dei pazienti che non avevano avuto la riparazione della frattura era stata di 40 anni.

Nei pazienti con osteonecrosi un trattamento alternativo che sia in grado di bloccare o far regredire le lesioni ossee potrebbe costituire una valida alternativa ai trattamenti convenzionali rappresentati dall'intervento chirurgico. Uno studio che aveva impiegato una sospensione cellulare midollare autologa per il trattamento dell'osteonecrosi dell'anca ed aveva confrontato il decorso clinico dei pazienti sottoposti a tale procedura con quello di un gruppo di controllo aveva riportato che dopo un periodo di osservazione di ventiquattro mesi i pazienti che avevano ricevuto la sospensione cellulare autologa avevano mostrato una significativa riduzione dei dolori e dei disturbi articolari. Viceversa, tre degli otto pazienti del gruppo di controllo erano progrediti in osteonecrosi di grado III, evento che si era verificato in uno solo dei dieci pazienti che avevano ricevuto la sospensione cellulare midollare autologa. Un altro studio che aveva arruolato cinquantasei pazienti aveva riportato una regressione delle dimensioni dell'osteonecrosi nel 55% dei pazienti a dieci anni di distanza dal trattamento. La risonanza magnetica aveva mostrato una completa risoluzione dell'osteonecrosi in quindici pazienti ed un collasso dopo cinque anni di osservazione clinica in sette.

Nei pazienti con fusioni spinali l'obiettivo dell'interventi chirurgici è quello di sostituire il disco intervertebrale danneggiato e malato con tessuto osseo sano. Di solito s'impiega tessuto della cresta iliaca autologa anche se si tratta di una procedura che può determinare una pseudoartrosi. Gli unici risultati ad oggi riportati sono quelli di uno studio condotto in quarantun pazienti che avevano ricevuto una sospensione cellulare midollare autologa. Una fusione spinale era stata ottenuta nel 95% dei pazienti, percentuale significativamente superiore a quella raggiunta dalla procedura convenzionale.

L'efficacia delle CSM per il riparo di lesioni cartilaginee è stata recentemente dimostrata da un modello sperimentale animale. In questo studio dopo un periodo osservazionale di otto mesi la struttura e la rigidità tendinea alterate dal trattamento con collagenasi erano significativamente migliorate dal trattamento con CSM midollari coltivate ed espanse in vitro. Questa osservazione era stata successivamente confermata da un altro studio sperimentale condotto in piccoli maiali. Questo studio aveva confrontato l'impiego di CSM midollari coltivate ed espanse in vitro o di cellule midollari nucleate non espanse in vitro con l'impiego del solo gel di collagenasi II nel trattamento di difetti cartilaginei. L'efficacia terapeutica delle CSM coltivate ed espanse in vitro era sovrapponibile a quella delle cellule midollari non espanse e significativamente superiore all'efficacia terapeutica del gel di collagenasi II. Nel 2010 il primo studio condotto nell'uomo aveva arruolato cinque pazienti che avevano ricevuto CSM midollari autologhe espanse. Tali cellule, incluse in una colla di fibrina ricca di piastrine, erano state trapiantate nella cartilagine e ricoperte da una membrana periostale autologa. Dopo un periodo

di osservazione di dodici mesi tutti i pazienti avevano riferito un miglioramento dei disturbi articolari. Due pazienti che avevano acconsentito all'artroscopia avevano presentato una normalizzazione degli "scores" artroscopici, mentre tre dei cinque pazienti sottoposti a risonanza magnetica avevano mostrato una completa normalizzazione del tessuto cartilagineo ed i restanti due un'incompleta normalizzazione. Uno studio più recente che aveva arruolato trenta pazienti con lesioni osteocondrali del ginocchio aveva impiegato una membrana di acido ialuronico o di collagene umidificata con 6ml di sospensione cellulare midollare autologa ottenuta dopo aspirazione di 60 ml di sangue midollare. Tale membrana era stata posizionata sull'area di cartilagine lesionata e ricoperta con uno strato di fibrina ricco di piastrine. A distanza di ventinove mesi dalla procedura era stato osservato un netto miglioramento del "Mean International Knee Documentation Committee" e del "Osteoarthritis" scores.

Vari studi che avevano arruolato un esiguo numero di pazienti hanno riportato un netto miglioramento dei dolori e della motilità articolare causati da un processo artrite. Più recentemente CSM ottenute dal cuscinetto grasso infra-patellare erano state iniettate nel ginocchio di venticinque pazienti con osteoartrosi. A distanza di sette e quattordici giorni i pazienti avevano ricevuto anche due dosi di plasma arricchito di piastrine. Tutti i pazienti avevano riferito un netto miglioramento della sintomatologia dolorosa articolare.

La capacità di CSM derivate da tessuto adiposo di migliorare la traslucenza della matrice, la struttura dell'anulus, la densità del nucleo polposo e la sintesi di collagene II era stata dimostrata da modelli sperimentali canini. L'iniezione intradiscale di 5-10 milioni di CSM in dieci pazienti con degenerazione dei dischi lombari aveva confermato i risultati sperimentali. L'88% dei pazienti aveva presentato una significativa riduzione della sintomatologia dolorosa.

Trials clinici in cardiologia

Per minimizzare i danni prodotti dal rimodellamento del tessuto miocardico dopo l'infarto sono stati proposti vari anti-infiammatori e recentemente molti studi clinici hanno valutato il possibile impiego di CSM anche se non hanno stabilito quale sia la miglior sorgente di tali cellule e la miglior via di somministrazione. Uno studio randomizzato CSM versus placebo che aveva arruolato pazienti con infarto miocardico cronico sottoposti ad iniezioni intra-miocardiche di cellule mononucleate derivate da midollo osseo aveva mostrato una riduzione dello "stress score" ed un aumento della frazione di eiezione del ventricolo sinistro a distanza di tre e sei mesi dal trattamento. Uno studio successivo condotto in ottantasette pazienti con un'importante disfunzione del ventricolo sinistro non aveva invece mostrato differenze significative nella frazione di eiezione e nella dimensione dell'area infartuata tra pazienti sottoposti a placebo e pazienti sottoposti ad infusione di CSM. Uno studio più piccolo che aveva utilizzato cellule mononucleate di midollo osseo e CSM di midollo osseo aveva dimostrato una riduzione delle dimensioni dell'area infartuata e un buon rimodellamento del tessuto danneggiato. Lo stesso risultato era stato raggiunto da un altro studio randomizzato che aveva confrontato

l'efficacia delle CSM autologhe ed allogeniche in trenta pazienti con cardiomiopatia ischemica. Ancor più recentemente è stato osservato che l'iniezione intramiocardica diretta di CSM autologhe espanse determinava un netto miglioramento del "Canadian Vascular Scale class score", della capacità di svolgere attività fisica e riduceva gli attacchi di angina e consumo di nitroglicerina a un anno dalla procedura.

Trials clinici in pneumologia

Un modello murino di broncopolmonite cronica ostruttiva (BPCO) aveva dimostrato che CSM adulte ottenute da tessuto adiposo in combinazione con biomateriali acceleravano la rigenerazione di alcune strutture polmonari danneggiate. Inoltre, l'impiego del terreno di coltura di CSM eliminava il danno indotto dal fumo in fibroblasti polmonari coltivati in vitro attraverso un blocco dell'apoptosi, un aumento della proliferazione cellulare ed un'aumentata sintesi di matrice extracellulare. Tuttavia, nonostante questi promettenti risultati l'impiego di CSM nella BPCO umana rimane tuttora da ottimizzare. In uno studio doppio cieco che aveva arruolato sessantadue pazienti con BPCO l'infusione di 100 milioni di MSC allogeniche aveva ridotto i livelli di proteina C reattiva circolante. Tuttavia, questi pazienti non avevano mostrato un miglioramento dei parametri polmonari e nemmeno dei parametri che valutavano la qualità di vita. Pertanto era stato ipotizzato che questi pazienti avrebbero dovuto eseguire diversi trattamenti per un lungo periodo di tempo.

Trials clinici in angiologia

L'arteriosclerosi può promuovere lo sviluppo di un'arteriopatia periferica che a seconda del vaso colpito può evolvere in un'ischemia di un arto con dolore ed eventuale amputazione dell'arto stesso. Questa condizione causata da un'alterazione del flusso ematico è difficile da trattare poiché la riparazione del tessuto patologico attraverso un impianto o una terapia cellulare è possibile solo dopo aver ripristinato un normale flusso ematico. L'impiego di CSM potrebbe però rallentare in modo significativo la progressione del danno tissutale prodotto dall'ischemia. Vari studi hanno dimostrato che l'infusione di CSM ottenute da midollo osseo può migliorare la pressione parziale di ossigeno, il dolore e ridurre la frequenza delle amputazioni. Uno studio recente ha dimostrato un miglioramento della perfusione dell'arto affetto forse prodotto dall'attivazione di un processo di neo-angiogenesi indotto dalle CSM infuse.

Trials clinici in dermatologia

Siccome le CSM producono fattori paracrini e tutta una serie di molecole capaci di reclutare macrofagi e cellule endoteliali, esse potrebbero essere efficacemente impiegate per la riparazione di ferite, ulcere ed ustioni. Recentemente è stata riportata l'efficacia di uno spray di fibrina contenente CSM autologhe di derivazione

midollare per il trattamento e per la guarigione di ferite prodotte da interventi di chirurgia estetica o di ferite croniche dell'estremità. Lo spray era stato applicato per quattro volte consecutive e la guarigione della ferita era strettamente correlata al numero di CSM somministrate. In particolare il riparo della ferita era garantito da una dose di CSM di 1-5 milioni.

Per quanto concerne le ustioni un modello murino aveva indicato che l'iniezione di CSM ottenute da midollo osseo intorno e nell'area lesionata dall'ustione riduceva in modo significativo l'apoptosi delle cellule del derma. Successivamente, un paziente che aveva riportato ustioni di II grado a carico del 40% della superficie corporea era stato trattato con CSM allogeniche di derivazione midollare iniettate a livello di un'area che aveva mostrato lesioni di terzo grado. A distanza di trenta minuti il paziente aveva riferito un significativo miglioramento del dolore, una riduzione della fuoriuscita di plasma e successivamente non era avvenuta la formazione di tessuto ed il trapianto di cute era stato accettato meglio rispetto a quanto era avvenuto nei controlli storici. Un altro paziente che aveva riportato ferite da radiazioni non guarite dopo vari tipi di trattamento aveva ricevuto cinque somministrazioni di CSM autologhe ed allogeniche. A distanza di 100 giorni il paziente aveva presentato una significativa riduzione dei livelli di proteina C reattiva con completa scomparsa del dolore, assenza di tessuto necrotico e completa rigenerazione del tessuto.

Trials clinici in neurologia

Nei pazienti con sclerosi multipla e sclerosi laterale amiotrofica la terapia immunosoppressiva può ridurre il danno neurologico prodotto dall'aggressione immunologica ma non guarisce le lesioni neurologiche esistenti e non è efficace per il controllo a lungo termine della malattia. In un modello murino che presentava un danno neuronale le CSM infuse avevano raggiunto la sede della lesione, avevano promosso la proliferazione degli oligodendrociti ed aveva modulato la risposta immunologica. Questo risultato, prodotto anche dalla somministrazione del mezzo di coltura delle CSM, era determinato dal "Hepatocyte Growth Factor" prodotto dalle CSM e contenuto nel mezzo di coltura. Uno studio successivo aveva arruolato dieci pazienti affetti da sclerosi multipla che avevano ricevuto CSM autologhe espanse in vitro per via intratecale. A tre mesi di distanza il 50% dei pazienti aveva presentato un miglioramento dei test visivi e della sensibilità. Uno studio più ampio aveva dimostrato che le CSM autologhe marcate si localizzavano nelle meningi, nello spazio sub-aracnoideale e nel midollo spinale. In questi pazienti i parametri neurologici erano rimasti stabili per sei mesi dopo il trattamento ed in alcuni pazienti l'unico effetto collaterale prodotto dalla somministrazione di CSM era stato un lieve rialzo termico. Successivamente, venne dimostrato che le CSM erano efficaci anche quando venivano somministrate per via endovenosa. Infatti, in dieci pazienti con sclerosi multipla e sclerosi laterale amiotrofica la somministrazione endovenosa di 1.6 milioni pro kilo di CSM autologhe espanse in vitro determinava un miglioramento dell'acuità visiva, della risposta evocata, ampliava l'area del nervo ottico senza modificare il campo visivo.

L'efficacia delle CSM nella malattia di Parkinson è stata solo recentemente dimostrata da due studi. Uno studio aveva sottoposto sette pazienti di 22-62 anni con malattia che era durata in media 14.7 anni a chirurgia stereotassica per introdurre nella zona ventricolare sottolaterale 1 milione pro kilo di CSM autologhe espanse in vitro. Questi pazienti avevano mostrato un significativo e stabile miglioramento di alcuni "scores" neurologici e della mimica facciale. Anche il secondo studio che aveva arruolato dodici pazienti ed aveva impiegato 2 milioni di CSM allogene aveva riportato un significativo miglioramento dei parametri neurologici. Il risultato raggiunto era strettamente correlato con lo stato di progressione pre-trattamento della malattia.

Vari modelli murini avevano dimostrato che le CSM consentivano di riparare un danno spinale, ma trials clinici condotti nell'uomo hanno fornito risultati quanto mai discordanti. Uno studio aveva mostrato un significativo miglioramento dell'attività motoria in quattro dei cinque pazienti con danno spinale trattati con cellule mononucleate derivate da midollo osseo autologo. Tale miglioramento si era verificato a distanza di tre-sette mesi dalla fine del trattamento. Un secondo studio aveva utilizzato cellule mononucleate di midollo osseo autologo per il trattamento di dieci pazienti. Tali cellule era state infuse a quattro ed otto settimane dal danno spinale. Un miglioramento dell'attività motoria e dell'attività giornaliera era stato raggiunto in sei pazienti che avevano presentato anche un miglioramento delle lesioni presenti alla risonanza magnetica. Vari studi hanno utilizzato anche CSM non espanse somministrate a diversa distanza dal danno spinale. Uno di questi studi ha riportato un miglioramento dell'attività motoria nel 30% dei pazienti che avevano ricevuto CSM otto settimane dopo il danno spinale mentre un altro studio ha riportato una progressione del danno spinale in pazienti che avevano ricevuto le CSM un mese dopo l'incidente spinale.

Trials clinici nelle malattie autoimmuni

Siccome le CSM oltre a svolgere un'attività anti-infiammatoria possono indirizzare il sistema immunocompetente verso un più favorevole rapporto TH1/TH2 ed aumentare il numero di cellule T regolatorie (T^{reg}) esse sono state efficacemente impiegate nel trattamento delle malattie autoimmuni (artrite reumatoide, morbo di Crohn e lupus eritematoso). Per quanto concerne il morbo di Crohn, a distanza di sei mesi dalla seconda infusione di 2×10^6 cellule pro kilo tre dei nove pazienti arruolati nel protocollo avevano mostrato una riduzione dell'indice di attività della malattia. Inoltre, l'iniezione di CSM autologhe espanse in vitro nella fistola di dodici pazienti con morbo di Crohn fistolizzato aveva determinato completa risoluzione della fistola in nove pazienti ed una parziale chiusura della fistola in tre. Tutti i pazienti avevano presentato una cicatrizzazione delle lesioni della mucosa rettale ed un aumento dei T^{reg} . Altri studi di piccole dimensioni hanno dimostrato l'efficacia terapeutica delle CSM nel lupus eritematoso sistemico. Il trattamento di quattro pazienti con CSM allogene aveva determinato una remissione completa stabile della durata di 12-18 mesi in quattro pazienti. Viceversa, in due pazienti il trattamento con CSM autologhe aveva determinato un aumento dei T^{reg}

senza migliorare il decorso clinico della malattia. Uno studio più recente condotto in quindici pazienti con lupus refrattario che avevano ricevuto le CSM da familiari aveva dimostrato un netto migliorare dell'indice di attività della malattia, della proteinuria ed una stabilizzazione della funzionalità renale dopo dodici mesi.

Conclusioni

Da quanto riportato emerge che l'impiego di CSM autologhe o allogeniche fresche o espanse in vitro può e potrà essere la terapia più sicura ed efficace di molte condizioni cliniche a decorso sfavorevole ed a trattamento tuttora insoddisfacente, principalmente costituito da interventi chirurgici d'urgenza. Nonostante i brillanti risultati sinora raggiunti, solo un'approfondita conoscenza della distribuzione in vivo e dei meccanismi responsabili dell'efficacia terapeutica delle CSM ottenuta grazie ad ulteriori studi clinici consentirà di ottimizzare l'impiego di queste cellule in protocolli personalizzati di medicina rigenerativa. Perché queste cellule possano essere correttamente impiegate nella pratica clinica sarà altresì necessaria una stretta collaborazione tra medici, scienziati, industrie ed agenzie regolatorie.

Bibliografia essenziale

1. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell stem Cell*. 2011; 9: 11-15.
2. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007; 213: 341-347.
3. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *n Exp. & Molecular Medicine*. 2013; 45: e54.

IMMUNOTERAPIA CELLULARE

Immunoterapia e recettori antigenici artificiali

Ettore Biagi

Dipartimento di Pediatria, Centro di Ricerca Matilde Tettamanti, Università Milano-Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza (MI)

Il sistema immunitario gioca un ruolo basilare nei confronti della crescita e dello sviluppo di una formazione neoplastica, essendo potenzialmente in grado di identificare e in seguito di eliminare le cellule tumorali. Tuttavia, le cellule tumorali sono in grado di sfuggire all'immuno-sorveglianza, come si evince dal fatto che i tumori si sviluppano anche in soggetti immunologicamente competenti.

In questo contesto, l'immunoterapia si propone di studiare e sviluppare specifiche strategie per indurre e potenziare la risposta immunitaria antineoplastica, contrastando i meccanismi alla base dell'evasione tumorale.

L'immunoterapia passiva comporta il trasferimento adottivo di effettori cellulari della risposta immunitaria generati *ex-vivo* e capaci, una volta infusi, di esercitare una potente azione anti-tumorale nel paziente, bypassando il suo stato di immunocompromissione.

Al fine di potenziare la capacità anti-tumorale *in vivo* dei linfociti T sono stati studiati diversi approcci di modificazione genetica, che hanno portato i ricercatori

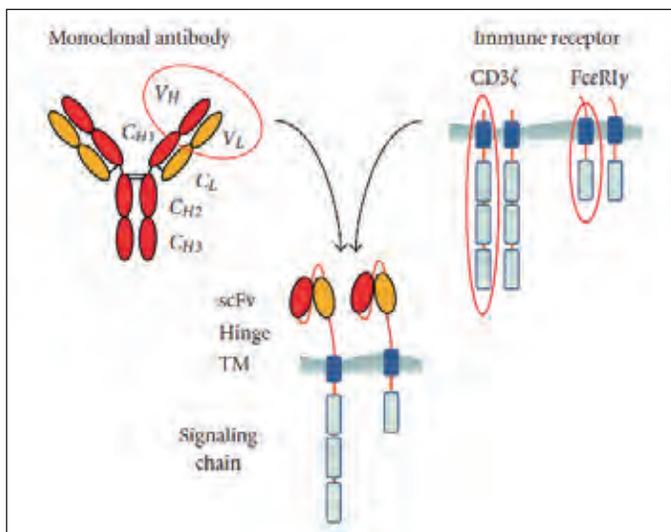


Fig. 1

ad esplorare nuovi metodi di immunoterapia cellulare, basati sulla generazione di recettori artificiali indipendenti dalla restrizione MHC e dal processamento dell'antigene, due dei maggiori meccanismi di evasione tumorale. La strategia più promettente per la generazione di linfociti T tumore-specifici è basata sull'utilizzo di recettori cellulari T chimerici (CAR, *Chimeric Antigen Receptor*). I CAR sono recettori artificiali costituiti da un dominio extracellulare di legame con l'antigene, derivato dalle regioni variabili, leggere e pesanti (V_L e V_H), di un anticorpo monoclonale unite insieme a formare un'unica catena (scFv), da un dominio trans-membrana e da uno intracellulare di attivazione e trasduzione del segnale, rappresentato o dalla catena γ del frammento Fc delle immunoglobuline, o dalla catena ζ del complesso TCR/CD3.

