



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
“TOR VERGATA”**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE
XIX CICLO**

Tesi

**Impatto dell'inattivazione delle cellule T
regolatorie CD4⁺/CD25⁺ in protocolli di
vaccinazione genetica in modelli murini tolleranti.**

Leonardo Elia

Relatore *Prof. Gennaro Ciliberto*

Correlatore *Dr. Fabio Palombo*

Coordinatore *Prof. Alessandro Finazzi-Agrò*

ABSTRACT

La vaccinazione anti-cancro è un promettente approccio nel trattamento di tumori primari e nella prevenzione da recidive, attraverso l'induzione di una risposta immunitaria contro antigeni tumori associati (TAA). Uno dei maggiori ostacoli al successo della terapia è la tolleranza immunologica contro gli antigeni self, la quale limita l'effettiva risposta immunitaria anti-tumorale.

Una transiente riduzione della tolleranza immunologica potrebbe attivare una più efficiente vaccinazione contro un antigene self, per cui noi abbiamo esplorato questa ipotesi in un modello murico tollerante per CEA, utilizzando un adenovirus esprimente CEA come vaccino in associazione con l'inattivazione delle cellule T regolatorie CD4⁺CD25⁺.

Questa modalità di vaccinazione è risultata capace di incrementare la risposta CEA-specifica CD8⁺, CD4⁺ e anticorpale. La comparsa di una risposta CD4⁺ correla con una forte risposta memoria. La combinazione dell'inattivazione delle cellule CD25⁺ con una vaccinazione genetica è risultata indurre una significativa protezione tumorale in un modello metastatico. Inoltre, l'utilizzo di una metodica non invasiva per l'osservazione della crescita tumorale, ha dimostrato che non solamente veniva eliminato il tumore primario, ma anche le metastasi epatiche.

I nostri risultati supportano l'ipotesi della possibilità di utilizzare questo tipo di vaccinazione anti-tumorale come un adiuvante nel trattamento preventivo contro la comparsa di recidive in pazienti.

Cancer vaccines are a promising approach to treating tumors or preventing tumor relapse through induction of an immune response against tumor associated antigens (TAA). One major obstacle to successful therapy is the immunological tolerance against self antigens which limits an effective anti tumor immune response.

As a transient reduction of immunological tolerance may enable more effective vaccination against self tumor antigens, we explored this hypothesis in a CEA tolerant animal model with an adenovirus expressing CEA vaccine in conjunction with inactivation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

This vaccination modality resulted in increased CEA-specific CD8⁺, CD4⁺ T cells and antibody response. The appearance of a CD4⁺ T cell response correlated with a stronger memory response. The combined CD25⁺

inactivation and genetic vaccination resulted in significant tumor protection in a metastatic tumor model. Non-invasive tumor visualization showed that not only primary tumors were reduced, but also hepatic metastases.

Our results support the viability of this cancer vaccine strategy as an adjuvant treatment to prevent tumor relapse in cancer patients

ABSTRACT	2
INTRODUZIONE	5
<i>Antigeni Tumore Associati</i>	5
<i>Terapia genica</i>	9
<i>Cellule T Regolatorie (T_R)</i>	14
SCOPO DEL LAVORO	20
MATERIALI E METODI	22
RISULTATI	28
<i>Costruzione del vettore adenovirale ricombinante esprimente hCEA</i>	28
<i>Preparazione ed efficienza del anticorpo monoclonale AntiCD25 (PC61)</i>	29
<i>Protocollo di vaccinazione</i>	31
<i>La inattivazione T_R incrementa la risposta cellulo-mediata</i>	31
<i>Incremento risposta CD8 anti Ep-CAM in topi CD1 q/q</i>	35
<i>Identificazione peptidi responsivi</i>	36
<i>Incremento della risposta umorale</i>	36
<i>Cinetica della risposta cellulo-mediata CD8 e analisi della memoria immunologica</i>	38
<i>Il miglioramento della risposta immune di riflesso induce una marcata protezione tumorale</i>	40
<i>Meccanismi di protezione tumorale:</i>	
1) <i>deplezione T; 2) trasferimento serio</i>	42
<i>Protezione antitumorale contro Survivin</i>	45
DISCUSSIONE	46
BIBLIOGRAFIA	50
CURRICULUM VITAE LEONARDO ELIA	56
LISTA PUBBLICAZIONI/COMUNICAZIONI LEONARDO ELIA	58

1. Introduzione

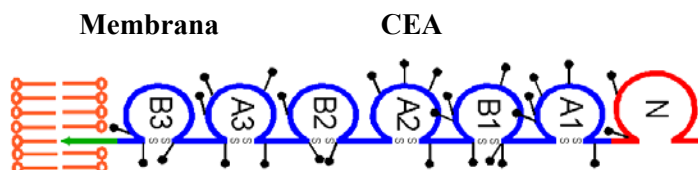
1.1.1 Antigeni associati a Tumori (TAA).