L'ingegnerizzazione dei linfociti T con i CAR ha permesso dunque di combinare le proprietà di riconoscimento antigenico proprie degli anticorpi monoclonali con le caratteristiche funzionali delle cellule T (migrazione, citotossicità, rilascio citochinico e conseguente amplificazione della risposta immunitaria). Ciò ha comportato diversi vantaggi: l'interazione con il bersaglio avviene in modo

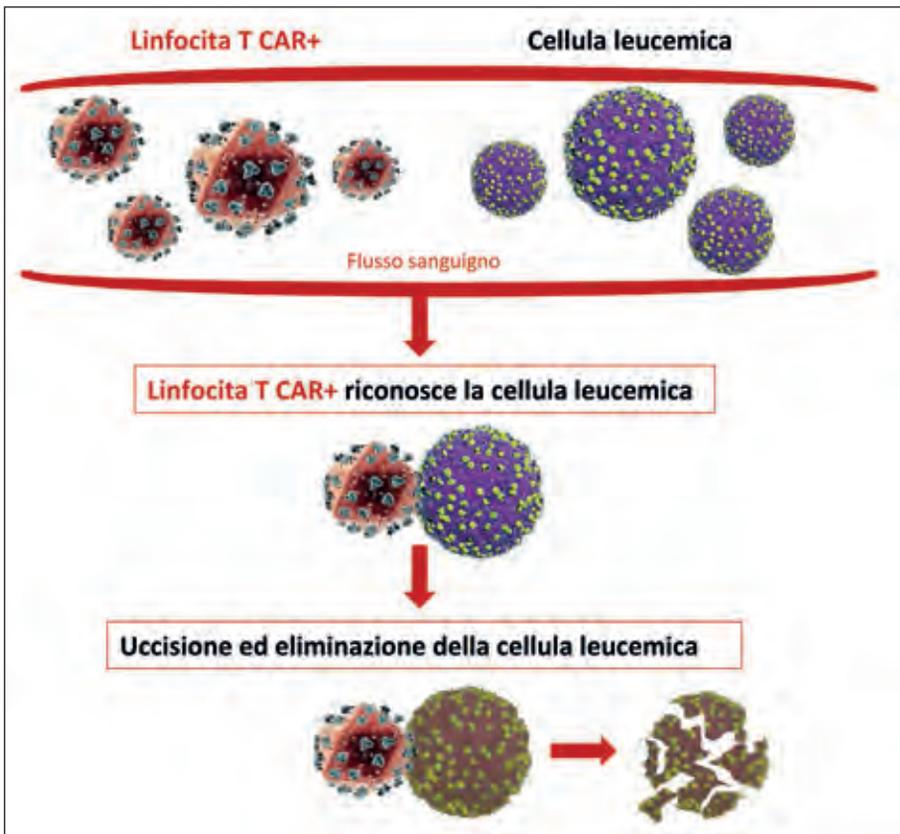


Fig. 2

non-MHC ristretto, può essere riconosciuta un'ampia varietà di antigeni tumorali rappresentata non solo da peptidi, ma anche da carboidrati e glicolipidi ed, infine, la generazione di un CAR è tecnicamente meno complessa, dal momento che non richiede l'isolamento di cloni di CTL tumore-specifici.

Ad oggi le applicazioni cliniche dei recettori chimerici hanno portato, negli Stati Uniti, al raggiungimento di brillanti risultati soprattutto nell'ambito delle leucemie linfatiche croniche, linfomi e leucemie linfoblastiche tramite recettori chimerici selettivi per l'antigene CD19, portando a guarigione casi refrattari alle terapie tradizionali.

La leucemia linfoblastica di tipo B è oggi la leucemia più frequentemente osservata in età pediatrica e, sebbene i trattamenti di prima linea ed il trapianto di midollo ematopoietico abbiano portata la percentuale di sopravvivenza a circa l'80%, tuttavia le possibilità di cura per chi presenta una ricaduta post trapianto di midollo osseo sono aneddotiche. Sempre più comune è la scelta di offrire, in prima ricaduta post trapianto, una seconda possibilità trapiantologia previa esecuzione di addizionali cicli di chemio e/o radioterapia. Ma anche la guarigione dopo esecuzione di uno o più trapianti di cellule staminali è un evento occasionale, data la estrema aggressività della malattia di base soprattutto quando la ricaduta di malattia sia molto precoce (Gaynon PS, et al. *J Clin Oncol.* 2006; 24(19): 3150-3156).

Oggi sono disponibili approcci innovativi di terapia cellulare e genica che hanno dimostrato brillanti risultati, in termine di ottenimento di remissione di malattia e guarigione, in caso di ricaduta dopo chemioterapia o dopo trapianto di midollo osseo. Questi approcci si basano sulla modificazione genica dei linfociti del donatore tramite dei recettori (cosiddetti recettori artificiali chimerici, CAR) che sono in grado di riconoscere una molecola espressa su tutte le cellule leucemiche, cioè il CD19, insegnando al linfocita (cioè alla cellula immunitaria del donatore) a espandersi e diffondersi nel corpo umano per riconoscere ed uccidere selettivamente la cellula leucemica, funzionando come una specie di radar sulla superficie del linfocita.

Importanti studi americani hanno dimostrato non solo la fattibilità di questa procedura, ma anche le sue straordinarie potenzialità terapeutiche. Ricordiamo a tal proposito la pubblicazione pionieristica del gruppo di Philadelphia (Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. Grupp SA and June CH. *N Engl J Med.* 2013; 368 (16): 1509-1518), recentemente confermata da tre diversi gruppi al congresso americano di ematologia (ASH, American Society of Hematology) del dicembre 2013, dove, su un totale di 40 pazienti (di cui 23 bambini, 15 post trapianto), si è ottenuta la remissione della malattia in 25 pazienti (62,5%) con scomparsa totale della malattia non solo a livello morfologico, ma anche di segnale molecolare, il che porta a pensare ad una eradicazione del clone leucemico responsabile della ricaduta. Sebbene questi dati abbiano ancora un follow-up che raggiunge al massimo i 15 mesi, tuttavia essi rappresentano un successo terapeutico unico mai raggiunto nel contesto di malattie di tale gravità.

In Europa è operativo un trial sponsorizzato da University College of London (CD19 TPALL, Eudract no. 2007-007612-29, Clinical Trials. gov no. NCT01195480), che coinvolge anche istituti francesi e tedeschi, che offre una strategia di terapia

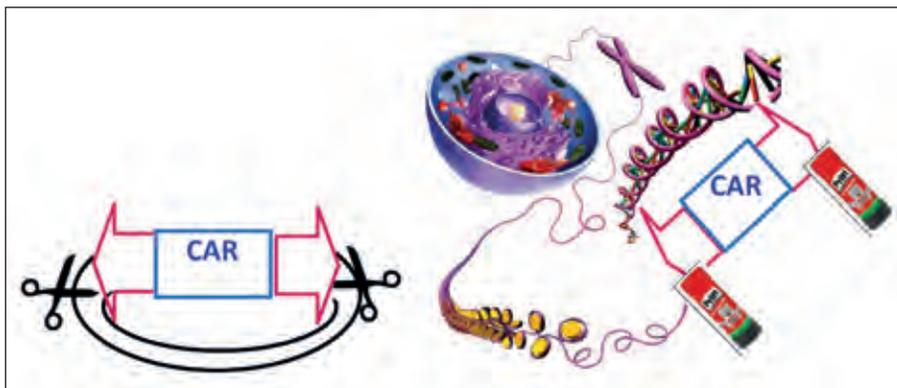


Fig. 3

cellulare genica simile agli approcci sopra descritti, sempre bersagliando la molecola CD19 tramite linfociti del donatore di midollo esprimenti il recettore chimerico anti-CD19. 5 pazienti ad oggi hanno ricevuto la terapia prevista ed in un caso si è ottenuta, dopo la infusione delle cellule modificate, la completa scomparsa a livello molecolare (quindi subcellulare) delle cellule malate.

Oltre alle leucemie di origine linfoblastica, grande interesse è riposto nelle leucemie mieloidi acute (LMA). Le alte percentuali di ricaduta associate alla cura della LMA sono in gran parte attribuibili ad un particolare sottogruppo di cellule leucemiche, chiamate cellule staminali leucemiche (CSL), le quali sfuggono all'azione dei farmaci chemioterapici convenzionali.

La CSL rappresenta infatti la cellula capostipite da cui origina la leucemia stessa, ed è in grado di rigenerare continuamente i blasti leucemici, ricreando in ultimo la malattia nel paziente. Allo scopo di eradicare la LMA agendo in modo sempre più selettivo verso le cellule leucemiche e in particolar modo verso le CSL, un nuovo recettore chimerico è stato generato specifico per l'antigene CD123. Il CD123 è infatti una molecola che risulta altamente espressa dalla popolazione leucemica e dalle CSL, ed allo stesso tempo è poco espressa dalle cellule staminali e dai precursori normali ematopoietici. Risultati in vitro hanno mostrato che il CAR anti-CD123, una volta espresso dalle cellule T, non solo mostra un'efficace eliminazione della LMA, ma assicura un buon profilo di sicurezza nei confronti del midollo sano (Tettamanti S, *British Journal of Haematology*, 2013). Ulteriori studi in vivo eseguiti su topi immunodeficienti in collaborazione con la Prof.ssa Dominique Bonnet del Cancer Research UK di Londra hanno dimostrato, sia in caso di linee cellulari umane, sia in caso di leucemie primarie attecchite a partire dai pazienti affetti da LMA, che il CAR anti-CD123 è in grado di eradicare completamente il clone leucemico, mantenendo un profilo di bassa tossicità sul midollo ematopoietico non leucemico (Pizzitola I., *Leukemia*, in press, 2014).

La terapia genica permette di sviluppare nuovi approcci di terapia avanzata e, nel contesto dell'immunoterapia delle leucemie, è lo strumento che consente l'ingegnerizzazione di cellule del sistema immunitario con i recettori chimerici.

Attualmente, la strategia di terapia genica maggiormente usata per questi scopi si avvale di virus disattivati. Lo sviluppo di metodi non virali di trasferimento genico stabile alternativi ed innovativi come i Trasposoni è cruciale per risolvere i problemi di fabbricazione, costo e sicurezza che limitano la applicazione clinica dei vettori virali. In particolare, il sistema trasposone “Sleeping Beauty” utilizzato come vettore di terapia genica sfrutta una molecola plasmidica di DNA circolare che, veicolata nel nucleo cellulare tramite esposizione della cellula ad un campo elettromagnetico con tecnica di nucleofezione, porta al suo interno elementi genetici trasponibili capaci di inserire nel genoma umano il gene d’interesse.

Tramite tale metodologia è stato possibile manipolare geneticamente con alta efficienza effettori immunitari, dimostrando la persistenza e l’efficacia di killing del recettore chimerico anti-CD123 per il trattamento della LMA e del recettore chimerico anti-CD19 per il trattamento della LLA. Il sistema Sleeping Beauty veicolante i recettori chimerici, e in particolare il suo pattern di integrazione nel genoma, è caratterizzato da un profilo di sicurezza adeguato. Inoltre, allo scopo di migliorare il profilo di sicurezza delle cellule modificate geneticamente con recettori chimerici, sono state sviluppate e comparate diverse strategie di geni suicida. Tra queste, caspasi inducibile umana (iCasp9) e CD20 umano si sono dimostrate particolarmente efficaci nel contesto sperimentale, garantendo la possibilità di controllo farmacologico delle cellule modificate una volta infuse tramite eliminazione in caso manifestino tossicità imprevista ed importante, e ponendo, quindi, le basi per una futura applicazione clinica dei recettori chimerici anti-leucemia.

Targeting the minimal residual disease in acute myeloid leukemia: the role of adoptive immunotherapy with natural killer cells

Antonio Curti

Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. & A. Seràgnoli", Policlinico S. Orsola, Università degli Studi di Bologna

Acute myeloid leukemia

Acute myeloid leukemia (AML) is a clonal, hemopoietic stem cell disorder characterized by the accumulation of immature myeloid precursors (blasts) in the bone marrow, along with the suppression of normal hematopoiesis. Treatment for AML is intensive, with multiple cycles of cytosine arabinoside and anthracycline-containing combination chemotherapy regimens, with the option of autologous or allogeneic stem cell transplantation for eligible patients. In response to chemotherapy, complete remission (CR) rates, defined as the absence of bone marrow blasts, range from 60 to 85% in patients under 60. However, approximately 60% of patients will subsequently relapse and the 5-year overall survival (OS) is 40%. These results are much worse in elderly patients, where OS falls to 10%, due to the higher prevalence of unfavourable biological factors, such as poor risk cytogenetics (Leith et al., 1997). Since the outcome of relapsed AML patients is poor, the development of novel approaches, aimed to consolidate CR and to prevent leukemia-relapse, may significantly impact on the clinical outcome of AML patients. In that context, allogeneic stem cell transplantation (SCT) is a great option, but still has important limitations. Attempts to effectively prime and sustain anti-tumor immunity against leukemic cells have recently provided promising preclinical and clinical results. Results from allogeneic SCT represent the main evidence that leukemic cells are targets of the immune system. In fact, since the first clinical observation that allogeneic SCT offered a clinical advantage over autologous transplantation due to a graft-versus-leukemia (GVL) effect, much more attention has been given to the role of adoptive immunotherapy over conditioning regimen as a means to eradicate tumor cells. In particular, donor lymphocyte infusions (DLIs) are capable to restore a durable complete remission. Such results are the proof of principle of the crucial activity of anti-tumor immunity in controlling the growth of leukemic cells.

Adoptive immunotherapy with natural killer cells

Human NK cells are a subset of PB lymphocytes defined by the expression of CD56 or CD16 and the absence of the T-cell receptor (CD3) (Robertson et al., 1990). They recognize and kill transformed cell lines in an MHC-unrestricted fashion and play a critical role in the innate immune response. Several studies demonstrated that NK function, which is distinct from the MHC-restricted cytolytic activity of T cells, may be relevant for the immune control of tumor development and growth.

Although NK cell killing is MHC-unrestricted, NK cells display a number of activating and inhibitory receptors that ligate MHC molecules to modulate the immune response (Lanier et al, 1998). NK cell receptors that recognize antigens at the HLA-A, -B, or -C loci are members of the immunoglobulin super family and are termed killer immunoglobulin receptors or KIRs (Farad et al, 2002). Engagement of these NK cell receptors results in stimulation or inhibition of NK cell effector function, which ultimately depends on the net effect of activating and inhibitory receptors.

Clinical trials attempting to utilize the anti-tumor effect of NK cells have met only modest success due to the lack of understanding of receptors and ligands which determine whether NK cells will be activated or suppressed. On the contrary, data from haploidentical T-cell depleted transplantation suggest that KIR mismatch with tumor MHC may significantly impact on tumor cell killing, particularly in AML (Ruggeri et al., 2002).

In fact, these studies show that AML patients with KIR ligand mismatch are significantly protected against leukemia relapse. In addition, preclinical and clinical investigations demonstrated that haploidentical KIR-mismatched NK cells play the main role as anti-leukemia effector cells and they exert their cytotoxic activity within 4-5 days (Ruggeri et al. 2002, Ruggeri et al., 1999). In particular, high risk AML patients with a KIR-ligand mismatch in the graft-versus-host (GVHD) direction had a relapse rate of 0% compared to KIR-ligand matched patients who had a relapse rate of 75%.

Given these results, haploidentical KIR-mismatch NK cells administered to AML patients as cell-based immunotherapy may induce NK cell-mediated killing of leukemia cells resulting in the elimination of residual disease in high risk AML patients. Furthermore, alloreactive mismatched NK cells facilitate hematopoietic engraftment after infusion of haploidentical stem cells, and inhibit the onset of GVHD by targeting host antigen-presenting cells (Ruggeri et al., 2002). Of note, the differential expression of activating ligands on hematopoietic and not hematopoietic tissues may provide an additional explanation for the observed GVL effect in the absence of GVHD.

Partially purified haploidentical NK cells have been already used clinically and labeled with ^{111}In to track, in vivo, their kinetics and organ distribution in patients with renal cancer (Brand et al., 2004). A seminal study demonstrated that up to 1.5×10^7 /haploidentical NK cells/kg can be safely infused in AML and cancer patients following Fludarabine/Cyclophosphamide (Flu/Cy) immunosuppressive

chemotherapy and, in some cases, clinical responses without GVHD had been observed (Miller et al., 2005). Interestingly, circulating haploidentical NK cells were found, in selected patients, up to 28 days after infusion especially when exogenous IL-2 was given for 9 doses. In vivo expansion of NK cells was correlated with a high IL-15 serum concentration. In particular, in this study, 19 poor risk AML patients were reported who had received a cell population containing a median of $8.5 \pm 0.5 \times 10^6$ and $1.75 \pm 0.3 \times 10^5$ NK and T cells, respectively. Five out of 19 patients achieved CR. NK cells adoptive immunotherapy was well tolerated and hematological and non hematological toxicity were mainly related to the immunosuppressive regimen and IL-2 administration. The maximum tolerated dose of NK cells was not achieved and GVHD was not observed despite the relatively high number of haploidentical T cells infused. However, it should be noted that NK cells were only partially purified after a single round of depletion of CD3⁺ cells which resulted in less than 2 logs reduction of T cells.

More recently, a study of haploidentical KIR-HLA mismatched NK cell transplantation in childhood AML reported that NK cell therapy prolonged disease-free and overall survival (Rubnitz et al., 2010). In this pediatric cohort of AML patients, who underwent NK therapy after an immunosuppressive regimen, the 2-year event-free survival was 100%. Notably, all the children were considered at low-risk of relapse, with a significant fraction harboring good-prognosis cytogenetics. Furthermore, as children weigh less than adults, the median number of infused NK cells was significantly higher than in adult trial and the separation procedure consisted in highly purified NK cells. These differences may partially explain the discrepancy in clinical results and suggest that in adult patients the clinical effect of NK therapy may be implemented by increasing the number of infused NK cells.

We recently published the results of a clinical trial of adoptive immunotherapy with haploidentical KIR-mismatched NK cells in elderly patients with AML (Curti et al., 2011). Thirteen AML patients, 5 with active disease, 2 in molecular relapse and 6 in morphological complete remission (CR); (median age 62 years, range 53-73) received highly purified CD56⁺CD3⁻ NK cells from haploidentical KIR-ligand mismatched donors after fludarabine/cyclophosphamide immunosuppressive chemotherapy, followed by IL-2. The median number of infused NK cells was $2.74 \times 10^6/\text{kg}$. T cells were under $10^5/\text{kg}$. No NK cell-related toxicity, including GVHD, was observed. One of the 5 patients with active disease achieved transient CR, whereas 4/5 patients had no clinical benefit. Both patients in molecular relapse achieved CR which lasted for 9 and 4 months, respectively. Three/6 patients in CR are disease-free after 34, 32 and 18 months. After infusion, donor NK cells were found in the peripheral blood of all evaluable patients (peak value on day 10). They were also detected in bone marrow in some cases. Donor-versus-recipient alloreactive NK cells were demonstrated *in vivo* by the detection of donor-derived NK clones that killed recipient's targets. Adoptively transferred NK cells were alloreactive against recipient's cells, including leukemia. Taken together, these data demonstrate that infusion of purified NK cells is feasible in elderly patients with high risk AML.

Conclusion

In conclusion, the clinical results of AML patients, especially if elderly, are particularly dismal, although the achievement of CR with MRD after combined chemotherapy appears as possible in the majority of patients. Unfortunately, the persistence of MRD leads to progression and patients ultimately die. For these reasons, alternative approaches for the prevention of relapse in CR patients are necessary and are currently under active investigation. In particular, the role of immunological therapies in the post-remission management of adult AML patients, such as NK therapy have been recently exploited with promising results in terms of immunological and clinical responses. Further studies (phase II-III) are highly warranted to really evaluate the role of such approaches and their impact on overall survival of AML patients.

Bibliografia essenziale

1. Brand JM, Meller B, Von Hof K, et al. Kinetics and organ distribution of allogeneic natural killer lymphocytes transfused into patients suffering from renal cell carcinoma. *Stem Cells and Development*. 2004; 13: 307-314.
2. Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high-risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2011 Jul 25. (Epub ahead of print).
3. Farad SS, Fehniger T, Ruggeri L, et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into graft versus leukemia effect. *Blood*. 2002; 100: 1935-1947.
4. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 359-393.
5. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood*. 1997; 89 (9): 3323-3329.
6. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005 105 (8): 3051-3017.
7. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990; 76: 2421-2438.
8. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (6): 955-959.
9. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999; 94: 333-339.
10. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002; 295: 2097-2100.

CIK cells for the treatment of leukaemia relapse

Martino Introna, Alessandro Rambaldi

U.S.S. Centro di Terapia Cellulare "G. Lanzani", U.S.C. Ematologia e
Unità di Trapianto di cellule staminali, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo

Cytokine Induced Killer (CIK) cells are a population of immune-effector cells generated *in vitro* by stimulation of circulating mononuclear cells with INF γ , monoclonal anti-CD3 antibody and IL-2. CIK cultures have shown a potent non-MHC restricted cytotoxicity against tumor cells of several lineages *in vitro*, in particular haematological neoplasms. Moreover, they have shown anti-tumor activity *in vivo* in mice carrying either murine or human tumors. The same cells present negligible cytotoxicity against normal tissues, including normal bone marrow, and have little GVHD activity in several allogeneic models, thus representing a valid tool for immunotherapy protocols.

We have previously performed a phase I study by administering CIK cultures of donor origin to leukaemia patients who had experienced relapse following allogeneic bone marrow transplantation.

17 patients aged 10-62 years with a diagnosis of Acute Myelogenous Leukemia (AML, n=8), Hodgkin Disease (HD, n=3), Chronic Myelomonocytic Leukemia, (CMML, n=1) and B precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL, n=2), Myelodysplasia (n=2), and Burkitt lymphoma (n=1) relapsed after sibling (9) or matched unrelated donors (8) allogeneic transplantation entered this Phase I study. Before CIK administration, all patients had received other salvage treatments including chemotherapy, radiotherapy and unmanipulated donor lymphocytes (DLI) without any significant tumor response in all cases. The first CIK infusion was given after a median time from transplant of 230 days (range 132-1224). The median number of infusions was 2 (range 1-7) and the median number of total CIK cells was $12.4 \times 10^6/\text{Kg}$ (range 1.0-72.5) of recipient body weight. The infusion of CIK cells was always well tolerated and no acute or late infusion related reactions were registered. Acute GVHD (grade I and II) was observed in 4 patients after 30 days from the last CIK infusion which progressed into extensive chronic GVHD in two cases. 12 patients showed no evidence of clinical response with rapidly progressive disease and died with the exception of one patient who is still alive. One patient showed a hematologic improvement as documented by the induction of marrow aplasia. Subsequently this patient received allogeneic

neic stem cells to try and reconstitute the marrow function, but we later observed progression of disease and death. One patient showed stable disease for more than one year in the absence of other treatment. At day +640 there was disease progression in multiple nodes and chemotherapy was given but the patient died at day +1263. One patient obtained complete remission at day +700 documented by marrow biopsy, PET and CT scan. Nonetheless, there was disease progression at day +874 and the patient later died. One patient maintained state of chimerism almost complete for approximately two years, but the disease relapsed and the patient died at day +805. One patient obtained complete chimerism at day +628 on marrow and blood and this patient is still alive at last follow up at day 1471. This study showed for the first time that allogeneic CIK cells can be administered without significant toxicity to patients relapsing after hematopoietic stem cell transplantation. Despite the high number of donor CD3+ cells infused, mild acute GVHD developed only in a minority of patients. Finally, preliminary suggestions of anti-tumor activity were observed.

More recently, we have been authorised by the AIFA and by the internal CE to perform an open-label multicenter exploratory phase IIA study in the same clinical context of leukaemia patients relapsed following allogeneic transplantation, by the sequential administration of unmanipulated donor lymphocytes infusions (DLI) followed by repeated administration of CIK cells. Two infusions of unmanipulated DLI of 1×10^6 cells/kg each have been administered with a minimum interval of 3 weeks, followed by three infusions of donor CIK cells according to a dose escalating program.

Moreover, our experimental observations have shown that “true” CIK cells (CD3+CD56+) are terminally differentiated T EMRA cells derived from proliferating CD3+CD56- CD8+ progenitors, which have acquired non specific cytotoxicity, perhaps mediated by co-expression of NKG2D and CD56 molecules at high levels. Nonetheless, CIK retain their T specific functions, as demonstrated by the expansion of CMV specific tetramer positive CIK cells expanded from CMV positive donors and by functional studies on sorted populations. These data clearly show that CD3+/CD56+/CD8+ CIK cells are activated T EMRA cells which have retained their TCR/CD3 complex usage and their antigen specificity but have acquired unrestricted anti-leukaemic activity. The identification of the molecules involved in this killing is still under investigation. These data open up the possibility of multiple clinical use of CIK cultures, including anti-leukaemic and anti-infective usage particularly in immunodeficient patients.

Reference

1. Introna M, Golay J, Rambaldi A. *Immunology Letters*. 2013; 155: 27-30.

Manipolare l'immunologia per sopprimere la crescita tumorale

Giulia Golinelli, Filippo Rossignoli, Malvina Prapa, Giulia Grisendi, Carlotta Spano, Paolo Paolucci, Massimo Dominici

Laboratorio di Biologia Cellulare e Terapie Oncologiche Avanzate,
Dipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche, Università di Modena e Reggio Emilia,
Policlinico di Modena

Lo sviluppo del fenotipo tumorale è un processo multifattoriale che coinvolge mutazioni di cellule sane e allo stesso tempo modifiche nella loro fisiologia (1). Il tumore è una malattia che non dipende solo da qualità intrinseche alle cellule tumorali ma anche da fattori esterni ad esse come il sistema endocrino ed immunitario, il letto vascolare e il metabolismo dell'organismo. Così come i tessuti normali, i tumori sono composti da due componenti distinte ma interagenti: il parenchima, costituito dalle cellule tumorali e lo stroma, composto da un insieme di cellule non trasformate e connettivali come vasi sanguigni, fibroblasti e cellule infiammatorie (2).

Parenchima e stroma non sono indipendenti e, in condizioni fisiologiche, l'omeostasi del tessuto è strettamente governata dalla comunicazione biochimica tra questi due compartimenti. Al contrario, le cellule tumorali mostrano risposte anomale ai segnali regolatori della crescita cellulare e inducono costantemente il rimodellamento dello stroma in modo da consentire la loro espansione (3).

Il sistema immunitario gioca un ruolo fondamentale nell'inibizione della crescita e della progressione tumorale grazie al riconoscimento ed al rigetto di cellule maligne in un processo che prende il nome di immunosorveglianza (4). Tuttavia, quando questo meccanismo non è sufficiente ad eradicare il tumore, il processo infiammatorio che si protrae a lungo può, al contrario, favorire l'angiogenesi e la sopravvivenza delle cellule maligne.

Le analisi istologiche hanno mostrato la presenza di svariate tipologie di cellule immunitarie nel microambiente tumorale e, per quanto riguarda le cellule effettrici, le possiamo riassumere in due categorie principali: la prima è largamente rappresentata dalle cellule natural killer (NK) mentre la seconda è costituita dai linfociti T citotossici (CTL) che diventano attivi in seguito all'interazione con le cellule tumorali.

I linfociti NK, sono larghe cellule granulari con una funzione immune innata, che giocano un ruolo fondamentale nella risposta precoce contro le infezioni virali e

batteriche, così come contro le cellule tumorali. Essi esercitano la loro funzione effettrice attraverso la produzione di citochine immunoregolatrici e chemochine inclusi $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-10 , e GM-CSF , che generano un'immediata risposta immune, senza una precedente sensibilizzazione.

Altri due meccanismi effettori sono l'esocitosi di perforine e granzimi, in grado di eliminare le cellule bersaglio creando dei veri e propri pori sulla membrana plasmatica, e l'attivazione delle vie apoptotiche innescate dai recettori di morte. Quest'ultima via coinvolge l'espressione da parte delle cellule NK di membri della superfamiglia del TNF, quali FasL, $\text{TNF-}\alpha$ e TRAIL (5).

Molti studi hanno dimostrato che le NK hanno come target preferenziale cellule nelle quali l'espressione di molecole MHC di classe I è diminuita o abolita. Le cellule normali, infatti, esprimono alti livelli di molecole MHC di classe I ed inibiscono le NK, mentre le cellule tumorali che mancano di tali molecole non sono in grado di farlo (6).

Il linfocita T citotossico media il rigetto di tumori grazie al riconoscimento delle cellule tumorali su base antigenica. Infatti esprime un recettore antigenico T-cellulare (TCR) clonotipicamente unico, che conferisce specificità nei confronti di particolari antigeni legati alle molecole MHC di classe I sulla superficie cellulare. Il loro ruolo è però compromesso dai fenomeni di tolleranza immunitaria che comportano, a livello centrale, l'eliminazione del repertorio dei linfociti auto-reattivi che potrebbero riconoscere le cellule maligne sulla base dell'espressione aberrante di antigeni self (tumor-associated antigens, TAA). Parallelamente, il processo di trasformazione maligna, può anche accompagnarsi all'espressione di molecole riconosciute come estranee dal sistema immune (tumor-specific antigens, TSA) che sono di estrema importanza per il loro potenziale uso a fini terapeutici. Ciononostante, l'esistenza nel sangue del paziente di CTL reattivi nei confronti del tumore non è spesso sufficiente a determinare il rigetto di una neoplasia presente nell'organismo e, nei casi di malattia metastatica, si osserva solo sporadicamente la regressione tumorale (7).

Infatti, le cellule neoplastiche, mettono in atto molteplici strategie allo scopo di sfuggire al riconoscimento immunitario a livello periferico ed espandersi in maniera incontrollata. I meccanismi più noti comprendono la riduzione dell'espressione delle molecole HLA di classe I e la perdita dell'espressione di antigeni tumorali o molecole costimolatorie, l'espressione di ligandi specifici alterati (LPA) che antagonizzano quelli wild type e la produzione di citochine immunosoppressive. Più in dettaglio, la riduzione dell'espressione delle molecole HLA di classe I e/o la perdita dell'espressione di antigeni tumorali, qualora non essenziali per la crescita o il mantenimento del fenotipo tumorale, costituiscono un vantaggio per la cellula neoplastica che non verrebbe riconosciuta dal sistema immunitario (5, 8). Anche le molecole costimolatorie come B7 sono fondamentali per avviare la risposta da parte delle cellule dell'immunità e la loro assenza nella maggior parte dei tumori contribuisce all'anergia a livello dei linfociti T (9). Un altro meccanismo di evasione dal controllo immunitario è la formazione di LPA, ossia peptidi immunogenici alterati, che inducono una risposta solo parziale e antagonizzano così l'effetto del recettore wild type (10). Infine le cellule tumorali possono

produrre grandi quantità di fattori e citochine immunosoppressive come VEGF, TGF- β , IL-10, FasL solubile (11) in grado di inibire un'ampia gamma di funzioni linfocitarie e macrofagiche (12) e favorire l'espansione di cellule T regolatorie. Queste sono una sottopopolazione di cellule T CD4+ esprimenti CD25 e il fattore di trascrizione Foxp3 con un ruolo importante nel promuovere la crescita tumorale sopprimendo l'attivazione delle cellule effettrici specifiche per antigeni self (13). Allo scopo di fronteggiare questi meccanismi di evasione, la nostra ricerca si focalizza su due approcci principali. Da un lato il potenziamento della risposta mediata dalle cellule immunitarie e dall'altro un'azione indiretta, mirata a colpire le componenti dello stroma tumorale.

L'immunoterapia antitumorale ha lo scopo di generare una risposta immunitaria efficace nei confronti del tumore, sfruttando le caratteristiche di potenza e specificità del sistema immunitario per eliminare le cellule tumorali, preservando i tessuti sani.

Negli ultimi decenni la ricerca si è pertanto focalizzata sulla messa a punto di strategie immunoterapeutiche, attive o passive, che mirano ad un targeting specifico della cellula tumorale, oltre che su approcci di immunomodulazione (14). Strategie di immunoterapia attiva prevedono la vaccinazione tramite il trasferimento di antigeni tumorali o la reinfusione di cellule dendritiche (DC) caricate *ex vivo* con antigeni associati al tumore (15). Le strategie di immunoterapia passiva consistono nella generazione *ex vivo* e successivo trasferimento nel paziente di molecole effettrici, quali anticorpi monoclonali di rilevanza clinica, Rituximab (MabThera[®]), Trastuzumab (Herceptin[®]) e Cetuximab (Erbix[®]) o di cellule effettrici, principalmente linfociti T e cellule NK (15).

I tentativi di interrompere lo stato di tolleranza attraverso approcci di vaccinazione intensiva hanno spesso fallito. Una soluzione è l'utilizzo di linfociti T coltivati ed espansi *ex vivo*, lontano dalle condizioni di immunosoppressione presenti in vivo, al fine di rompere lo stato di tolleranza e permetterne l'attivazione (15).

Evidenza diretta della potenza di queste cellule effettrici deriva dall'uso in clinica di infusioni di linfociti di donatore (DLI) per il trattamento di pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (CML) sottoposti a trapianto allogenico di midollo osseo (BMT) ed andati in contro a recidiva. L'effetto Graft-versus-leukemia (GVL) mediato dalle cellule T alloreattive del donatore è responsabile della potente risposta anti-leucemica (16). Difficoltà pratiche in termini di disponibilità di un donatore HLA compatibile e sviluppo della Graft-versus-host disease (GVHD) ne hanno però limitato l'utilizzo (15).

Un'alternativa al trapianto di cellule allogeniche è la Terapia Cellulare Adottiva (ACT) che prevede l'infusione nel paziente oncologico di linfociti autologhi precedentemente manipolati ed espansi *ex vivo* con lo scopo di aumentarne la risposta immune antitumorale (17). A tale scopo, effettori quali linfociti T, cellule NK, lymphokine-activated-killer cells (LAK) e cytokine-induced-killer-cells (CIK) hanno mostrato di possedere un'efficacia antitumorale in vivo (18).

Il trasferimento adottivo di linfociti T prevede due diverse sorgenti di cellule effettrici: cellule T reattive contro il tumore presenti naturalmente (TIL) e cellule T geneticamente modificate.

La terapia basata sui TIL si è mostrata efficace in pazienti affetti da melanoma metastatico, determinando una regressione duratura del tumore (19).

Tuttavia questo rappresenta un caso isolato; il melanoma è considerato uno dei tumori più immunogenici e pertanto un bersaglio ideale per l'immunoterapia ed in particolare per l'ACT (20). L'identificazione e l'isolamento dei TIL non è praticabile in altre forme tumorali, dove il repertorio linfocitario dei T autoreattivi è stato compromesso dal fenomeno di tolleranza immunologica centrale ed il tumore ha messo in atto strategie di evasione (15, 21).

Questo ha gettato le basi per lo sviluppo di strategie di riprogrammazione genica dei T volte a:

- 1) potenziare la funzione antineoplastica (e.g. conferire specificità per il tumore, aumentare la produzione di citochine, favorire la migrazione nel sito tumorale);
- 2) migliorare la sopravvivenza e conferire resistenza all'ambiente immunosoppressivo tumorale;
- 3) garantire la sicurezza dell'approccio (e.g. inserimento di geni suicidi) (17).

Tecnologie di trasferimento genico hanno permesso di ingegnerizzare i linfociti T per esprimere TCR ricombinanti o recettori antigenici chimerici (CAR), entrambi in grado di ridirezionarne la specificità nei confronti di specifici antigeni tumorali (22).

Il TCR canonico è un complesso di almeno sei catene polipeptidiche (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) che si assemblano sulla superficie del linfocita T. Le catene α e β costituiscono il dominio di legame primario del TCR, responsabile del riconoscimento di peptidi intracellulari processati e presentati su molecole MHC sulla superficie delle cellule target (15).

I geni codificanti per le catene α e β del TCR possono essere isolati da un linfocita specifico per l'antigene di interesse, inseriti in un vettore e così trasdotti in un gran numero di linfociti T del paziente (23). Questa strategia ha permesso di generare linfociti T con TCR reattivi nei confronti dei seguenti antigeni tumorali: MDM-2 (24), P53 (25), CEA (26), gp100 (27), MAGE-A3 (28), MAGE-C2 (29), NY-ESO-1 (30), TARP (31), WTI (32). Il primo trial clinico di successo fu condotto dal gruppo di Rosenberg nel 2006. Pazienti affetti da melanoma ricevettero un trattamento di ACT con linfociti autologhi da sangue periferico (PBL) trasdotti con il TCR specifico per MART-1, un antigene associato al melanoma (19).

Seppur elegante, questo approccio di TCR-based T cell engineering presenta numerosi limiti. La restrizione per MHC dei linfociti T richiede l'utilizzo di TCR diversi per riconoscere il medesimo antigene in ciascun background HLA. Ciò nonostante, la tendenza dei tumori a downregolare l'espressione degli HLA nel corso della progressione tumorale, rende inefficaci i linfociti T (22). I TCR possono interagire con antigeni proteici ma raramente con carboidrati e glicolipidi, i quali costituiscono due importanti categorie di antigeni tumorali (33). Infine, vi è la possibilità teorica che la trasduzione del TCR porti alla formazione di ibridi tra le catene α e β endogene e quelle trasdotte, portando alla formazione di TCR con specificità non prestabilita (33). Molti gruppi hanno superato questo limite generando eterodimeri α e β incapaci di dimerizzare con le catene endogene (21).