Gli antigeni tumorali riconosciuti dai linfociti T rappresentano il principale bersaglio dell'immunità protettiva negli animali da esperimento, e probabilmente anche nell'uomo. L'identificazione di questi antigeni si è basata su modelli di trapianto tumorale nell'animale, sullo sviluppo di linee e cloni CTL umani e murini, sul clonaggio di librerie cDNA, e sull'eluizione ed il sequenziamento di peptidi dalle molecole MHC delle cellule tumorali. Le molecole MHC presentano i peptidi derivanti da proteine cellulari perchè i linfociti T svolgano il loro compito di sorveglianza; in particolare le molecole MHC di classe I espongono peptidi derivanti da molecole citosoliche in tutte le cellule nucleate. Questa regola si applica anche alle cellule tumorali; pertanto, se una cellula tumorale produce una proteina non espressa da una cellula normale o che rappresenta una versione mutata di una proteina normale, i peptidi derivanti da tale proteina possono essere presentati da molecole MHC di classe I sulla superficie della cellula tumorale, e riconosciuti come estranei dai linfociti T CD8⁺ dell'ospite. Le cellule tumorali funzionano quindi come cellule presentanti (APC). Questi antigeni possono essere codificati dal genoma della cellula tumorale stessa o dal genoma di virus presenti nella cellula. È anche possibile che proteine rilasciate negli spazi extra-cellulari da cellule tumorali vive o morenti (o addirittura cellule tumorali intere) possano essere endocitate da APC professionali, ed avviate alla via di presentazione dell'antigene in classe II; i peptidi classe II-associati derivanti da queste cellule tumorali possono quindi essere presentati per il riconoscimento da parte dei linfociti T helper CD4⁺. Non è quindi sorprendente che gli antigeni tumorali riconosciuti dai linfociti T comprendano un'ampia gamma di proteine cellulari e virali.

1.1.2 Antigene del Carcinoma-Embrionario (CEA).

I membri della famiglia dei geni antigene carcino-embrionico (CEA) sono membri della super-famiglia delle immunoglobuline e possono essere divisi in due sottogruppi maggiori in base alla loro sequenza. Nell'uomo sono localizzati in un cluster, sul braccio lungo del cromosoma 19, che consiste in circa 20 geni. Il sotto gruppo dei geni CEA-CAM codificano per

CEA e gli antigeni cross-reattivi che sono maggiormente proteine di membrana mentre l'altro sottogruppo codifica per il gruppo di proteine denominate glico-proteine specifiche della gestazione (PSG). CEA è una glicoproteina di membrana di 200 kDa con funzioni di omo-adesione intercellulare. Il livello di espressione è molto elevato durante la vita intra-uterina del feto e poi si abbassa drasticamente nell'epitelio della mucosa del colon dell'adulto. CEA è stata una delle prime proteine definita come Antigene Tumorale associato infatti ne è dimostrata una espressione del 95% nei tumori al colon, gastrici, pancreatici e in misura minore nei tumori della mammella, squamosi del collo e in quelli della cervice uterina (Shively and Beatty, 1985; Thompson et al., 1991).



L'idea del possibile utilizzo di questa proteina come Ag per un vaccino terapeutico è stata data dall'evidenza che in pazienti affetti da carcinoma al colon si ritrovano anticorpi contro CEA (Huang and Kaufman, 2002). Questa evidenza a messo in luce che esisteva la possibilità di indurre una risposta contro questo antigene self, e che quindi si poteva riuscire ad oltrepassare la tolleranza immunologica.

1.1.3 Molecola di adesione delle cellule epiteliali (Ep-CAM).

La molecola di adesione delle cellule epiteliali (Ep-CAM) è una glicoproteina transmembrana di 40 kDa, costituita da due domini extracellulari "epidermal growth factor-like", una regione ricca di cisteine, un dominio transmembrana ed una coda citoplasmatica. L'espressione nei tessuti adulti umani è fondamentalmente ristretta alle cellule epiteliali, con poche eccezioni come l'espressione negli epitelii squamosi e negli epatociti (Momburg et al., 1987).