Parallelamente si è evoluto il concetto di chimeric antigen receptors (CAR), introdotto da Eshrar Z. nel 1989 (34). I CAR, chiamati anche “T-body”, sono recettori sintetici in cui, nella loro struttura di base (1^a generazione), il frammento variabile a catena singola (scFv) di un anticorpo è fuso, tramite una regione cerniera flessibile, al dominio di segnale intracellulare della catena ζ del complesso TCR/CD3 o più raramente della catena γ del recettore per le immunoglobuline Fc ϵ RI²³. L’interazione tra gli epitopi antigenici e l’scFv porta alla fosforilazione delle tirosine delle sequenze ITAM della catena ζ del TCR, successivo signaling nucleare che esita nell’attivazione del linfocita. Si classificano in CAR di 1^a, 2^a, 3^a generazione sulla base del numero di domini costimolatori aggiunti in tandem al costruito per ottimizzare l’attivazione e la sopravvivenza dei linfociti T trasferiti adottivamente in vivo (15).

Il dominio scFv dei CAR è generalmente ottenuto da anticorpi monoclonali (mAb) murini, pertanto potrebbe evocare risposte immunitarie e determinare una rapida clearance dei linfociti T ingegnerizzati. Per evitare questa possibilità, le strategie attuali prevedono l’utilizzo di scFv umanizzati o di derivazione completamente umana (22).

Sebbene i CAR di 1^a generazione siano in grado di ridirezionare l’attività citotossica dei linfociti *in vitro*, nei trial clinici hanno mostrato una scarsa efficacia contro diversi tipi tumorali, quali neuroblastoma (35), linfoma non-Hodgkin (36), tumore renale (37) ed ovarico (38), a causa della limitata espansione e sopravvivenza *in vivo* e conseguentemente ad un ridotto effetto anti-tumorale (15, 22). Difatti, la completa attivazione dei linfociti T naive richiede un secondo segnale mediato da molecole costimolatorie espresse dalle cellule presentanti l’antigene (APC) (39).

Per sopperire alla mancanza di segnali costimolatori all’interno del microambiente tumorale, CAR di 2^a generazione sono stati realizzati incorporando in serie al CD3 ζ i domini di segnale intracellulari di recettori costimolatori quali CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD244, CD27 ed il costimolatore inducibile (ICOS) (22).

In generale, le cellule T modificate con CAR di 2^a generazione hanno mostrato *in vivo* un incrementato homing, proliferazione, persistenza ed attività antitumorale rispetto ai CAR di 1^a generazione (15, 40).

CAR di 3^a generazione sono stati realizzati tramite l’aggiunta di un secondo dominio costimolatorio, combinando ad esempio CD28 con 4-1BB (41) e CD28 con OX-40 (42).

Seppur realizzati al fine di incrementare ulteriormente la potenza dei linfociti effettori, sono state sollevate preoccupazioni riguardanti la safety; i CAR di 3^a generazione sarebbero in grado di abbassare la soglia di attivazione a tal punto da permettere l’attivazione dei linfociti T anche in presenza di antigeni a bassa affinità di legame, portando ad un cospicuo rilascio di citochine potenzialmente letale (15). L’utilizzo di linfociti T-CAR offre numerosi vantaggi rispetto all’immunoterapia con linfociti T con TCR ricombinanti. I CAR combinano la caratteristica di specificità antigenica di un anticorpo con la capacità litica di un linfocita T (17). Pertanto, non necessitano di una presentazione antigenica MHC-ristretta e sono

quindi insensibili ai meccanismi di escape tumorali (15). Altra conseguenza è che i CAR riconoscono un più vasto range di antigeni tumorali, non solo proteici ma anche carboidrati e glicolipidi, con il limite che questi siano espressi sulla superficie cellulare (17). Inoltre, l'alta affinità del dominio scFv per l'antigene rende i linfociti T ingegnerizzati altamente reattivi anche in presenza di basse densità antigeniche (23). Infine, dal momento che i CAR sono in grado di attivare sia i LT CD4+ che CD8+, la trasduzione dei LT del paziente è in grado di produrre una risposta sia helper che citotossica, e quindi più efficace nei confronti del tumore (23).

Dei 36 trial clinici, completati ed in corso, basati su linfociti T-CAR, due terzi sono diretti nei confronti di tumori ematopoietici ed hanno raggiunto ottimi risultati (22). Trial clinici indipendenti hanno utilizzato linfociti T-CAR di 2ª generazione (CAR:CD28-CD3 ζ , CAR: 4-1BB-CD3 ζ) per bersagliare l'antigene CD19 in pazienti con neoplasie delle cellule B quali linfoma, leucemia linfocitica cronica (CLL), leucemia linfocitica acuta a cellule B (B-ALL), leucemia linfoblastica acuta (ALL) (21). Nonostante divergano su molti parametri, inclusi la struttura del vettore ed il protocollo terapeutico, hanno dato tutti risultati incoraggianti (15, 21). Difatti, molteplici aspetti dei tumori a cellule B sembrano renderli target ideali della terapia con linfociti T-CAR. L'espressione del CD19 ristretta ai linfociti B normali e tumorali limita gli effetti collaterali su altri tessuti sani. Inoltre, essendo i linfociti B delle APC professionali possono fornire ulteriori segnali costimolatori ai linfociti effettori. Non da meno il fatto che le cellule target formino aggregati di piccole dimensioni facilmente aggredibili dai linfociti trasferiti (43).

Contrariamente, traguardi più modesti sono stati raggiunti nei trattamenti rivolti a tumori solidi, aventi come antigeni target CD171 e GD2 per il neuroblastoma, CEA per il tumore al seno e del colon-retto, il recettore α del folato (α FR) per il carcinoma ovarico, MART1, MAGEA3, NYESO1, P53 E gp100 per il melanoma e l'*antigene di membrana specifico della prostata* (PSMA) per il carcinoma della prostata (21).

Nel nostro laboratorio ci siamo occupati di riprogrammare geneticamente i linfociti T al fine di mettere a punto una strategia terapeutica cellulare anti-tumorale nei confronti del neuroblastoma, un tumore solido extracranico dell'infanzia di origine neuroectodermica, refrattario alla chemioterapia nel 50% dei casi. Tale metodica prevede l'utilizzo di vettori retrovirali per ingegnerizzare i linfociti T citotossici con un CAR anti-GD2 e renderli così in grado di riconoscere ed aggredire cellule tumorali esprimenti il disialonganglioside GD2, un antigene riscontrato in diversi tumori neuroectodermici. Il recettore chimerico anti-GD2 è costituito da una regione extracellulare di legame al GD2 (anti-GD2 scFv) fusa alla porzione intracitoplasmatica di segnale 4-1BB-CD3 ζ tramite il dominio transmembrana del CD8 α .

Il potenziale citotossico dei linfociti anti-GD2-BB- ζ CAR è stato valutato con successo nei confronti di due linee di neuroblastoma altamente aggressive consentendo di gettare le basi per un prossimo trasferimento clinico. Tuttavia questa fase, nei tumori solidi, potrebbe essere penalizzata dalla difficoltà di homing dei T-CAR all'interno delle masse tumorali. Inoltre, una volta localizzati nel tumo-

re, è possibile che i T-CAR possano risentire di un microambiente tumorale fortemente immunosoppressivo capace di limitarne l'espansione e la persistenza a lungo termine (40, 43). In questo senso, approcci di immunoterapia con CAR potrebbero trovare maggiore spazio nelle fasi successive a debulking chemio/radio e/o chirurgici ovvero in approcci combinati immaginabili ma ancora da disegnare nei dettagli.

Per superare questi limiti, nel tempo si è compresa l'importanza delle cellule dell'ospite, la cui funzione è essenziale per lo sviluppo della neoplasia e possono rivelarsi bersagli migliori in quanto geneticamente più stabili. Sono state testate tre strategie generali: colpire il pathway angiogenico del tumore, proteggere i tessuti sani, soprattutto il midollo osseo, dagli effetti tossici della chemioterapia, e agire a livello del sistema immunitario. Recentemente hanno suscitato molto interesse anche gli approcci che bersagliano le cellule stromali a ridosso massa tumorale, utilizzando come veicolo di terapia genica cellule stromali/staminali mesenchimali (mesenchymal stromal/stem cells, MSC).

Le MSC sono una popolazione di progenitori multipotenti identificati per la prima volta da Friedenstein nel midollo osseo (44) e successivamente isolati da numerosi altri tessuti. In vitro si caratterizzano per la morfologia fibroblastoide, una spiccata capacità clonogenica e proliferativa e la capacità di differenziare in osteoblasti, adipociti e condrociti. Il loro utilizzo come veicoli per la terapia genica nasce dall'evidenza che MSC somministrate per via sistemica vengono reclutate preferenzialmente in distretti lesionati dell'organismo secondo meccanismi di chemoattrazione non del tutto chiariti, ivi compresi tessuti tumorali (45, 46). In questi siti le MSC vengono incorporate nell'architettura dello stroma tumorale (47) dove esercitano una funzione di supporto alla crescita tumorale sopprimendo la risposta immune, inibendo l'apoptosi, stimolando l'angiogenesi, l'invasività e la metastasi (48).

Le evidenze riguardo la loro capacità di reprimere la risposta immune sono ad oggi ancora contrastanti e teorie più recenti suggeriscono piuttosto un effetto dipendente dal bilancio tra segnali stimolatori e inibitori mettendo in luce come le MSC potrebbero favorire la repressione in un microambiente già immunodepresso come quello tumorale e invece stimolare la risposta infiammatoria in condizioni fisiologiche (49). I meccanismi proposti includono la diretta induzione dell'apoptosi nei LT, l'induzione di cellule T regolatorie e la secrezione di citochine immunomodulanti come IL-1 β , TGF- β e HGF (50).

Nonostante, come riportato, molte evidenze mostrino come le MSC possano supportare la neoplasia, diversi studi hanno evidenziato un effetto opposto, che porta all'inibizione della crescita tumorale. In questi casi l'effetto sul tumore è indipendente dall'induzione di una risposta immunitaria ma si basa piuttosto sull'inibizione delle cellule endoteliali e sul blocco dell'angiogenesi (51, 52).

Basandosi su queste evidenze, si è fatta strada l'idea di sfruttare le qualità delle MSC di integrarsi nel microambiente tumorale e ingegnerizzarle per aumentare il loro potenziale inibitorio. I primi studi in questo senso hanno confermato la fattibilità della strategia (53, 54) e le MSC sono state usate come veicoli per trasporto mirato di citochine immunostimolanti come IL-2, IFN- α , IFN- β e CX3CL1 (47,

55-57). Lo spettro di possibili strategie terapeutiche si è ampliato successivamente con l'introduzione di virus oncolitici, enzimi per la conversione di pro-farmaci e ligandi di morte come TRAIL e FasL.

TRAIL è una proteina espressa da cellule NK, CTL, macrofagi e cellule dendritiche identificata nel 1995 sulla base della sua omologia di sequenza con FasL e TNF (58, 59). La sua espressione così circoscritta su cellule dell'immunità suggerisce che possa contribuire alla maturazione del sistema immunitario e alla regolazione della risposta (60).

TRAIL viene espresso in una forma legata alla membrana e una solubile, entrambe in grado di trimerizzare e attivare la via apoptotica in seguito al legame con il recettore di morte sulla cellula bersaglio. Per la terapia antitumorale si è rivelato un candidato promettente in virtù della sua capacità di indurre l'apoptosi in svariati istotipi tumorali senza dimostrare una significativa tossicità nei confronti delle cellule sane (60).

Ad oggi, svariati composti sintetici in grado di legarsi ai recettori per TRAIL attivandone la cascata apoptotica si sono rivelati efficaci in studi preclinici e sono passati alla fase clinica. Tra questi soprattutto forme ricombinanti di TRAIL e anticorpi agonisti per i suoi recettori si sono dimostrati ben tollerati dai pazienti ma la loro efficacia antitumorale è stata al di sotto delle aspettative (61).

Nel nostro laboratorio ci siamo anche focalizzati su cellule mesenchimali progenitrici da tessuto adiposo (AD-MSC) che sono state modificate geneticamente per la produzione di TRAIL. Grazie a questo approccio, la molecola viene veicolata alla neoplasia in maniera continuativa e mirata consentendo il superamento di alcune importanti criticità dimostrate dalle terapie con i composti sintetici come la ridotta emivita e la diluizione della molecola nel flusso sanguigno. I nostri studi hanno dimostrato come questa strategia sia efficace nei confronti di tumori ad elevata mortalità come il carcinoma della cervice uterina, tumori al colon e al pancreas (62). Usando due differenti modalità di somministrazione, è stato dimostrato che le AD-MSC esprimenti TRAIL sono in grado di migrare e integrarsi nel microambiente tumorale senza generare effetti collaterali nel tessuto sano circostante. La citotossicità selettiva per le cellule tumorali è dovuta essenzialmente ad un loro contatto diretto con le AD-MSC che, esprimendo TRAIL, innescano la cascata di segnalazione apoptotica che porta alla morte della cellula tumorale.

Inoltre abbiamo anche valutato la combinazione con altri agenti terapeutici quali il Bortezomib, un noto inibitore del proteasoma utilizzato per il trattamento del mieloma multiplo. In particolare, linee tumorali resistenti a TRAIL sono state trattate in vitro allo scopo di renderle sensibili al nostro approccio di terapia cellulare. I risultati ottenuti hanno dimostrato una sinergia tra i due trattamenti nei confronti di una linea di tumore al seno nota per essere resistente a TRAIL.

Questi studi incoraggianti sembrano mostrare che approcci combinatori di chemio e radio terapia standard con la veicolazione mirata di molecole di origine immunitaria o immunostimolanti consentiranno di superare i limiti dei trattamenti attuali aprendo la strada a nuove prospettive terapeutiche basate sulla manipolazione cellulare.

Questo progetto è stato finanziato da: Associazione Italiana Ricerca Cancro (AIRC), Ministero della Salute-Giovani Ricercatori 2008, Associazione Sostegno Ematologia Oncologia Pediatrica (ASEOP).

Bibliografia

1. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140: 883-899.
2. Nagy JA, Chang S-H, Shih S-C, Dvorak AM, Dvorak, H. F. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010; 36: 321-331.
3. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986; 315: 1650-1659.
4. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol*. 2007; 19: 203-208.
5. Abbas AK, Lichtman A, Pober J. *Immunologia cellulare e molecolare*. 2000.
6. Diefenbach A, Raulet DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol. Rev.* 2002; 188: 9-2.
7. Prévost-Blondel A, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J Immunol Baltim Md*. 1998; 161: 2187-2194.
8. Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res*. 2001; 83: 117-118.
9. Hellström I, Hellström KE. T cell immunity to tumor antigens. *Crit Rev Immunol*. 1998; 18: 1-6.
10. Sloan-Lancaster J, Allen PM. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14: 1-27.
11. Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol*. 2001; 186, 153-168.
12. De Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol Baltim Md*. 1993; 150: 4754-4765.
13. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci*. 2011; 7: 651-658.
14. Riether C, Schürch C, Ochsenein AF. From 'magic bullets' to specific cancer immunotherapy. *Swiss Med Wkly*. 2013; 143: w13734.
15. Ruella M, Kalos M. Adoptive immunotherapy for cancer. *Immunol Rev*. 2014; 257: 14-38.
16. Kolb HJ et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990; 76: 2462-2465.
17. Vera JF, Brenner MK, Dotti G. Immunotherapy of human cancers using gene modified T lymphocytes. *Curr Gene Ther*. 2009; 9: 396-408.

18. Mondino A, Dardalhon V, Hess Michelini R, Loisel-Meyer S, Taylor N. Redirecting the immune response: role of adoptive T cell therapy. *Hum Gene Ther.* 2010; 21: 533-541.
19. Morgan RA, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006; 314: 126-129.
20. Bernatchez C, Radvanyi LG, Hwu P. Advances in the treatment of metastatic melanoma: adoptive T-cell therapy. *Semin Oncol.* 2012; 39: 215-226.
21. Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13: 525-541.
22. Essand M, Loskog ASI. Genetically engineered T cells for the treatment of cancer. *J Intern Med.* 2013; 273: 166-181.
23. Varela-Rohena A, et al. Genetic engineering of T cells for adoptive immunotherapy. *Immunol Res.* 2008; 42: 166-181.
24. Stanislawski T, et al. Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat Immunol.* 2001; 2: 962-970.
25. Cohen CJ, et al. Recognition of fresh human tumor by human peripheral blood lymphocytes transduced with a bicistronic retroviral vector encoding a murine anti-p53 TCR. *J Immunol Baltim. Md.* 2005; 175: 5799-5808.
26. Parkhurst MR, et al. Characterization of genetically modified T-cell receptors that recognize the CEA:691-699 peptide in the context of HLA-A2.1 on human colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009; 15: 169-180.
27. Morgan RA, et al. High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. *J Immunol Baltim Md.* 2003; 171: 3287-3295.
28. Chinnasamy N, et al. A TCR targeting the HLA-A*0201-restricted epitope of MAGE-A3 recognizes multiple epitopes of the MAGE-A antigen superfamily in several types of cancer. *J Immunol Baltim Md.* 2011; 186: 685-696.
29. Straetemans T, et al. TCR gene transfer: MAGE-C2/HLA-A2 and MAGE-A3/HLA-DP4 epitopes as melanoma-specific immune targets. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 586314.
30. 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 Baltim Md.* 2005; 174: 4415-4423.
31. Hillerdal V, Nilsson B, Carlsson B, Eriksson F, Essand M. T cells engineered with a T cell receptor against the prostate antigen TARP specifically kill HLA-A2+ prostate and breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2012; 109: 15877-15881.
32. Tsuji T, et al. Generation of tumor-specific, HLA class I-restricted human Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T-cell receptor genes. *Blood.* 2005; 106: 470-476.
33. Imai C, Campana D. Genetic modification of T cells for cancer therapy. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2004; 18: 62-71.
34. 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.* 1989; 86: 10024-10028.
35. Park JR, et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2007; 15: 825-833.
 36. Till BG, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 2008; 112: 2261-2271.
 37. Lamers CHJ, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006; 24: e20-22.
 38. Kershaw MH, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006; 12: 6106-6115.
 39. Sharpe AH, Abbas AK. T-cell costimulation-biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med.* 2006; 355: 973-975.
 40. Zhang Q, et al. Strategies to improve the clinical performance of chimeric antigen receptor-modified T cells for cancer. *Curr Gene Ther.* 2013; 13: 65-70.
 41. 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.* 2009; 106, 3360-3365.
 42. Pulè MA, et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2005; 12: 933-941.
 43. Gilham DE, Debets R, Pule M, Hawkins RE, Abken H. CAR-T cells and solid tumors: tuning T cells to challenge an inveterate foe. *Trends Mol Med.* 2012; 18: 377-384.
 44. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970; 3: 393-403.
 45. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PLoS ONE.* 2008; 3: e1886.
 46. Lazennec G, Jorgensen C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells Dayt Ohio.* 2008; 26: 1387-1394.
 47. Nakamizo A, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 2005; 65: 3307-3318.
 48. Reagan MR, Kaplan DL. Concise review: mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2011; 29: 920-927.
 49. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol.* 2014.
 50. Chen P-M, Yen M-L, Liu K-J, Sytwu H-K, Yen B-L. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2011; 18: 49.

51. Kidd S, et al. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy*. 2008; 10: 657-667.
52. Zipori D, Krupsky M, Resnitzky P. Stromal cell effects on clonal growth of tumors. *Cancer*. 1987; 60: 1757-1762.
53. Allay JA, et al. LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther*. 1997; 8: 1417-1427.
54. Matthews KE, Keating A. Gene therapy with physical methods of gene transfer. *Transfus Sci*. 1996; 17: 29-34.
55. Nakamura K, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther*. 2004; 11: 1155-1164.
56. Ren C, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2008; 26: 2332-2338.
57. Xin H, et al. Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007; 25: 1618-1626.
58. Pitti RM, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*. 1996; 271: 12687-12690.
59. Wiley SR, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995; 3: 673-682.
60. Gonzalez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*. 2010; 29: 4752-4765.
61. Stuckey DW, Shah K. TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2013; 19: 685-694.
62. Grisendi G, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res*. 2010; 70: 3718-3729.

Reversibilità del processo amiloide: interpretazioni attuali

Giampaolo Merlini

Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo
e Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia

La deposizione di aggregati proteici fibrillari insolubili nello spazio extracellulare è caratteristica comune di un ampio gruppo di malattie causate da un anomalo ripiegamento (folding) proteico, le amiloidosi (Fig. 1) (1). La deposizione di materiale fibrillare, con la caratteristica ultrastruttura a foglietti beta antiparalleli, può essere localizzata, al cervello nel caso della malattia di Alzheimer, o sistemica (Tab. 1). Le amiloidosi sistemiche sono oggetto di questa relazione. Il processo di formazione dei depositi di amiloide si associa ad un danno funzionale e strutturale degli organi bersaglio. Tradizionalmente, i depositi di amiloide e il danno d'organo da questi causati, erano considerati permanenti, irreversibili. Tuttavia, già nel 1928 è stata documentata la rapida risoluzione, nell'arco di poche settimane, dei depositi viscerali di amiloide in giovani pazienti affetti da malattia infiammatoria cronica trattata con successo (2). Questa importante osservazione ha dimostrato che la soppressione della sintesi della proteina amiloidogena può tradursi nella rapida clearance dei depositi di amiloide.

Attualmente le strategie terapeutiche nelle amiloidosi sistemiche sono orientate in tre principali direzioni:

- sopprimere la produzione della proteina amiloidogena;
- interferire con il processo di formazione delle fibrille amiloidi;
- promuovere il riassorbimento dei depositi di amiloide.

Soppressione della produzione della proteina amiloidogena

Nella forma di amiloidosi sistemica più comune, causata da catene leggere immunoglobuliniche (amiloidosi AL), la riduzione della concentrazione del precursore amiloide si traduce nel miglioramento della disfunzione d'organo e della sopravvivenza (3). Regimi chemioterapici efficaci possono portare alla remissione completa del clone plasmacellulare midollare che sintetizza la catena leggera amiloidogena. I farmaci utilizzati sono mutuati da quelli sviluppati per il mieloma multiplo (3). In considerazione dei gravi danni sistemici causati dalla proteotossicità della catena leggera monoclonale amiloidogena, l'intensità del trattamento

deve essere “*risk-adapted*” e modulata secondo la gravità del danno d’organo, soprattutto della gravità del coinvolgimento e danno cardiaco (4). La stratificazione in base al rischio (stadiazione) e la risposta al trattamento si basano sulla misura dei biomarcatori cardiaci e delle catene leggere amiloidogeniche (5, 6). Un

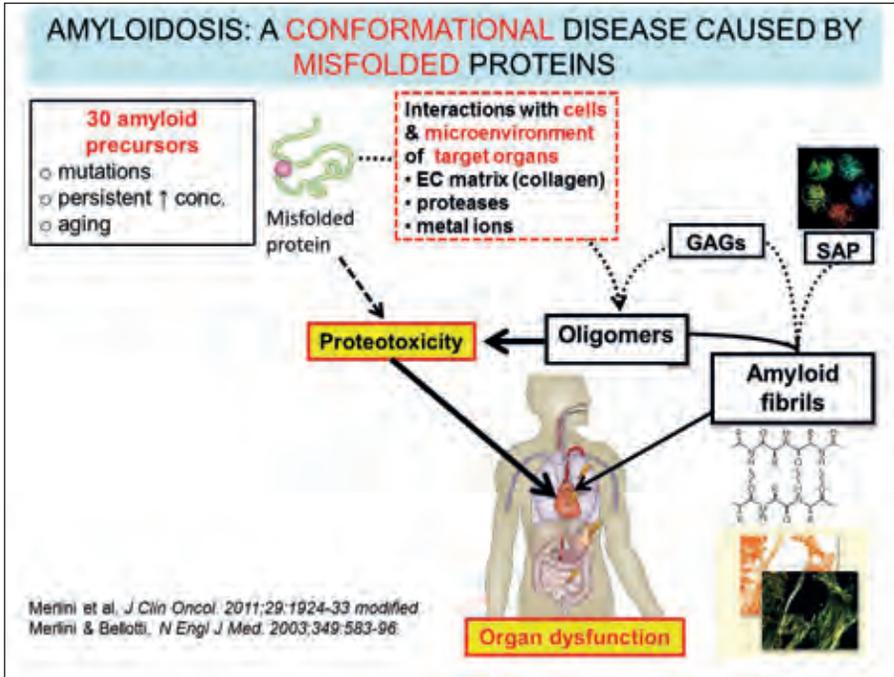


Fig. 1 - Meccanismi di formazione delle fibrille amiloidi. Instabilità intrinseca, concentrazioni persistentemente elevate, mutazioni, clivaggio proteolitico o una loro combinazione possono favorire la conversione del precursore amiloidogenico nel suo conformero “misfolded”. Sono note almeno 30 proteine amiloidogeniche. Oligomeri in equilibrio con le fibrille amiloidi, o la proteina amiloidogenica possono esercitare un effetto citotossico diretto. L’interazione con i fattori tissutali è fondamentale sia per la localizzazione dei depositi che per il danno funzionale dell’organo colpito. I glicosaminoglicani (GAG) e la componente amiloide P del siero (SAP), contribuiscono alla formazione e persistenza di depositi di amiloide, che concorrono al deterioramento funzionale degli organi colpiti.

Tab. 1 - Principali forme di amiloidosi e loro precursori proteici. Una lista completa è disponibile nel lavoro di Sipe et al. (47).

Amiloidosi localizzate		Amiloidosi sistemiche	
Aβ	Aβ precursore proteico - malattia di Alzheimer	AL	Catene leggere immunoglobuliniche -amiloidosi primaria e associata a mieloma multiplo
APrP	Proteina prionica - malattia di Creutzfeld-Jacob e condizioni correlate	ATTR	Transtiretina mutata - polineuropatia amiloidotica familiare (FAP) e condizioni correlate
ATTR	Transtiretina non mutata - amiloidosi senile cardiaca	AA	Siero amiloide A - amiloidosi reattiva a condizioni infiammatorie croniche
AIAPP	“Islet amyloid polypeptide” - amiloide localizzata alle isole di Langerhans	ALect2	“Leukocyte chemotactic factor-2” - amiloidosi renale

ampio studio collaborativo internazionale ha dimostrato che l'entità della riduzione della proteina amiloidogena è strettamente correlata alle modificazioni di concentrazione dei biomarcatori cardiaci e alla sopravvivenza (7). L'osservazione che la riduzione della concentrazione sierica della catena leggera amiloidogena si traduce in una simultanea riduzione dei biomarcatori cardiaci e a un marcato miglioramento della funzione cardiaca, indipendentemente dalla persistenza dei depositi di amiloide nel cuore, indica che il precursore amiloidogenico può esercitare un effetto cardiotoxic diretto (8). Questa osservazione ha aperto nuove prospettive sulla patogenesi della amiloidosi AL e aperto la strada a innovativi approcci terapeutici. Studi in vitro e in modelli animali hanno successivamente documentato l'effetto tossico delle catene leggere, purificate da pazienti con cardiomiopatia amiloide, sulla funzione e vitalità dei cardiomiociti attraverso vie di segnale e meccanismi di danno intracellulare che sono oggetto di intensa ricerca (9-11). Anche nella amiloidosi reattiva (AA) è stato dimostrato che la riduzione del precursore amiloidogenico, siero amiloide A, si traduce nel miglioramento della funzione dell'organo bersaglio e della sopravvivenza (12). Questo traguardo si raggiunge per mezzo del trattamento aggressivo della patologia di base infiammatoria, ora facilitato dalla disponibilità di farmaci biologici anti-citochine.

La riduzione della sintesi del precursore amiloidogenico rappresenta la pietra angolare anche nel trattamento della amiloidosi ereditaria causata da transtiretina mutata. La transtiretina è una proteina di trasporto della tiroxina e del retinolo, prodotta per più del 90%, dal fegato e per il rimanente dai plessi corioidei e dall'epitelio retinico. L'approccio terapeutico considerato di riferimento è stato per molti anni il trapianto di fegato (13, 14) e l'esperienza ventennale con questo approccio ha fornito solide evidenze sia sui benefici, ma anche sulle importanti limitazioni di questa procedura. Le indicazioni al trapianto di fegato sono ora limitate ad una popolazione ben selezionata. Una nuova strada è rappresentata dal silenziamento della espressione del gene della transtiretina per mezzo di oligonucleotidi antisenso (ASO) (15) o "*RNA interference*" (siRNA) (16, 17). Una seconda generazione di ASO (ISIS-TTR(Rx)) è stata validata in topi transgenici e in primati, dimostrando una riduzione dose-dipendente di circa l'80% sia dell'mRNA che delle concentrazioni plasmatiche di transtiretina (18). L'oligonucleotide si lega ad una regione non tradotta dell'mRNA della transtiretina inibendo la sintesi sia della forma mutata che della transtiretina "wild-type", rendendo questo farmaco potenzialmente utile anche per il trattamento della amiloidosi senile sistemica caratterizzata da cardiomiopatia dovuta all'accumulo di transtiretina non mutata nel cuore. Uno studio di fase III è ora in corso sia in Europa che in USA in pazienti con polineuropatia amiloide familiare (FAP) da transtiretina. In parallelo con la tecnologia ASO, la soppressione della sintesi epatica di transtiretina è stata ottenuta con siRNA che ha come bersaglio una sequenza conservata nella regione 3' del gene non mutato e mutato della transtiretina (17). La seconda generazione di questo agente (ALN-TTR02) è in grado di ridurre la concentrazione plasmatica di transtiretina di circa il 90% in media e per circa 4 settimane con minimi effetti collaterali (17). Uno studio di fase III sta per iniziare ed è previsto anche uno studio di fase II in pazienti con cardiomiopatia amiloide da transtiretina.

Interferire con il processo di formazione delle fibrille amiloidi

Questa strada terapeutica è stata aperta dagli avanzamenti delle conoscenze dei meccanismi molecolari coinvolti nella formazione e deposizione delle fibrille amiloidi. Ad esempio, nella amiloidosi causata da transtiretina (ATTR) la definizione della cascata di eventi molecolari che porta alla formazione degli aggregati proteici ed alla loro deposizione tissutale sotto forma di fibrille amiloidi ha fornito le basi per una serie di approcci terapeutici innovativi (Fig. 2) (19). L'evento chiave è la dissociazione dell'omotetramero di transtiretina in monomero. La stabilizzazione cinetica della struttura nativa della transtiretina è alla base dello sviluppo di farmaci per questo tipo di amiloidosi. Piccole molecole, tiroxina, acido flufenamico, in grado di stabilizzare il tetramero, attraverso il legame nel canale idrofobico formato dalle quattro molecole di transtiretina, riducono la liberazione del monomero e la formazione di fibrille di amiloide in vitro (20, 21). Lo screening di ampie librerie di composti ha identificato numerose piccole molecole aromatiche in grado di legarsi con alta affinità al canale centrale del tetramero, fra questi alcuni FANS, flavonoidi e xantoni (22). Il diflunisal, un FANS già in commercio anche in Italia, si è dimostrato promettente grazie alle alte concentrazioni raggiungibili nel plasma (23). I risultati di uno studio di fase III, di recente pubblicazione, hanno

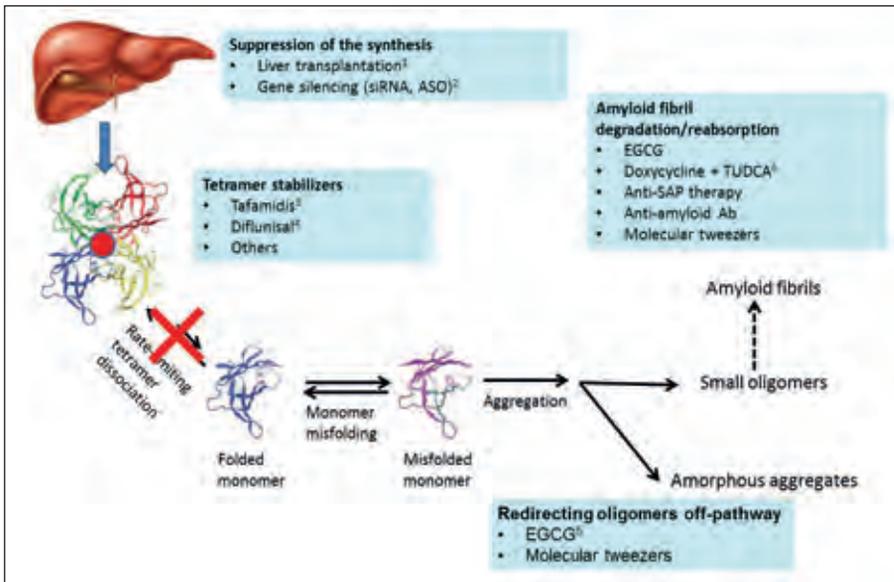


Fig. 2 - Approccio terapeutico alla amiloidosi da transtiretina (ATTR). La soppressione della sintesi di TTR è stato raggiunto attraverso il trapianto di fegato nel corso degli ultimi 20 anni e nuovi approcci volti a silenziare il gene sono ora in sperimentazione clinica. Stabilizzatori cinetici del tetramero di TTR, come tafamidis e diflunisal si sono dimostrati efficaci nel fermare la progressione neurologica. Il processo di aggregazione può essere reindirizzato verso aggregati innocui attraverso epigallocatechin-gallato (EGCG), e "molecular tweezers". Molti sforzi sono ora diretti per promuovere la degradazione e il riassorbimento dei depositi di amiloide sia con doxiciclina e acido tauroursodesossicico (TUDCA) sia attraverso immunoterapia passiva, utilizzando anticorpi monoclonali umanizzati (Ab) che riconoscono le fibrille amiloidi o componenti dei depositi amiloidi come la componente amiloide P del siero (SAP).

dimostrato l'efficacia di questo farmaco nel trattamento di pazienti con FAP (24). Studi cristallografici hanno fornito le basi per il disegno di farmaci con alta capacità stabilizzante il tetramero di transtiretina. Uno di questi, il tafamidis, si è dimostrato efficace in uno studio di fase III nel trattamento di pazienti con FAP (25, 26). Questo farmaco è stato approvato dall'EMA nel 2011 ed è ora disponibile in Europa per la cura di pazienti con FAP in fase iniziale della malattia. I glicosaminoglicani, macromolecole caratterizzate dalla presenza di numerosi residui polari spazati regolarmente, svolgono un ruolo importante nel favorire la formazione di aggregati di proteine amiloidi e la loro successiva organizzazione in fibrille (Fig. 1). È stato riportato che una piccola molecola sulfonata, l'eprodiate, è in grado di inibire l'interazione fra proteina amiloide, la siero amiloide A, e glicosaminoglicani in vitro riducendo i depositi di amiloide in un modello murino (27). Uno studio di fase III ha dimostrato che questo composto è in grado di ridurre la velocità di progressione del danno renale in pazienti con amiloidosi reattiva (AA) (28) ed un secondo studio controllato, a scopi registrativi, è attualmente in corso (NCT01215747). Numerosi composti naturali, soprattutto polifenoli policiclici con proprietà antiossidanti, si sono dimostrati recentemente in grado di interferire con la fibrillogenesi attraverso nuovi meccanismi (29). La catechina principale del tè verde, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), si lega direttamente a numerose proteine amiloidogeniche generando aggregati amorfi di piccolo peso molecolare, stabili, non tossici e non in grado di progredire verso la formazione di fibrille (off-pathway) (Fig. 2) (30, 31). Inoltre, è stato dimostrato che l'EGCG è in grado di rimodellare le fibrille di amiloide convertendole in aggregati amorfi (29). In due modelli murini di FAP, il trattamento con EGCG ha ridotto i depositi di transtiretina nel tratto gastroenterico e nel sistema nervoso periferico (32). Osservazioni aneddotiche indicano che l'EGCG possa produrre benefici clinici (33) e attualmente 4 trials con EGCG sono in corso compreso uno studio controllato presso il nostro Centro in pazienti con amiloidosi AL e cardiomiopatia (NCT01511263). Un altro composto naturale, la curcumina, sembra mostrare proprietà interessanti sia in vitro che in modelli animali di amiloidosi da transtiretina (34). L'osservazione che composti in grado di legare residui di lisina di differenti proteine amiloidogeniche erano in grado di inibire la fibrillogenesi attraverso la distruzione di interazioni chiave di natura idrofobica ed elettrostatica ha portato alla identificazione di una nuova classe di agenti anti-amiloide, detti "molecular tweezers" (35). Questi composti favoriscono la formazione di piccoli aggregati non tossici e non in grado di progredire verso la formazione di fibrille, similmente all'EGCG. Risultati incoraggianti sono stati ottenuti in vitro e in modelli animali di amiloidosi da transtiretina e da A β .

Promuovere il riassorbimento dei depositi di amiloide

Le amiloidosi sono tradizionalmente considerate patologie da accumulo e pertanto da sempre l'attenzione dei ricercatori è rivolta alla ricerca di agenti in grado di promuovere la rimozione dei depositi con l'obiettivo di migliorare la funzione degli organi coinvolti e di conseguenza la qualità e la durata della vita.

Agli inizi degli anni 90 abbiamo dimostrato per la prima volta che una piccola molecola, 4'-iodo-4'-deoxy-doxorubicin (I-DOX) era in grado di inibire l'amiloidogenesi in vitro e in un modello murino (36) e di promuovere il riassorbimento dei depositi di amiloide in pazienti con amiloidosi AL (37). Successivamente è stato dimostrato che I-DOX era in grado di disaggregare le fibrille di amiloide (38) e degli oligomeri pre-fibrillari (39). Un composto con caratteristiche strutturali simili a quelle di I-DOX è l'antibiotico doxiciclina. Questa si è dimostrata in grado di distruggere le fibrille di amiloide in vitro e di ridurre i depositi di transtiretina in un modello murino (40, 41). Più recentemente è stato dimostrato che l'acido tauroursodeossicolico agisce sinergicamente con la doxiciclina (42). Un trial terapeutico in corso nel nostro Centro (NCT01171859) ha dimostrato preliminarmente che questa associazione è in grado di stabilizzare la malattia per almeno 12 mesi nella grande maggioranza dei pazienti (43).

La possibilità di accelerare la clearance dei depositi di amiloide per mezzo di immunoterapia passiva è oggetto di studio da parte di alcuni centri di ricerca. Il gruppo del National Amyloidosis Center di Londra, sfrutta un costituente comune a tutti i depositi di amiloide, SAP, come bersaglio terapeutico di anticorpi monoclonali umanizzati. La terapia combinata di una piccola molecola in grado di legarsi alla SAP circolante, CPHPC, determinandone la rapida clearance, e di un anticorpo diretto contro SAP si è dimostrata in grado di promuovere il riassorbimento dei depositi di amiloide in un modello murino di amiloidosi AA (44). Il gruppo della Università del Tennessee sta sviluppando un approccio di immunoterapia passiva per mezzo di un anticorpo monoclonale diretto contro un epitopo espresso dalle catene leggere fibrillari con risultati promettenti in un modello murino (45). Un anticorpo monoclonale che si è dimostrato efficace nell'imaging di depositi di amiloide ha anche accelerato il riassorbimento di amiloide in un modello animale (46). Questo anticorpo, NEOD001, è ora in sperimentazione clinica di fase I-II (NCT01707264).