Questo antigene è coinvolto nei processi di adesione intercellulare calcio dipendente e rientra in una classe di molecole di adesione (Balzar et al., 2001). Ulteriori studi hanno dimostrato che Ep-CAM colocalizza con molecole di actina del citoscheletro, e che una mutagenesi del suo dominio

citoplasmatico comporta una perdita della capacità di adesione cellulare (Balzar et al., 1999).

Di particolare interesse è l'over-espressione di Ep-CAM in carcinomi di varia origine, come quelli del colon-retto, prostata, polmone e mammella (Armstrong and Eck, 2003). Recentemente, un'analisi più approfondita è stata condotta utilizzando dei microarray su campioni tumorali, e si è osservato l'overespressione di Ep-CAM in 98 su 131 categorie di tumori (Went et al., 2004).

Diverse ipotesi sono state postulate per spiegare l'espressione di Ep-CAM nei tumori, ma il suo ruolo rimane non chiaro. Inoltre, esperimenti di "RNA interference" hanno evidenziato che questo antigene può svolgere un ruolo in processi di proliferazione e migrazione cellulare in linee cellulari derivanti da tumore alla mammella (Osta et al., 2004).

1.1.4 Survivin.

Survivin è una proteina di circa 100 aa, del peso di 16.5 kDa, ed è uno dei membri più piccoli della famiglia delle proteine di mammifero inibitori dell'apoptosi (IAP); essa ha un singolo dominio di 70 aa, chiamato baculovirus IAP repeat (BIR), e un'estesa α -elica carbossi-terminale (Ambrosini et al., 1997). Una singola copia del gene per survivin può dare tre alternative varianti di splicing. Oltre alla sequenza wild-type, caratterizzata da 3 introni e 4 esoni, sia nell'uomo che nel topo, due altre isoforme sono generate per splicing alternativo, l'inserzione di un alternativo esone 2 da origine a Survivin-2B, mentre la rimozione dell'esone 3 da luogo a Survivin- Δ Ex-3 (Mahotka et al., 1999). Studi cristallografici della proteina umana (Verdecia et al., 2000) e murina (Muchmore et al., 2000) dimostrano che essa è organizzata in un stabile omodimero.

A livello funzionale survivin è implicata, come membro IAP, nella inibizione dell'apoptosi. Essa funge da inibitore endogeno delle caspasi, ad un livello più basso di BCL2. Infatti nell'apoptosi sia intrinseca che estrinseca il ruolo di survivin sarebbe quello di legare le caspasi effettrici ed inibirle. Questo meccanismo è conservato anche in organismi inferiori quali il lievito. In colture cellulari, l'over-espressione di survivin è associato con l'inibizione dei meccanismi di morte cellulare dovuti sia a stimoli esogeni che endogeni (Ambrosini et al., 1997; Tamm et al., 1998).

Anche sebbene l'espressione ed il meccanismo delle altre IAPs non è stato molto studiato, survivin mostra una chiara espressione ciclo cellulare

dipendente a livello mitotico. Essa è largamente controllata a livello trascrizionale, e varie sequenze canoniche CDE/CHR (cell-cycle-dependent element/cell cycle gene homology region) sono localizzate vicine al promotore di survivin (Kobayashi et al., 1999; Li and Altieri, 1999). La poliubiquitinazione di survivin e la sua distruzione proteosoma dipendente è stata dimostrata in interfase (Zhao et al., 2000), mentre la sua fosforilazione mitotica in Thr34 ad opera della ciclina CDC2-B1 è associata con l'incremento della stabilità della portina in metafase (O'Connor et al., 2002).

L'espressione di survivin nei normali tessuti è molto bassa o zero, mentre è stato osservato una forte sua espressione in molteplici tumori, quali polmone (Monzo et al., 1999), mammella (Tanaka et al., 2000), pancreas (Satoh et al., 2001), fegato (Ikeguchi et al., 2002), ecc.

1.2 Terapia Genica.

Lo scopo della terapia genica è quello di introdurre sequenze geniche in cellule appropriate, per alleviare i sintomi o prevenire la comparsa di particolari malattie di origine genetica.

Gli approcci più comuni consistono nel rimpiazzamento genico, nell'aggiunta di geni che possono esprimere delle tossine naturali o nella sensibilizzazione di cellule ad altri trattamenti. Inoltre, trasferendo cellule del midollo osseo con geni per la resistenza multipla ai farmaci, si possono diminuire gli effetti dannosi della chemioterapia ed in fine la "vaccinazione genetica", mediante l'espressione di proteine o frammenti di proteine (epitopi) immunogene di un patogeno che stimolino l'induzione di una risposta immunitaria.

Per la terapia genica sono in uso e studio diversi tipi di approcci:

- Sistemi non virali di trasfezione
- Sistemi virali di trasfezione.
- DNA nudo.

1.2.1 Sistemi non virali.

I sistemi non virali hanno suscitato un grosso interesse per le applicazioni in vivo di "DNA delivery". Questi sistemi includono: liposomi cationici, trasferimento genico recettore-mediato da complessi di DNA-Lisina (Farhood et al., 1994), iniezione diretta di DNA, microincapsulazione

(Chang et al., 1993) e una varietà di sistemi balistici (Ye et al., 1994). Tutti questi sistemi evitano i problemi dell'uso di sistemi virali in vivo. I liposomi cationici hanno fornito il miglior sistema di transfezione genica, non virale, usato in vivo. Questo genere di veicolo è stato largamente impiegato per "DNA delivery" ed espressione genica in vivo, con risultati soddisfacenti a seguito di somministrazione endovenosa, come dimostrato in vari articoli (Chen et al., 1991).

Inoltre, in accordo con gli altri dati, non si sono monitorati effetti tossici in vivo dovuti all'uso di complessi DNA-Lipidi. Vi è, poi, la possibilità di direzionare i liposomi nei confronti di determinate cellule, legandovi un

anticorpo monoclonale specifico per un epitopo presente su tali cellule, o delle proteine che poi possano mediare il direzionamento dei liposomi, come la Asialoglicoproteina nel direzionamento verso gli epatociti in quanto questi possiedono un recettore ad alta affinità per tale glicoproteina (Chowdhury et al., 1993). Poi da citare è la tecnica di elettroporazione in vivo che consiste nell'iniettare la molecola di DNA nudo nel muscolo e quindi far seguire una serie di impulsi elettrici. Questa tecnica è estremamente efficiente nella trasduzione del tessuto muscolare, ma di più difficile applicazione per altri tessuti o organi.

1.2.2 Sistemi Virali.

Molti sono i vettori virali sviluppati per la terapia genica, tra questi sono inclusi i vettori generati da retrovirus, come Moloney leucemia murina o il virus HIV o virus come Adenovirus, Adeno-associati, Herpes Simplex, Epstein Bar Virus, Sindbis virus, ed altri ancora, ognuno dei quali ha un tropismo tissutale specifico.

I retrovirus nel loro genoma, formato da RNA a singolo filamento (ssRNA) in doppia copia, codificano le proteine gag, pol e env:

gag: è richiesta per la formazione del core del retrovirus ed è importante nel processo di incapsulazione del materiale genetico.

Pol: è la sequenza nucleotidica che codifica per la Trascrittasi inversa che è l'enzima che converte l'ssRNA, del virus, in doppio filamento di DNA che poi, a mezzo di una integrasi espressa dal virus, verrà integrato in un cromosoma della cellula infettata.

Env: codifica per la glicoproteina dell'envelope virale che è richiesta per l'aggancio del virione alla cellula da infettare.

Le LTR (long terminal repeats), che fiancheggiano il genoma, sono le

sequenze responsabili dell'incapsulamento del materiale genetico nel capsid e dell'inserzione del materiale genetico retrotrascritto nel genoma della cellula infettata:



Schematizzazione delle parti fondamentali del genoma di un retrovirus

Vettori ricombinanti retrovirali consistono in retrovirus difettivi che contengono la molecola di cDNA d'interesse, interposta fra le due sequenze LTR.

Per ottenere dei vettori con capacità di transfezione, il genoma così ottenuto viene transfettato in cellule "packaging" che costitutivamente producono le proteine gag, pol ed env, quindi, alla fine, si ottengono dei virus che contengono il genoma modificato in grado di infettare le cellule.

Gli Adenovirus sono virus a dsDNA che, dopo l'infezione, rimangono nella cellula in forma episomale, lineare. I vettori Adeno sono deleti di una o più proteine necessarie alla replicazione (E1,E2) del virus. Per ottenere il vettore si costruisce un plasmide che porta tutto il genoma di Adeno delecto dei geni delle proteine E1 e E2, addizionato della cassetta di espressione desiderata, le cui dimensioni non debbono superare quelle dei geni deletati. Il genoma ricombinante quindi viene transfettato in linee cellulari definite "packaging" che esprimono in TRANS le proteine deletate dal genoma del virus.