Conclusioni

L'avanzamento delle conoscenze dei meccanismi molecolari coinvolti nel processo di formazione dei depositi di amiloide e dei meccanismi di danno tissutale ha messo in luce nuovi bersagli terapeutici e aperto innovative vie terapeutiche. Tutti i passaggi chiave della cascata di eventi molecolari sono ora aggredibili per mezzo di farmaci già in corso di sperimentazione clinica. In un futuro prossimo la terapia delle amiloidosi sistemiche si avvarrà della associazione di più farmaci mirati alla soppressione della sintesi del precursore amiloidogenico, ad inibire la formazioni di specie prefibrillari tossiche ed a accelerare il riassorbimento dei depositi di amiloide.

L'obiettivo è la prevenzione e il recupero del danno funzionale e strutturale causato dal processo amiloidogenico con miglioramento della qualità e durata della vita. In questo contesto, la precocità della diagnosi è di vitale importanza per consentire un intervento terapeutico tempestivo che anticipi danni sistemici irreversibili.

Bibliografia

1. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med*. 2003; 349 (6): 583-596.
2. Waldenstrom H. On the formation and disappearance of amyloid in man. *Acta Chir Scand*. 1928; 63: 479-530.
3. Merlini G, Wechalekar AD, Palladini G. Systemic light chain amyloidosis: an update for treating physicians. *Blood*. 2013; 121 (26): 5124-5130.
4. Palladini G, Merlini G. Current treatment of AL amyloidosis. *Haematologica*. 2009; 94 (8): 1044-1048.
5. Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, et al. Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol*. 2004; 22 (18): 3751-3757.
6. Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. *J Clin Oncol*. 2012; 30 (9): 989-995.
7. Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol*. 2012; 30 (36): 4541-4549.
8. Palladini G, Lavatelli F, Russo P, et al. Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL. *Blood*. 2006; 107 (10): 3854-3858.
9. Guan J, Mishra S, Shi J, et al. Stanniocalcin1 is a key mediator of amyloidogenic light chain induced cardiotoxicity. *Basic Res Cardiol*. 2013; 108 (5): 378.
10. Mishra S, Guan J, Plovie E, et al. Human amyloidogenic light chain proteins result in cardiac dysfunction, cell death, and early mortality in zebrafish. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013; 305 (1): H95-103.
11. Shi J, Guan J, Jiang B, et al. Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38alpha MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107 (9): 4188-4193.
12. Gillmore J, Lovat L, Persey M, Pepys M, Hawkins P. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*. 2001; 358 (9275): 24-29.
13. Benson MD. Liver transplantation and transthyretin amyloidosis. *Muscle Nerve*. 2013; 47 (2): 157-162.
14. Yamashita T, Ando Y, Okamoto S, et al. Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*. 2012; 78 (9): 637-643.
15. Benson MD, Smith RA, Hung G, et al. Suppression of choroid plexus transthyretin levels by antisense oligonucleotide treatment. *Amyloid*. 2010; 17 (2): 43-49.
16. Kurosawa T, Igarashi S, Nishizawa M, Onodera O. Selective silencing of a mutant transthyretin allele by small interfering RNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 337 (3): 1012-1018.

17. Coelho T, Adams D, Silva A, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 2013; 369 (9): 819-829.
18. Ackermann EJ, Guo S, Booten S, et al. Clinical development of an antisense therapy for the treatment of transthyretin-associated polyneuropathy. *Amyloid.* 2012; 19 (Suppl. 1): 43-44.
19. Sekijima Y, Kelly JW, Ikeda S. Pathogenesis of and therapeutic strategies to ameliorate the transthyretin amyloidoses. *Curr Pharm Des.* 2008; 14 (30): 3219-3230.
20. Hammarstrom P, Wiseman RL, Powers ET, Kelly JW. Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science.* 2003; 299 (5607): 713-716.
21. Baures PW, Oza VB, Peterson SA, Kelly JW. Synthesis and evaluation of inhibitors of transthyretin amyloid formation based on the non-steroidal anti-inflammatory drug, flufenamic acid. *Bioorg Med Chem.* 1999; 7 (7): 1339-1347.
22. Johnson SM, Connelly S, Fearn C, Powers ET, Kelly JW. The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *J Mol Biol.* 2012.
23. Sekijima Y, Dendle MA, Kelly JW. Orally administered diflunisal stabilizes transthyretin against dissociation required for amyloidogenesis. *Amyloid.* 2006; 13 (4): 236-249.
24. Berk JL, Suhr OB, Obici L, et al. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2013; 310 (24): 2658-2667.
25. Coelho T, Maia LF, da Silva AM, et al. Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol.* 2013; 260 (11): 2802-2814.
26. Coelho T, Maia LF, Martins da Silva A, et al. Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy: a randomized, controlled trial. *Neurology.* 2012; 79 (8): 785-792.
27. Kisilevsky R, Lemieux L, Fraser P, Kong X, Hultin P, Szarek W. Arresting amyloidosis in vivo using small-molecule anionic sulphonates or sulphates: implications for Alzheimer's disease. *Nat Med.* 1995; 1 (2): 143-148.
28. Dember L, Hawkins P, Hazenberg B, et al. Eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *N Engl J Med.* 2007; 356 (23): 2349-2360.
29. Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, et al. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107 (17): 7710-7715.
30. Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, et al. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol.* 2008; 15 (6): 558-566.
31. Hauber I, Hohenberg H, Holstermann B, Hunstein W, Hauber J. The main green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate counteracts semen-mediated enhancement of HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106 (22): 9033-9038.
32. Ferreira N, Saraiva MJ, Almeida MR. Epigallocatechin-3-gallate as a potential

- therapeutic drug for TTR-related amyloidosis: “in vivo” evidence from FAP mice models. *PLoS One*. 2012; 7 (1): e29933.
33. Hunstein W. Epigallocatechin-3-gallate in AL amyloidosis: a new therapeutic option? *Blood*. 2007; 110 (6): 2216.
 34. Ferreira N, Santos SA, Domingues MR, Saraiva MJ, Almeida MR. Dietary curcumin counteracts extracellular transthyretin deposition: insights on the mechanism of amyloid inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832 (1): 39-45.
 35. Sinha S, Lopes DH, Du Z, et al. Lysine-specific molecular tweezers are broad-spectrum inhibitors of assembly and toxicity of amyloid proteins. *J Am Chem Soc*. 2011; 133 (42): 16958-16969.
 36. Merlini G, Ascari E, Amboldi N, et al. Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: inhibition of amyloidogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92 (7): 2959-29563.
 37. Gianni L, Bellotti V, Gianni AM, Merlini G. New drug therapy of amyloidosis: resorption of AL-type deposits with 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin. *Blood*. 1995; 86 (3): 855-861.
 38. Palha JA, Ballinari D, Amboldi N, et al. 4'-Iodo-4'-deoxydoxorubicin disrupts the fibrillar structure of transthyretin amyloid. *Am J Pathol*. 2000; 156 (6): 1919-1925.
 39. Sebastião MP, Merlini G, Saraiva MJ, Damas AM. The molecular interaction of 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with Leu-55Pro transthyretin ‘amyloid-like’ oligomer leading to disaggregation. *Biochem J*. 2000; 351(Pt 1): 273-279.
 40. Cardoso I, Merlini G, Saraiva MJ. 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin and tetracyclines disrupt transthyretin amyloid fibrils in vitro producing noncytotoxic species: screening for TTR fibril disrupters. *FASEB J*. 2003; 17 (8): 803-809.
 41. Cardoso I, Saraiva MJ. Doxycycline disrupts transthyretin amyloid: evidence from studies in a FAP transgenic mice model. *FASEB J*. 2006; 20 (2): 234-239.
 42. Cardoso I, Martins D, Ribeiro T, Merlini G, Saraiva MJ. Synergy of combined doxycycline/TUDCA treatment in lowering Transthyretin deposition and associated biomarkers: studies in FAP mouse models. *J Transl Med*. 2010; 8:7 4.
 43. Obici L, Cortese A, Lozza A, et al. Doxycycline plus tauroursodeoxycholic acid for transthyretin amyloidosis: a phase II study. *Amyloid*. 2012; 19 (Suppl. 1): 34-36.
 44. Bodin K, Ellmerich S, Kahan MC, et al. Antibodies to human serum amyloid P component eliminate visceral amyloid deposits. *Nature*. 2010; 468 (7320): 93-97.
 45. Solomon A, Weiss DT, Wall JS. Therapeutic potential of chimeric amyloid-reactive monoclonal antibody 11-1F4. *Clin Cancer Res*. 2003; 9 (10 Pt 2): 3831S-8S.
 46. Wall JS, Kennel SJ, Williams A, et al. AL amyloid imaging and therapy with a monoclonal antibody to a cryptic epitope on amyloid fibrils. *PLoS One*. 2012; 7 (12): e52686.
 47. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, et al. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*. 2012; 19 (4): 167-670.

NUOVE STRATEGIE DI TERAPIA MIRATA

Farmaci inibitori di tirosinochinasi responsabili della crescita tumorale

Antonella Isacchi

Reparto di Biotecnologie, Coordinatrice della Piattaforma Chinasica, Nerviano Medical Sciences, Milano

Grazie alla mappatura del genoma umano e alle sempre maggiori conoscenze molecolari sui meccanismi alla base della genesi e progressione tumorale, negli ultimi vent'anni la ricerca oncologica si è indirizzata verso il nuovo paradigma delle terapie mirate.

In parallelo, la pratica clinica sta evolvendo da un trattamento basato sui sintomi e sulla classificazione d'organo dei tumori ad un trattamento basato sul background genetico del singolo paziente e sul profilo molecolare del singolo tumore, in altre parole, la cosiddetta "Terapia Personalizzata".

I nuovi farmaci oncologici non sono pensati per essere attivi genericamente contro tutti i tumori e/o pazienti, come nel caso dei farmaci citotossici utilizzati nella chemioterapia tradizionale, ma per agire contro bersagli molecolari specifici per uno o più sottotipi tumorali. Per questa caratteristica i nuovi farmaci vengono definiti "mirati" in quanto mirano all'inibizione di uno specifico bersaglio farmacologico. Questo nuovo approccio prevede che la risposta ad un determinata terapia dipenda dalla presenza e dal ruolo del suo bersaglio terapeutico nei tessuti tumorali del paziente. Infatti ci si attende che non tutti i pazienti risponderanno al trattamento, ma solo quelli portatori di tumori in cui il bersaglio è attivato in maniera costitutiva, tipicamente in seguito ad alti livelli di espressione o ad alterazioni genetiche.

La scelta del bersaglio diventa quindi un passaggio essenziale nello sviluppo di nuovi farmaci, che ne condiziona in maniera determinante l'efficacia, la selettività e la tollerabilità. Il bersaglio ideale è una proteina che gioca un ruolo fondamentale nei meccanismi della genesi tumorale, la cui inibizione è tollerata nei tessuti normali, e che può essere inibito con molecole chimiche o con anticorpi. Tra i bersagli molecolari che maggiormente si prestano a questo approccio vi sono le diverse proteine che appartengono alla famiglia delle chinasi, enzimi che giocano un ruolo fondamentale nei diversi processi fisiologici, la cui attività è frequentemente disregolata in diverse patologie, prime fra tutte quelle oncologiche.

Una delle caratteristiche più rilevanti della famiglia delle chinasi è il fatto che comprende più di 500 membri (1), offrendo quindi ampie opportunità di scelta per la selezione di bersagli da inibire nei diversi sottotipi tumorali. Al tempo stesso, le

chinasi hanno in comune una regione conservata, il sito di legame per l'ATP, un cofattore fondamentale per l'attività enzimatica che presenta caratteristiche simili a quelle dei farmaci costituiti da molecole chimiche cosiddette "small molecules", per differenziarle dagli anticorpi, anch'essi in grado di inibire le chinasi. La conservazione della tasca dell'ATP tra le diverse chinasi è un fattore molto importante per lo sviluppo di farmaci inibitori in quanto permette di disegnare delle molecole chimiche in grado di competere con l'ATP prevenendone il legame. Conoscendo a livello strutturale i determinanti di legame dell'ATP nelle chinasi si possono quindi generare librerie chimiche di molecole "ATP competitive" potenzialmente attive, tra cui selezionare quelle più potenti e selettive per il bersaglio di interesse. La famiglia delle chinasi comprende serino-treonino chinasi e tirosino chinasi, a seconda della specificità di riconoscimento del substrato a cui trasferiscono un gruppo fosfato. Sono state identificate circa 90 tirosino chinasi, 58 delle quali sono recettori transmembrana di fattori di crescita, mentre le rimanenti sono di tipo citoplasmatico. Le tirosino chinasi giocano un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale, funzionando come regolatori e attivatori di un network complesso a cascata che alla fine arriva al nucleo dove influenza la trascrizione. Le tirosino chinasi controllano in una maniera strettamente regolata i processi fondamentali della cellula compreso il ciclo cellulare, la proliferazione, la differenziazione, la motilità e la morte e la sopravvivenza cellulare. Nei tumori, queste funzioni diventano indipendenti dai fattori di regolazione e la fosforilazione eccessiva mantiene le vie di trasduzione del segnale perennemente attivate. Le cellule tumorali si adattano a questo stato di iperattivazione, diventando dipendenti secondo il concetto di "oncogene addiction". Per questo, quando una singola chinasi attivata diventa il "driver" della proliferazione oncogenica la sua inibizione ha effetti drammatici sulla crescita tumorale.

Per queste loro caratteristiche le chinasi, ed in particolare le tirosino chinasi, rispondono ai requisiti di rilevanza biologica e di potenziale sensibilità ai farmaci, la cosiddetta "druggability", e hanno attirato fin dall'inizio l'interesse delle diverse aziende farmaceutiche impegnate nello sviluppo di farmaci mirati.

Non a caso uno dei primi farmaci mirati è stato l'Imatinib (Glivec, Novartis Pharmaceuticals), il primo inibitore di chinasi approvato all'inizio degli anni 2000 che ha cambiato il corso naturale dei pazienti di Leucemia Mieloide Cronica inibendo l'attività della proteina bersaglio BCR-ABL risultato di una traslocazione reciproca tra i cromosomi 9 e 21, "driver" fondamentale di questa patologia (2). Successivamente, sono stati approvati inibitori di BCR-ABL di seconda generazione come il Nilotinib (Tasigna, Novartis Pharmaceuticals), il Bosutinib (Bosulif, Pfizer, Inc.) e il Ponatinib (Iclusig, Ariad), recentemente reimmesso sul mercato con alcune misure di sicurezza per prevenire problemi di coagulazione e restringimento dei vasi, e altri inibitori sono in via di sviluppo (3, 4).

Il successo del Glivec ha aperto la strada allo sviluppo di nuovi farmaci inibitori di tirosino chinasi, contribuendo allo sviluppo dei farmaci inibitori di una o più chinasi, spesso mutate o alterate in una piccola percentuale di tumori. Questo porta a suddividere i diversi tipi tumorali in sottopopolazioni a bassa frequenza caratterizzate dalla presenza di singoli difetti molecolari. Uno dei tumori che vie-

ne spesso utilizzato come paradigma di questo approccio è il tumore al polmone, dove la scoperta di farmaci mirati ha avuto un grandissimo impatto negli ultimi 10 anni, fornendo una serie di approcci personalizzati per trattare una patologia tumorale tra le più diffuse con la più alta mortalità, nella quale la cura rimane una grandissima sfida.

In particolare, il carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) rappresenta l'80-85% dei tumori al polmone, e comprende il carcinoma squamoso e non squamoso. Mentre il primo è più strettamente correlato con l'abitudine al fumo dei pazienti, il tumore al polmone non squamoso comprende gli adenocarcinomi, il sottotipo più diffuso nei non fumatori che corrisponde circa al 40% dei tumori al polmone. Ci sono tre geni attivati frequentemente nel NSCLC non squamoso ad oggi, KRAS, EGFR e ALK. Mentre non ci sono farmaci specifici per i tumori con mutazione di KRAS, il 10-15% dei pazienti con mutazioni di EGFR ricava dal trattamento con inibitori di EGFR il miglior beneficio, ed i tumori con riarrangiamenti di ALK sono estremamente sensibili agli inibitori di questa chinasi.

EGFR è una tirosina chinasi recettoriale della famiglia di ErbB che gioca un ruolo cruciale nella tumorigenesi attraverso il controllo di pathways come quello della MAPK e della PI3K che regolano la crescita e la morte cellulare. Gli inibitori di EGFR di Astra Zeneca Gefitinib (Iressa, Astra Zeneca) e erlotinib (Tarceva, Roche Pharma) sono stati i primi farmaci approvati dopo il Glivec all'inizio degli anni 2000. Tuttavia questi farmaci, inizialmente testati in popolazioni non selezionate, mostravano benefici assenti o molto limitati in quanto riguarda la risposta, la sopravvivenza libera da malattia (PFS) e la sopravvivenza totale. Nel 2004 tre studi famosi hanno identificato una serie di mutazioni attivanti nel dominio chinasi di EGFR, principalmente distribuite negli esoni 18-21, che si associano ad una estesa sensibilità agli inibitori della chinasi (5-7). Queste mutazioni si trovano più frequentemente in pazienti giovani, asiatici, di sesso femminile, non fumatrici, con NSCLC classificati istologicamente come adenocarcinoma. In seguito, diversi studi compreso il fondamentale studio di Fase III IPASS del gefitinib su pazienti selezionati per marcatori clinici surrogati generalmente associati ad alta frequenza di mutazioni nel gene EGFR (pazienti femmine asiatiche non fumatrici) hanno mostrato significativi vantaggi in termini di RR e di PFS (8). Questi studi portarono a 4 successivi studi randomizzati di fase III su pazienti caratterizzati per la presenza di mutazioni di EGFR che paragonavano erlotinib o gefitinib in prima linea con la chemioterapia. Questi studi molecolari hanno portato all'approvazione del gefitinib in prima linea in Europa nel 2009 come terapia d'elezione in pazienti EGFR-mutati ora ampiamente utilizzata, e più recentemente nella stessa indicazione nei paesi dell'Asia-Pacifico, mentre non è prevista la registrazione negli USA. Erlotinib è il secondo farmaco inibitore potente e selettivo di EGFR approvato in Europa nel 2011 per il trattamento di questa sottopopolazione di pazienti, ed il primo farmaco approvato negli Stati Uniti nel 2013 per il trattamento di NSCLC con mutazioni di EGFR, unitamente al test diagnostico "cobas® EGFR Mutation Test", sviluppato da Roche per l'identificazione delle mutazioni e validato nel trial EURTAC dove si è osservato un PFS di 10.4 mesi per erlotinib rispetto a 5.2 mesi per la chemioterapia (9). Dall'ampio utilizzo di

gefitinib ed erlotinib si è visto che i pazienti con mutazione di EGFR che inizialmente rispondono alla terapia diventano resistenti nell'arco di 9-13 mesi di trattamento. Circa il 50% di questi tumori sviluppa la mutazione di EGFR T790M che aumenta l'affinità per l'ATP della chinasi e riduce quindi la finestra terapeutica degli inibitori ATP competitivi (10). Altri meccanismi di resistenza biologica comprendono l'attivazione di vie di trasduzione del segnale parallele, come quella delle tirosino chinasi IGFR, MET o HER2. Per rispondere almeno parzialmente a questi meccanismi di resistenza è stato sviluppato il farmaco Afatinib (Gilotrif Boehringer Ingelheim), un inibitore covalente in grado di inibire la trasduzione del segnale di EGFR/HER2-4, recentemente approvato (11).