Questo genere di vettori sono estremamente efficienti non solo nella transfezione di una grande varietà di cellule, ma anche nella espressione della proteina.

A queste eccezionali capacità si contrappone però il rischio dell'utilizzo di tali vettori in quanto essi provengono da genomi virali, che potrebbero in qualche maniera revertire a un virione non defettivo quindi capace d'infettare l'organismo. Nei vettori virali poi rientrano molti altri generi di vettori costituiti a partire da altre specie di virus come quello dell' Herpes per il target di cellule nervose, quelli derivati dal virus Vaccino. In fine di rilievo è lo studio della ricerca di nuovi vettori virali a partire da virus con specificità diverse per il target di tessuti specifici o che provengano da specie filogeneticamente molto distanti come quelli degli artropodi.

1.2.3 Geni Suicidi.

E' una tecnica che consiste nel veicolare, all'interno delle cellule, un gene suicida come, ad esempio, il gene per la timidinochinasi dell'herpes simplex (TK-HSV). Il ganciclovir è un antivirale noto per la sua azione specifica nei confronti della TK-HSV, che lo trasforma in una molecola utilizzata come un nucleotide che, però, una volta incluso nella sintesi del DNA, la blocca, causando la morte della cellula. Quindi, ad esempio, introducendo in una cellula tumorale il gene per la TK-HSV e successivamente sottoponendola ad un trattamento con ganciclovir, la si conduce ad una morte mirata (Culver et al., 1992). Altri geni virali possono essere utilizzati con lo stesso intento, come la Citosina deaminasi che converte la 5-fluoro-citosina non tossica in 5-fluorouracile che, con un meccanismo analogo all'altro, porta alla morte cellulare.

1.2.4 Attivazione-Disattivazione Genica.

L'attivazione-disattivazione genica, consiste nell'inserire nelle cellule d'interesse un gene sotto il controllo di un promotore inducibile che, quindi, potrà essere attivato o disattivato a seconda delle necessità.

Tale sistema può essere utilizzato, ad esempio nella terapia di alcuni tumori. Il TNF, se espresso ad alti livelli, è tossico, ma se si introduce tale gene in cellule tumorali sotto il controllo di un promotore inducibile, come *erg-1* che viene attivato dalle radiazioni durante i cicli di radioterapia, il promotore si attiverà e il gene per il TNF verrà espresso ad alti livelli nelle cellule tumorali con un miglioramento degli effetti della radioterapia.

1.2.5 Oligonucleotidi Antisenso.

Gli antisenso sono degli oligonucleotidi in grado di legare per complementarità un determinato mRNA e di conseguenza bloccare la traduzione. Per ottenere una sufficiente specificità di azione si richiede che l'oligo debba essere composto da un minimo di 15 nucleotidi, ma, normalmente, si usano da 20 a 30 nucleotidi. Nelle terapie con gli antisenso due sono i problemi maggiori: la stabilità degli oligonucleotidi e l'efficacia di penetrazione.

Il primo problema è stato risolto modificando chimicamente il legame

fosforodiesterico del “backbone” che lega i deossiribonucleotidi con diversi derivati, come fosforotioati, metilfosfonati, i fosforoamidi ed altri ancora. Queste sostituzioni incrementano il tempo di emivita degli oligo, da alcuni minuti ad ore e anche giorni, ma, purtroppo, diminuiscono la loro capacità e specificità di azione e, pur aumentando la resistenza, lasciano inalterate le capacità di penetrazione.

1.2.6 Ripristino della funzionalità genica.

Questo genere di terapia consiste nell'individuare la proteina che causa la malattia, quindi risalire al gene della proteina mutata e a quello “wild type”. Il gene “wild type” viene clonato in un vettore di espressione, il quale potrà essere un sistema transiente come un plasmide, che permette l'espressione della proteina per un periodo di tempo breve. Alternativamente può essere clonato in un vettore di espressione stabile che possa inserirsi all'interno del genoma della cellula, come quello dei retrovirus, o che possa rimanere in forma episomale stabile, come nel caso degli Adenovirus. Tale sistema darà origine alla espressione cellulare della proteina “wild type” stabilmente, in modo che possa svolgere le proprie attività in maniera funzionale rimpiazzando la mutata. Anche in questo caso però si deve tenere in conto della possibilità di “linkage”, cioè di una bassissima espressione dei geni virali sufficiente però a montare una risposta immunitaria che dopo tempi variabilmente lunghi potrebbe portare all'uccisione di tutte le cellule esprimenti il transgene.

Tra i vari campi di applicazione di questo genere di terapia genica si ricordano: la distrofia muscolare di Duchenne (DMD) (Crystal et al., 1995) causata da una mutazione al livello del gene che codifica per la distrofina, la fibrosi cistica che è causata da una serie di mutazioni che alterano la funzione della proteina CFTR (cistic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Acsadi et al., 1991) e l'ipercolesterolemia familiare, determinata da un difetto nei geni del recettore per le lipoproteine a bassa densità (LDL-R) (Quantin et al., 1992).

La terapia per la DMD costituisce un esempio del tipo di studio che si esegue e delle difficoltà che devono essere affrontate per disegnare e realizzare una terapia genica.

1.2.7 Vaccinazione genetica.

Una nuova applicazione che rientra all'interno della terapia genica e quella della vaccinazione genetica mediante l'uso di vettori di diverso genere, che portano al loro interno una cassetta di espressione per un'antigene o anche solo per un epitopo. L'evoluzione delle tecnologie ricombinanti ha fatto sì che la costruzione di vettori di origine sia virale che non divenisse di facile attuabilità e la possibilità che l'utilizzo del materiale genetico non necessiti dell'uso di organismi per l'immunizzazione, ha dato un grosso impulso a questo ramo della terapia genica. L'immunizzazione genetica è utilizzata per antigeni di ogni genere:

- Batterici
- Virali
- Autoantigeni
- Antigeni associati a Tumori (TAA)

I risultati di tale tecnica sono estremamente incoraggianti, fermo restando che molti sono i problemi da risolvere. Primo tra essi e la bassa espressione dell'antigene che spesso corrisponde a una bassa immunogenicità, per cui la necessità di riuscire a trasdurre maggiormente le cellule che presentano l'antigene (APC). La loro bassa immunogenicità è dovuta oltre che alle caratteristiche proprie di tali antigeni anche alla condizione, che essendo questi originati dello stesso organismo da immunizzare ci si ritrova davanti al fenomeno, di tolleranza. La tolleranza è il meccanismo di selezione naturale intratimica che permette la delezione delle cellule della risposta immunitaria autoreattive in grado di riconoscere proteine proprie dell'organismo, che se non deletate porterebbero a fenomeni di autoimmunità.

1.3.1 Cellule T Regolatorie (T_R).

L'utilizzo di vaccini genetici in trattamenti antitumorali è un nuovo e promettente approccio che attualmente viene investigato in protocolli clinici. Recenti evidenze suggeriscono che l'efficacia di tali trattamenti sia correlata con una robusta risposta linfocitaria. La risposta immune è però strettamente regolata e bilanciata da sofisticati meccanismi di stimolazione e soppressione. Per cui alterazioni degli stessi potrebbe portare a una gran

varietà di malattie autoimmunitarie. Recentemente una sottopopolazione di cellule linfocitarie CD4, con fenotipo CD4⁺/CD25⁺, chiamate comunemente cellule T regolatori (T_R), è stata riconosciuta avere un ruolo centrale e prominente nel mantenimento del bilancio immunologico.

Questo tipo cellulare esprime il marker CD25 (catena α del recettore per IL2) ed esso rappresenta circa il 5-10 % delle cellule CD4⁺ totali. Le T_R vennero identificate per la prima volta in topi, ma attualmente una popolazione analoga è stata osservata anche nell'uomo.

Una delle funzioni del timo è quella di produrre la maggior parte delle cellule regolatorie funzionali, le quali sembrano costituire una linea cellulare distinta ma contigua con quella identificata in periferia, infatti si ipotizza che cellule CD4⁺/CD25⁻ periferiche, di natura non regolatoria possano passare ad un fenotipo regolatorio in seguito ad attivazione genica dovuta alla mancanza di una stimolazione antigenica prolungata (Curotto de Lafaille et al., 2004; Fehervari and Sakaguchi, 2004). Molte evidenze indicano che in questo organo le cellule regolatorie richiedono unicamente l'interazione del loro TCR con il complesso peptide self/MHC espresso dalle cellule dello stroma timico. In ogni caso, comparata con quella classica per le altre cellule T, lo sviluppo delle T_R richiede un'interazione con forte avidità del loro TCR col complesso peptide/MHC espresso dallo stroma, ma non tale da indurne la loro delezione (**figura 1**). Molecole accessorie, come CD28, B7 e CD40, espresse nello sviluppo dei timociti e dalle cellule dello stroma timico contribuiscono alla generazione delle T_R.