Mentre gli studi con gli inibitori di EGFR sono stati lunghi e complessi, hanno aperto la via allo sviluppo di inibitori verso altre chinasi attivate nei tumori, mostrando la necessità inderogabile della caratterizzazione molecolare del DNA in supporto degli studi clinici, e dello sviluppo parallelo a quello del farmaco di un Companion Diagnostic, cioè un test diagnostico validato in maniera prospettica negli studi clinici per l'identificazione dei difetti molecolari.

Riarrangiamenti attivanti della chinasi ALK, principalmente NMP-ALK ma anche TPM3-ALK e TFG-ALK erano stati descritti molti anni fa nell'Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) e più recentemente in un subset di Inflammatory Myofibroblastic Tumors (IMT). Dopo questi studi ha suscitato clamore la scoperta nel 2007 che pazienti di NSCLC con riarrangiamenti della tirosino chinasi ALK sono presenti in circa il 4% dei casi, principalmente EML4-ALK, ma anche con KIF5B, TFG e KLC1, e mostrano alta sensibilità al trattamento con l'inibitore di ALK crizotinib (Xalkori, Pfizer). In seguito a due studi single-arm in cui crizotinib è stato amministrato ad un totale di 255 pazienti, il farmaco è stato rapidamente approvato già nel 2011 in via condizionale per il trattamento di pazienti con NSCLC risultati ALK-positivi con il test diagnostico Vysis ALK Break-Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular, Inc.) validato nello stesso studio clinico per l'identificazione dei riarrangiamenti (12).

Nel 2013 l'FDA ha confermato in via definitiva l'approvazione di crizotinib in seconda linea dopo i risultati dello studio Profile 1007 che ne ha confermato la superiorità in termini di RR (65% vs 20%) e PFS (7.7 vs 3.3) rispetto alla chemioterapia convenzionale. Anche in questo caso, numerosi altri farmaci sono in via di sviluppo per rispondere al problema della resistenza che si osserva anche in questo caso, a causa di mutazioni nella chinasi ALK, amplificazioni del gene di fusione o attivazione di nuove vie di trasduzione del segnale, compresa quella di EGFR (13, 14).

La figura 1 riporta i 20 inibitori di tirosino chinasi approvati per indicazioni oncologiche. Oltre a questi, vi sono diverse centinaia di molecole in sviluppo clinico, oltre alle attività precliniche di ricerca di inibitori su nuovi bersagli. Negli ultimi 10 anni gli sforzi per la validazione di nuovi bersagli si sono intensificati. È possibile ora utilizzare approcci genomici di analisi del DNA su larga scala per identificare geni mutati o alterati nei tumori. Gli studi condotti finora hanno mostrato che sebbene alcuni geni sono mutati ad alta frequenza, la maggior parte delle alterazioni avvengono a frequenze intermedie (2-20%) o anche più basse (<2%).

Continuando nell'utilizzo del NSCLC come esempio paradigmatico, oltre a mutazioni di EGFR e riarrangiamenti di ALK sono ora noti riarrangiamenti attivanti di ROS, RET e NTRK1, con frequenze intorno all'1-3% dei casi di adenocarcinoma. contro i quali sono in sviluppo preclinico o clinico nuovi farmaci mirati.

Riarrangiamenti di altre tirosino chinasi, quali NTRK3, FGFR1-3, AXL e PDGFRA, sono stati descritti in diversi sottotipi tumorali (15).

Data l'osservazione che le chinasi finora identificate si trovano casualmente mutate in piccoli sottogruppi tumorali di tumori molto diversi fra loro, e tenendo presente la rarità di ciascuno di questi eventi, il modo migliore di procedere prevederebbe l'analisi simultanea di un subset di geni potenzialmente bersaglio di terapie esistenti, piuttosto che l'analisi consecutiva di un piccolo numero di geni. È prevedibile che lo sviluppo verticale delle tecnologie di Next Generation Sequencing possa rendere l'approccio di sequenziamento di un pannello di geni o addirittura dell'intero genoma il più rapido ed economico, sicuramente fattibile all'interno di centri di eccellenza, probabilmente più problematico per una diffusione più capillare in ogni singolo ospedale. Accanto a questo approccio, la necessità di disporre di materiale clinico adeguato per l'analisi pone il tema dello sviluppo e del coordinamento delle biobanche come uno degli argomenti centrali per lo sviluppo delle terapie mirate.

Drug (yr 1 st approval)	Primary molecular target(s)	Primary oncology indication(s)*
Imatinib (2001)	ABL; PDGFR; c-KIT	Chronic myeloid leukemia. Ph+ acute lymphocytic leukemia. Gastrointestinal stromal tumors (2002)
Gefitinib (2003)	EGFR	Non small cell lung cancer
Erlotinib (2004)	EGFR	Non small cell lung and pancreas cancer
Sorafenib (2005)	VEGFR; PDGFR; cKIT; (...); B-RAF	Kidney and liver cancer. Thyroid cancer (2013)
Sunitinib (2006)	VEGFR; PDGFR; cKIT; RET; FLT3	Kidney cancer. Gastrointestinal stromal tumors. Pancreatic neuroendocrine tumors (2011)
Dasatinib (2006)	ABL; EphA; PDGFR; FYN; LCK; SRC	Chronic myeloid leukemia, Ph+ acute lymphocytic leukemia
Nilotinib (2007)	ABL; PDGFR	Ph+ chronic myeloid leukemia
Lapatinib (2007)	EGFR	Breast cancer HER2+
Pazopanib (2009)	VEGFR; PDGFR; cKIT; FGFR	Kidney cancer. Soft tissue sarcoma (2012)
Vandetanib (2011)	VEGFR; EGFR; RET	Medullary thyroid cancer
Crizotinib (2011)	ALK; MET; ROS	Non small cell lung cancer with abnormal ALK
Ruxolitinib (2011)	JAK	Myelofibrosis
Axitinib (2012)	VEGFR	Kidney cancer
Bosutinib (2012)	ABL; SRC kinases	Chronic myeloid leukemia Ph+
Regorafenib (2012)	VEGFR ₁₋₃ ; PDGFR; FGFR; RET; cKIT	Colorectal cancer. Gastrointestinal stromal tumors (2013)
Cabozantinib (2012)	VEGFR; RET; MET; cKIT; FLT3	Medullary thyroid cancer
Ponatinib (2012)	ABL; VEGFR; c-KIT; RET; FLT3	Chronic myeloid leukemia. Ph+ acute lymphocytic leukemia.
Trametinib (2013)	MEK1; MEK2	Melanoma with mutated B-RAF
Afatinib (2013)	EGFR	Non small cell lung cancer with mutated EGFR
Ibrutinib (2013)	BTK; ITK	Mantle cell lymphoma. Chronic lymphocytic leukemia (2014)



* May be advanced disease and/or treatment line; drug not necessarily used as single agent

Fig. 1- 20 FDA approved TKI drugs (oncology).

Molteplici sfide affiancano lo sviluppo della terapia personalizzata con inibitori di tirosino chinasi, tra le quali il problema della resistenza e dell'eterogeneità intratumorale, che portano alla necessità di conoscere in tempo reale il background genetico del tumore per poter utilizzare il farmaco giusto nel momento giusto, e la complessità nell'identificazione delle combinazioni più efficaci, sia tra i nuovi farmaci sia con la terapia convenzionale.

D'altra parte, l'alta percentuale di risposta, generalmente intorno al 60%, osservata con questi farmaci in pazienti selezionati, la generale tollerabilità dei trattamenti, in particolare con gli inibitori più selettivi, e la costante scoperta di tirosino chinasi attivate nei diversi tumori, rende lo sviluppo di nuovi inibitori di questi bersagli farmacologici uno dei settori più interessanti per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali.

Nei prossimi anni, la capacità di diagnosticare e trattare in maniera efficace i pazienti oncologici, sfruttando al meglio il potenziale delle nuove terapie mirate antitumorali, sarà strettamente dipendente da tre fattori principali:

- la sempre migliore comprensione delle cause molecolari alla base dei singoli tumori, fondamentale per la scelta del bersaglio farmacologico;
- lo sviluppo di nuovi farmaci potenti e selettivi, mirati all'inibizione di singoli bersagli molecolari;
- la disponibilità di test diagnostici in grado di associare a ciascun paziente il farmaco più adatto.

Bibliografia

1. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome *Science*. 2002; 298: 1912-1934.
2. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia *Blood*. 2005; 105: 2640-2653.
3. Elias J, Jabbour, Jorge E, Cortes, Hagop M, Kantarjian resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options *clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2013; 13: 515-529.
4. Breccia M, Alimena G. How to treat CML patients in the tyrosine kinase inhibitors era? From imatinib standard dose to second generation drugs front-line: Unmet needs, pitfalls and advantages *Cancer Letters* 2012; 322: 127-132.
5. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib *N Engl J Med*. 2004; 350: 2129-2139.
6. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy *Science* 2004; 304: 1497-1500.
7. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from 'never smokers' and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib *PNAS*. 2004; 101: 13306-13311.
8. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final ove-

- rall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS) *J Clin Oncol.* 2011; 29 (21): 2866-2874.
9. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial *Lancet Oncol.* 2012; 13 (3): 239-246.
 10. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, Meyerson M, Eck MJ. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105 (6): 2070-2075.
 11. Yang JC1, Shih JY, Su WC et al Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13 (5): 539-548.
 12. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *J Clin Oncol.* 2013; 31 (8): 1105-1111.
 13. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2013; 368 (25): 2385-2394.
 14. Ardini E, Galvani A. ALK Inhibitors, a pharmaceutical perspective front oncol. 2012; 2 (17): 1-8.
 15. Shaw AT, Hsu PP, Awad MM, Engelman JA. Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial *malignancies*. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13 (11): 772-787.

Immunomodulatori diretti verso nuovi bersagli molecolari

Antonio Sica

Laboratorio di Immunologia Molecolare, IRCCS Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI)

Gli stress immunologici, come infezione e il cancro, modificano l'entità e la composizione della cellule ematopoietiche, una caratteristica dell'immunoregolazione definita "ematopoiesi di emergenza", al fine di garantire il corretto approvvigionamento e la funzione delle cellule immunitarie in risposta ad un aumento della domanda (1) (Fig. 1). I tumori possono riprogrammare la differenziazione delle cellule mieloidi al fine di creare condizioni permissive per la progressione della malattia (2). Tuttavia, i meccanismi molecolari che guidano la mielopoiesi di "emergenza" durante la crescita tumorale rimangono in gran parte sconosciuti. Studi recenti indicano che le cellule mieloidi soppressorie (MDSCs) e i macrofagi associati a tumore (TAM), due principali popolazioni mieloidi associate allo sviluppo del cancro (2), derivano da un progenitore mieloidi comune (CMP) e acquisiscono un fenotipo funzionale alterato (3) (Fig. 2). MDSCs e TAM mostrano plasticità funzionale e sono considerate popolazioni cruciali per l'organizzazione della risposta infiammatoria associata a cancro (4-6), guidando la costruzione del microambiente protumorale (lesione tumorale) e del macroambiente (sistema immunitario dell'ospite) attraverso l'aumento sierico dei livelli di ematopoietine (Colony-Stimulating Factors) (7) e la conseguente induzione dell'ematopoesi (5). La plasticità funzionale delle cellule mieloidi è esemplificata nel paradigma M1 - M2, che definisce i macrofagi come cellule in grado di rispondere agli stimoli ambientali (es. prodotti microbici, cellule danneggiate, linfociti attivati) con l'acquisizione di diversi fenotipi funzionali.

Le cellule della linea monocito/macrofagica sono caratterizzate da una notevole diversità e plasticità funzionale. Nei tessuti, i fagociti mononucleati rispondendo agli stimoli ambientali (es. prodotti microbici, cellule danneggiate, linfociti attivati) con l'acquisizione di diversi fenotipi funzionali (8). Ad esempio, i macrofagi esprimono polarizzazione M1 in risposta a IFN- γ o a ligandi di recettori della famiglia TLR. Alternativamente, possono esprimere polarizzazione M2 in risposta a citochine Th2 (IL-4/IL-13). Il fenotipo M1 si caratterizza per l'espressione di alti livelli di citochine pro-infiammatorie, elevata produzione di azoto reattivo e intermedi dell'ossigeno, la promozione della risposta Th1 e una forte attività microbicida e tumoricida. Al contrario, macrofagi M2 sono coinvolti nella resistenza

ai parassiti, promuovono il rimodellamento tissutale e la progressione tumorale, svolgendo funzioni immunoregolarie. Nuove evidenze indicano che la polarizzazione dei macrofagi possa dipendere almeno in parte dal reclutamento di precursori circolanti, seguita dalla loro rieducazione in situ. Di notevole importanza, la polarizzazione M1 o M2 dei macrofagi influenza la loro risposta funzionale verso una seconda riesposizione a citochine Th1 (IFN- γ) o Th2 (IL-4) (9), fornendo così un potenziale meccanismo per risposte cliniche inattese nell'immunoterapia contro i tumori (10). Progressivi cambiamenti funzionali sono stati segnalati nelle cellule mieloidi associate a sviluppo tumorale, parallelamente alla progressione tumorale (2, 6). I tumori contribuiscono a questa eterogeneità funzionale promuovendo l'ematopoiesi di emergenza (3). In particolare, i fattori di crescita G-CSF e GM-CSF guidano la mielopoiesi di "emergenza" per garantire l'approvvigionamento di neutrofili e macrofagi di derivazione midollare ed extramidollare (1, 11). Inoltre, il fattore M-CSF promuove il differenziamento dei macrofagi da cellule precursori midollari, garantendo l'omeostasi tissutale (11) e la progressione tumorale. L'analisi delle vie di segnalazione che controllano l'emopoiesi ha rivelato

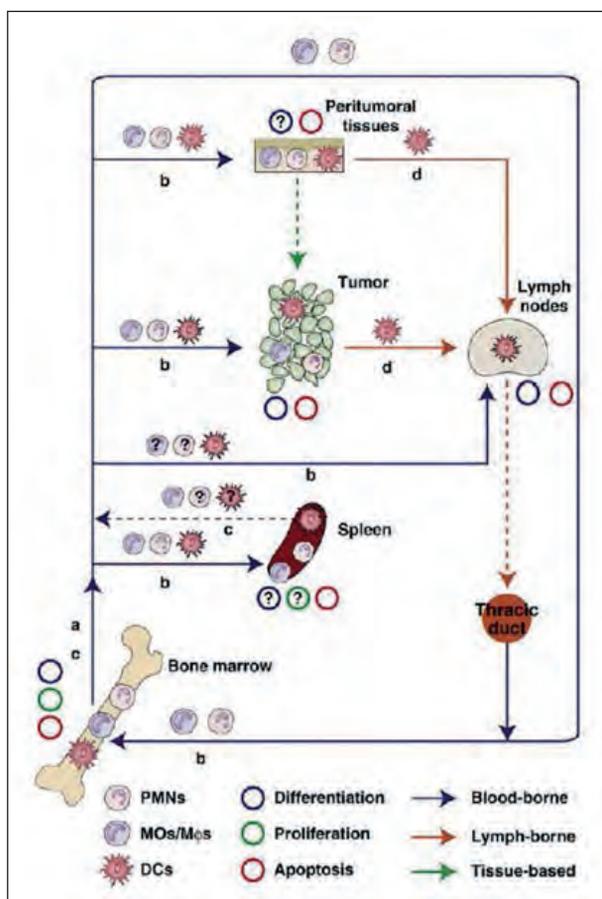


Fig. 1 - La migrazione delle sottopopolazioni mieloidi in portatori di tumore. a) A seguito di proliferazione e differenziazione di precursori mieloidi, MDSCs, neutrofili polimorfonucleati (PMN), monociti (MOs), macrofagi (Mφs) e cellule dendritiche (DC) escono dal midollo osseo per entrare nella circolazione sistemica. b) Sottopopolazioni circolanti di MDSC migrano ai tessuti periferici attraverso la via ematica. c) È stato suggerito che una parte dei PMN e MOs e Mφs che stravasano nel midollo osseo e nella milza possano ritornare in circolo mediante intravasazione. d) Le cellule dendritiche che infiltrano il tessuto tumorale possono migrare ai linfonodi, ma raramente ricircolano attraverso il dotto toracico.

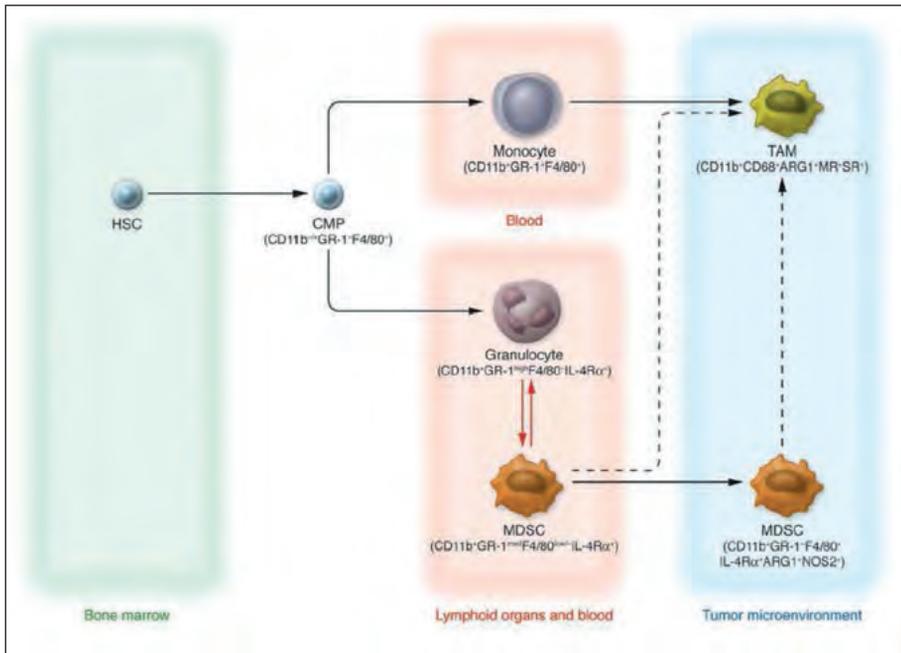


Fig. 2 - Differenziazione di TAM e MDSC. Cellule ematopoietiche danno origine a precursori comuni mieloidi (CMP), che successivamente origineranno almeno tre sottopopolazioni circolanti in ospiti con tumore, che possono essere identificate mediante marcatori specifici: monociti (CD11b + Gr-1 + F4/80 +), granulociti (CD11b + Gr-1^{high}F4/80-IL-4R α -), e MDSCs (CD11b + Gr-1^{med}F4/80^{low}-IL-4R α +). I monociti circolanti sono reclutati dai tumori e si differenziano in TAM, acquisendo funzioni protumorali. Durante la progressione del tumore, le MDSCs accumulano nel sangue e negli organi linfoidi come la milza, ma possono raggiungere anche il microambiente tumorale, dove differenziano a macrofagi F4/80+.

che G-CSF induce la granulopoiesi di “emergenza” attraverso l’attivazione dei fattori di trascrizione c-EBP β (12) e STAT3 (13), mentre M-CSF sostiene la differenziazione dei monociti attraverso l’attivazione dei fattori di trascrizione PU.1 e IRF8 (14). Di importanza, GM-CSF e M-CSF rappresentano rispettivamente segnali prototipici di polarizzazione M1 e M2, influenzando così differenziazione e polarizzazione delle cellule mieloidi (8, 15). Inoltre una lunga esposizione a segnali infiammatori (es. LPS-tolleranza) promuove una mielopoiesi alterata (16) e una riprogrammazione M1 verso M2 tempo-dipendente guidata dall’accumulo nucleare del fattore trascrizionale p50 NF- κ B, con implicazioni nella risoluzione della risposta infiammatoria (9). Questa osservazione suggerisce che l’esposizione a condizioni infiammatorie croniche, come quelle che si verificano nel cancro, possa riprogrammare funzionalmente le cellule mieloidi, alterando le loro risposte verso citochine immunostimolanti e limitandole quindi il potenziale terapeutico. Ad esempio, IFN- γ induce effetti pleotropici sulla crescita del tumore, promuovendo attività anti-angiogenica, inducendo l’attività tumoricida dei macrofagi e la presentazione di antigeni tumorali (17). Tuttavia, IFN- γ promuove anche le funzioni immunosoppressive delle cellule mieloidi associate a cancro (3), prin-

principalmente attraverso l'induzione degli enzimi immunosoppressivi indoleamine 2,3 diossigenasi (IDO) e ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS), rispettivamente coinvolti nel catabolismo di L-triptofano e L-arginina (3). Sorprendentemente, tali scenari divergenti sono stati confermati in clinica, dove sono state segnalate risposte miste al trattamento con IFN- γ trattamento in diverse neoplasie (10). È quindi necessario chiarire se la riprogrammazione delle funzioni delle cellule mieloidi che si verifica durante la progressione del cancro contribuisce in modo determinante al fallimento dell'immunoterapia mediata dalle citochine. Discuterò nuovi meccanismi di "tumor escape" e possibili terapie immunologiche.