Le cellule T_R esprimono costitutamente varie molecole di membrana più comunemente associate con cellule attivate o della memoria, le più significative sono altre CD25, CD45RB^{low}, CD62L, CD103, CTLA-4, e GITR. Anche sebbene nessuno di questi molecole è unicamente espresso nelle normali T_R, il loro livello di espressione e la loro natura costitutiva ha permesso l'isolamento e l'indagine di questa sottopopolazione regolatoria.

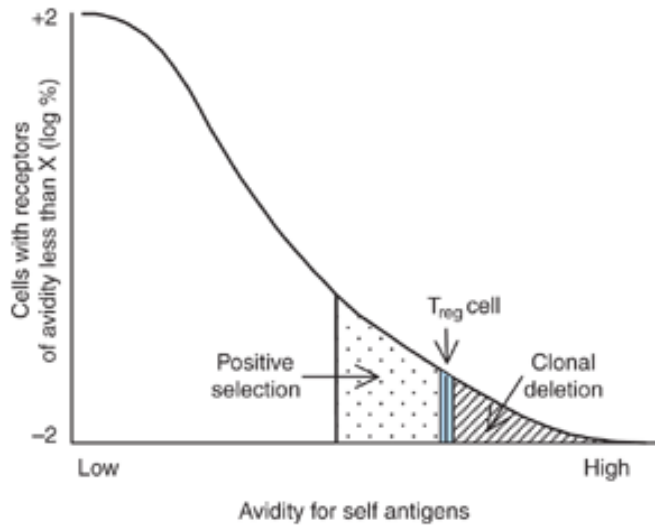


Figura 1. Schematizzazione della selezione timica (Schwartz, 2005)

1.3.2 Controllo Genetico T_R .

Dal punto di vista genetico è stato individuato da poco un gene controllo importantissimo per lo sviluppo delle T_R , questo è un fattore trascrizionale chiamato FOXP3 (**figura 2**). In vari esperimenti in cui venivano utilizzati animali che presentavano mutazioni di questo gene si sono osservate dei fenotipi analoghi a quelli indotti da mancanza di T_R e ciò ha indotto a pensare all'esistenza di una correlazione tra queste due condizioni. Quello che è stato poi osservato è la presenza unica di questo fattore trascrizionale solo in cellule $CD4^+/CD25^+$, inoltre molto recentemente esso è stato osservato presente anche in una piccola popolazione $CD4^+/CD25^-$, ma anche essa con funzione regolatoria. FOXP3 fa parte di una ampia famiglia di diversi fattori di trascrizione caratterizzati da un dominio di legame al DNA di tipo "helix-forkhead". Questa proteine sono state classificate in varie sottofamiglie basandosi su un'analisi filogenetica di omologia sul solo domo "forkhead". FOXP3 contiene inoltre un dominio "zinc-finger" ed uno "leucine-zipper". L'omologia tra il gene umano, quello di topo e di ratto è veramente alta, e ciò suggerisce un'elevata conservatività funzionale. Attualmente si conosce pochissimo sull'attività a livello molecolare di FOXP3. Essa lega il DNA, localizzandosi nel nucleo e potrebbe agire da

repressore trascrizionale. L'identificazione di domini consenso "forkhead binding" adiacenti al sito di legame del fattore trascrizionale NFAT nel promotore di diversi geni codificanti per citochine, come IL-2, IL-4 e TNF, induce a proporre un modello di inibizione o repressione trascrizionale mediata da FOXP3, per cui esso antagonizzerebbe la funzione del Fattore di Trascrizione Nucleare Attivante le Cellule T (NFAT) con la competizione per il motivo di legame al DNA. Basandosi su vari studi è stato anche proposto che FOXP3 sia indotto in una varietà di tipi cellulari col meccanismo generale di una regolazione immunitaria negativa dovuta alla repressione della produzione di citochine infiammatorie (Sakaguchi, 2005). Comunque si è ancora lontani dalla definizione precisa del ruolo molecolare di FOXP3.