Approcci terapeutici originariamente progettati contro altri bersagli si sono rivelati in grado di influenzare l'attivazione e polarizzazione dei macrofagi. Fattori chemiotattici per i monociti includono membri della superfamiglia delle chemochine, CCL2/MCP-1 in particolare, e fattori di crescita che interagiscono con i recettori tirosina chinasi, CSF-1R e VEGFR. Sono stati generati inibitori del recettore di CSF-1 (c-fms), con attività anti-angiogenica e anti-metastatica nella leucemia mieloide acuta e in modelli di melanoma. Chemochine e CSF-1 non hanno solo attività chemiotattica sui monociti, ma ne promuovono anche la polarizzazione M2. Anticorpi diretti contro CCL2/CCR2 si sono dimostrati attivi nel cancro della prostata e del seno.

Un inibitore di CCL2 (bindarit) si è dimostrato attivo in modelli preclinici di cancro e patologie vascolari, con conseguente inibizione del reclutamento dei monociti. Questo agente è ora in fase di valutazione per l'uso clinico. Anticorpi e oligonucleotidi antisense anti-CSF-1 sopprimono l'infiltrazione dei macrofagi e la crescita di tumori mammari xenografts. Inibitori di VEGF possono diminuire il reclutamento dei macrofagi e questo effetto può contribuire alla loro attività anti-angiogenica. Al contrario, in risposta a chemioterapia neoadiuvante si è osservato un cambiamento della composizione del microambiente tumorale immunitario in pazienti con cancro al seno, con maggiore percentuale di cellule mieloidi infiltranti. Recenti risultati suggeriscono che in situ, la proliferazione è un fattore determinante di accumulo dei macrofagi.

In particolare, IL-4 è stata dimostrata sostenere la proliferazione dei macrofagi. Il riorientamento della polarizzazione dei macrofagi è considerato una strategia chiave in molte patologie. Fenotipi macrofagici polarizzati sono reversibili in vitro e in vivo. In un ampio studio clinico in pazienti con tumore ovarico, IFN γ si è dimostrato in grado di riattivare attività tumoricide nei TAM, associato a risposta clinica. In un modello di adenocarcinoma pancreatico duttale, un agonista di CD40 ha promosso un notevole effetto anti-tumorale associato a alta espressione di marcatori M1 (MHC di classe II e CD86) nei macrofagi. Agonisti PPAR γ (tiazolidinedioni) sono da tempo utilizzati nel trattamento del diabete. Le evidenze che collegano PPAR γ alla polarizzazione M2 e quindi al ruolo omeostatico dei macrofagi associati a tessuto adiposo (ATM) gettano nuova luce sulla loro modalità di azione. Altri agenti terapeutici segnalati per influenzare la polarizzazione dei macrofagi sono l'acido zoledronico (un agente usato per la prevenzione delle recidive di tumore al seno e metastasi ossee), statine, la trabectedina e ligandi TLR (ad esempio imiquimod e CpG).

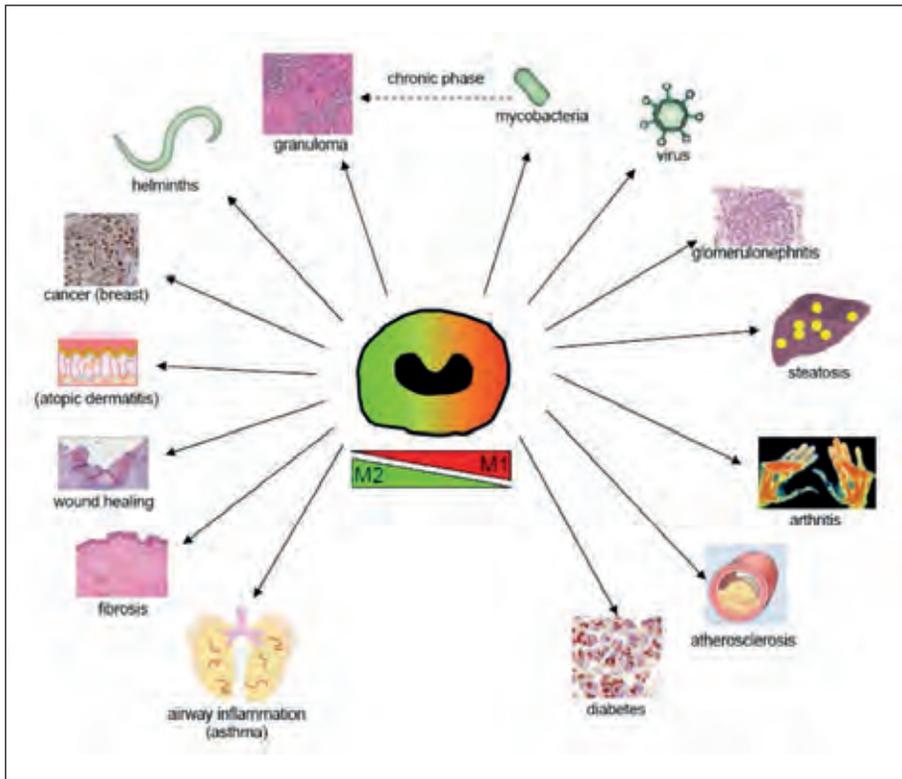


Fig. 3 - Rappresentazione schematica di plasticità e la polarizzazione dei macrofagi in patologia. Cambiamenti dinamici della polarizzazione dei macrofagi possono verificarsi nel tempo con l'evoluzione della patologia: ad esempio, una conversione di polarizzazione da M1 a M2 caratterizza il passaggio dalla prima fase a quelle croniche di varie infezioni. Inoltre, fenotipi misti o popolazioni con fenotipi differenti possono coesistere.

Conclusioni

Sono stati compiuti progressi nella definizione delle reti molecolari che sottendono l'attivazione dei macrofagi polarizzati. Determinanti molecolari di polarizzazione M1 e M2 sono membri delle famiglie di fattori trascrizionali PPAR, KLFs, IRF, STAT, NF- κ B, e HIF.

La polarizzazione funzionale dei macrofagi è stata osservata in vivo in condizioni fisiologiche (embriogenesi, gravidanza) e patologiche (infiammazione cronica, riparazione dei tessuti, disordini metabolici e vascolari, infezioni e cancro). È stato ampiamente dimostrato che i macrofagi sono una componente fondamentale di tutti questi processi (Fig. 3).

Parte delle loro attività fisiopatologiche sono il risultato di un rimodellamento epigenetico, che induce una riprogrammazione trascrizionale delle loro risposte a segnali di varia natura, compreso le citochine, influenzando sull'efficacia di approcci immunoterapeutici.

Bibliografia

1. Ueha S, Shand FH, Matsushima K. Myeloid cell population dynamics in healthy and tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11 (7): 783-788.
2. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*. 2007; 117 (5): 1155-1166.
3. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12 (4): 253-268.
4. Mantovani A, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013; 229 (2): 176-185.
5. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13 (10): 739-752.
6. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22 (2): 231-237.
7. Robinson WA. Granulocytosis in neoplasia. *Ann N Y Acad Sci*. 1974; 230: 212-218.
8. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012; 122 (3): 787-795.
9. Porta C, et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106 (35):14978-14983.
10. Vacchelli E, et al. Trial watch: immunostimulatory cytokines. *Oncoimmunology*. 2012; 1 (4): 493-506.
11. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010; 141 (1): 39-51.
12. Marigo I, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity*. 2010; 32 (6): 790-802.
13. Zhang H, et al. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood*. 2010; 116 (14): 2462-2471.
14. Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*. 2007; 26 (47): 6816-6828.
15. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 451-483.
16. Chandra R, et al. Endotoxemia down-regulates bone marrow lymphopoiesis but stimulates myeloopoiesis: the effect of G6PD deficiency. *J Leukoc Biol*. 2008; 83 (6): 1541-1550.
17. Dighe AS, et al. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994; 1 (6): 447-456.

Permanente soppressione della neoangiogenesi: una valida strategia contro la progressione tumorale

Patrizia Mancuso, Francesco Bertolini

Divisione di Laboratorio di Emato-Oncologia, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

L'angiogenesi tumorale, ovvero la formazione di nuovi vasi a partire dai preesistenti, rappresenta un processo cruciale nello sviluppo e nella progressione del tumore. Judah Folkman ipotizzò per la prima volta nel 1971 che la prevenzione dell'angiogenesi avrebbe potuto inibire la crescita tumorale privando le cellule dei nutrienti vitali per la progressione e la formazione di metastasi a distanza.

I farmaci anti-angiogenici, da soli in associazione con la chemioterapia (standard o metronomica) costituiscono oggi un importante sostegno all'obiettivo di cronicizzare la neoplasia metastatica. Negli ultimi dieci anni, bevacizumab, sunitinib, sorafenib, aflibercept, pazopanib e ramucirumab sono stati approvati nel trattamento del tumore del colon, seno, polmone, rene, sistema nervoso centrale, ovaio e stomaco.

In trial randomizzati questi farmaci (da soli o più spesso in combinazione con la chemioterapia) hanno migliorato sia la sopravvivenza libera da malattia che (talvolta) la sopravvivenza globale. Tuttavia i benefici clinici associati all'uso di questi farmaci anti-angiogenici sono limitati a pochi mesi e nella maggior parte dei casi l'evoluzione ad una progressione di malattia è inevitabile.

Due principali inconvenienti hanno limitato lo sviluppo clinico per questa categoria di farmaci. In primo luogo, la mancanza di marcatori biologici da utilizzare per riconoscere a priori quali pazienti beneficerebbero del trattamento ha impedito sinora di utilizzare questi farmaci in una popolazione di paziente opportunamente selezionata per i quali sia possibile predire un potenziale beneficio clinico. In secondo luogo, proprio la mancanza di biomarcatori validati impedisce di determinare la dose biologica ottimale per la somministrazione di questi farmaci.

Conoscere i meccanismi di resistenza della terapia anti-angiogenica per migliorare le strategie terapeutiche

Il principale bersaglio biologico dei farmaci anti-angiogenici ad oggi approvati in trial clinici è VEGF, i suoi recettori ed i pathways relativi. Sunitinib, sorafenib e

pazopanib sono attivi anche contro PDGFRs e nel caso di sorafenib anche contro RAF.

Le modalità di azione dei farmaci anti-angiogenetici sono quattro:

- Blocco della proliferazione dei vasi tumorali.
- Normalizzazione dei vasi non tumorali, così da migliorare il rilascio della chemioterapia in prossimità del tumore.
- Inibizione della mobilitazione delle cellule ad attività pro-angiogenetica verso il tumore.
- Inibizione del cross-talk fra tumore, endotelio e stroma mediato dalla attività autocrina e paracrina di diversi fattori di crescita (VEGF, FGF, PDGF, ecc.).

I meccanismi di resistenza messi in atto dal tumore e dal suo micro-ambiente durante il trattamento con farmaci che hanno come bersaglio VEGF e il suo pathway probabilmente coinvolgono:

- L'attivazione e/o l'up-regolazione di pathway angiogenetici alternativi indipendenti da VEGF.
- Il reclutamento di cellule ad attività pro-angiogenetica.
- L'aumento di periciti peri-endoteliali a consolidare la struttura vascolare ed attenuare la necessità di VEGF per la sopravvivenza delle cellule endoteliali.
- L'attivazione del potenziale metastatico delle cellule tumorali che utilizzando i vasi non tumorali, non coinvolgono il processo di neo-angiogenesi.

Nel lavoro del 2008 di Dellapasqua nei pazienti con tumore al seno metastatici trattati con chemioterapia metronomica e bevacizumab il rischio di recidiva era significativamente aumentato in pazienti che, dopo due mesi di terapia, avevano livelli di VEGF superiori ad un determinato valore soglia. Sebbene questi risultati siano da confermare in una più ampia casistica di pazienti, i livelli di VEGF alti dopo due mesi di trattamento lasciano margine ad un incremento della dose di bevacizumab utilizzato o a pensare a strategie alternative di inibizione di VEGF. Questo risultato rimarca la necessità di avere dei biomarcatori che possano essere utilizzati per meglio indirizzare le scelte terapeutiche.

Risultati interessanti emergono dalla combinazione di più terapie. Proprio perché il tumore può utilizzare pathway alternativi per sopravvivere alla terapia anti-angiogenica, colpire contemporaneamente più bersagli può essere una valida alternativa terapeutica. Questa strategia ha portato alla combinazione di anticorpi monoclonali anti VEGF con inibitori dei recettori ad attività tirosin chinasi di VEGF (VEGFRs), con m-TOR (target di rapamicina nei mammiferi) e EGFRs (recettori per fattore di crescita epidermico).

Ricercare biomarcatori per selezionare i pazienti

Diversi gruppi di lavoro hanno indirizzato la propria attività di ricerca per la definizione e la standardizzazione di marcatori biologici con potenziale predittivo o prognostico nella terapia anti-angiogenica.

I primi tentativi di misurare l'efficacia della terapia anti-angiogenica nei pazienti si basavano sulla misurazione mediante microscopia ottica della densità dei vasi nel tessuto tumorale. Questa tecnica si basa sulla determinazione del rapporto tra

cellule endoteliali e cellule tumorali, ma si è rilevata inadeguata per due principali ragioni: la prima è che si tratta di un metodo non oggettivo ma dipendente dall'esperienza dell'operatore, e la seconda è che il rapporto tra la cellula endoteliale e la cellula tumorale appare significativamente diverso in diverse aree tumorali.

Sono stati inoltre misurati i livelli circolanti di diversi fattori di crescita ad attività pro anti-angiogenica quali VEGF, b-FGF, HGF, IL-8, e seppure in diverse patologie i livelli alla diagnosi di questi fattori di crescita siano talvolta in grado di predire la sopravvivenza, nessuno di questi ha predetto in maniera convincente l'attività anti-angiogenica di un farmaco.

Diversi studi validano l'uso della risonanza magnetica a contrasto dinamico per studiare il microambiente tumorale.

Questa tecnica consente di misurare il flusso ematico, la permeabilità dei vasi e le loro dimensioni, e ripetendo l'indagine in diversi momenti del trattamento anti-angiogenetico, è possibile correlare la risposta clinica con l'attività del farmaco su vasi peritumorali. Seppure questa tecnica sia stata utilizzata in diversi trials, è necessario disporre di apparecchi estremamente sofisticati e limitati ad alcuni centri di ricerca.

Una tecnica in corso di una definitiva validazione si basa sulla quantificazione mediante citometria a flusso delle cellule endoteliali circolanti (CEC), prodotto del turnover endoteliale, e dei progenitori endoteliali circolanti (PEC). Diversi lavori hanno dimostrato come queste cellule siano incrementate e vitali in pazienti affetti da neoplasia e ritornano a valori sovrapponibili a quelli osservati nei soggetti sani dopo rimozione chirurgica del tumore o trattamento chemioterapico. In modelli preclinici, la quantificazione di queste cellule ha permesso di osservare che la cinetica di crescita di queste cellule è parallela alla crescita tumorale, e che la somministrazione di farmaci ad attività anti-angiogenetica si associa a variazioni nel numero e nella vitalità sia delle CEC che dei PEC.

La quantificazione di CEC e PEC in una serie di trial clinici di fase II e III ha recentemente confermato il potenziale di queste cellule come marcatore biologico della attività di i farmaci anti-angiogenesi (Dellapasqua, JCO 2008, Calleri, Clin Cancer Res 2009, Roodhart, Neoplasia 2010). Sono attualmente in corso studi multicentrici per definire un protocollo standardizzato per la misurazione di queste cellule sia in studi preclinici che in trial clinici.

Conclusioni

I risultati ottenuti da diversi trial clinici che si basano sulla inattivazione di VEGF e dei pathway di VEGF fino ad ora osservati sono interessanti ma il beneficio clinico appare di breve durata. Per evitare la resistenza al trattamento antiangiogenico e i fenomeni di escape messi in atto dal tumore, sono urgenti nuove strategie. Conoscere i meccanismi di azione dei farmaci anti-angiogenetici, combinare farmaci diretti contro più target, e avere dei biomarcatori per modulare la terapia anti-angiogenica e definire gli schemi di trattamento sono le strade da percorrere per procedere con successo verso una permanente soppressione delle neoangiogenesi e della crescita tumorale.

Bibliografia essenziale

1. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008; 358 (19): 2039-2049.
2. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 2005; 438 (7070): 967-74. Review.
3. Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science.* 2006; 312 (5777): 1171-1175.
4. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8 (8): 592-603.
5. Bertolini F, Mancuso P, Braidotti P, Shaked Y, Kerbel RS. The multiple personality disorder phenotype(s) of circulating endothelial cells in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1796 (1): 27-32. Review.
6. Shaked Y, Voest EE. Bone marrow derived cells in tumor angiogenesis and growth: are they the good, the bad or the evil? *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1796 (1): 1-4.
7. Calleri A, Bono A, Bagnardi V, Quarna J, Mancuso P, Rabascio C, et al. Predictive potential of angiogenic growth factors and circulating endothelial cells in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy plus bevacizumab. *Clin Cancer Res.* 2009; 15 (24): 7652-7657.
8. Mancuso P, Antoniotti P, Quarna J, Calleri A, Rabascio C, Tacchetti C, et al. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin Cancer Res.* 2009; 15 (1): 267-273.
9. Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, et al. Metronomic cyclophosphamide and capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26 (30): 4899-4905.
10. Kummar S, Chen HX, Wright J, Holbeck S, Millin MD, Tomaszewski J, Zweibel J, Collins J, Doroshow JH. Utilizing targeted cancer therapeutic agents in combination: novel approaches and urgent requirements. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9 (11): 843-856.