1.3.3 Meccanismi di Inibizione T_R .

I meccanismi di inibizione dovuti alle T_R non sono ancora chiarissimi, le ipotesi accreditate sono due e l'una non esclude l'altra:

- utilizzo di fattori solubili
- contatto cellulare.

Vari esperimenti *in vivo* hanno dimostrato l'importanza di fattori solubili come IL-10 e TGF- β (Asseman et al., 1999; Huber et al., 2004). Inoltre è anche possibile che le T_R esprimano TGF- β legato sulla membrana, ed è stato dimostrato che queste cellule virtualmente TGF- β^+ CD4 $^+$ CD25 $^+$, esprimono anche la trombospondina, un fattore capace di convertire TGF- β nella sua forma attiva. Purtroppo i vari studi *in vitro* invece non confermano questa ipotesi, e ciò ha portato a pensare all'ipotesi dell'inibizione per contatto diretto. Il modello più semplice proposto è stato quello di una competizione diretta con le cellule presentanti (APC) e nello specifico col complesso MCH/peptide. In aggiunta, l'espressione costitutiva del recettore ad alta affinità per l'IL-2 potrebbe fare delle T_R dei dispersori di IL-2, privando le cellule T autoreattive del loro naturale fattore di crescita (de la Rosa et al., 2004). Comunque vista la scarsità numerica delle T_R il modello della semplice inibizione-assorbimento potrebbe non essere sufficiente per indurre attività inibitoria *in vivo*. Altri modelli sono stati proposti, tra cui quello del utilizzo di specifiche molecole inibitorie di membrana. L'identità di specifiche molecole inibitorie non è certa, ma sicuramente un candidato che potrebbe avere questo ruolo, espresso dai T_R , è CTLA-4 (Grohmann et

al., 2002). Questa molecola ha un'elevata affinità per le molecole costimolatorie B7.1 e B7.2 (CD80 e CD86 rispettivamente), ed è stato recentemente dimostrato che CTLA-4 innesca l'induzione dell'enzima indolamina 2,3-diossigenasi (IDO), quando c'è l'interazione coi suoi ligandi espressi dalle cellule dendriche (DC) (Collins et al., 2002). IDO catalizza la conversione del triptofano in cheniurenina e altri metaboliti, i quali hanno un potente potere immunosoppressivo nel locale contorno delle DCs. In questo modo i T_R potrebbero avere un effetto soppressivo indiretto sfruttando le DC stesse. Ulteriormente le T_R possono avere attività inibitoria riducendo la capacità delle APC di presentare, infatti è stato dimostrato che cellule $CD4^+CD25^+$ purificate down regolano l'espressione sulle DC di CD80 e CD86, rendendole APC inefficienti.

Le T_R potrebbero però anche inibire le cellule autoreattive per contatto diretto con esse stesse, sfruttando l'interazione CTLA-4/B7, quest'ultimo espresso sulle normali cellule T (**figura 3**).

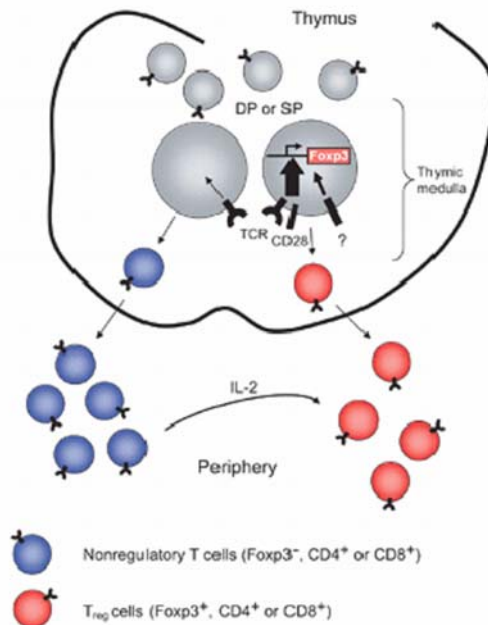


Figura 2. Ipotesi generazione cellule T_R .

L'interazione ad alta avidità del TCR linfocitario col complesso MHC/peptide self, magari aumentata dal segnale di CD28 o altre molecole sconosciute, indurrebbe l'attivazione del fattore trascrizionale FOXP3, e quindi alla generazione della linea di cellule T_R . Poi in periferia IL-2 prodotta dalle cellule T non regolatorie indurrebbe la proliferazione delle T_R ma non la generazione (Fontenot and Rudensky, 2005).

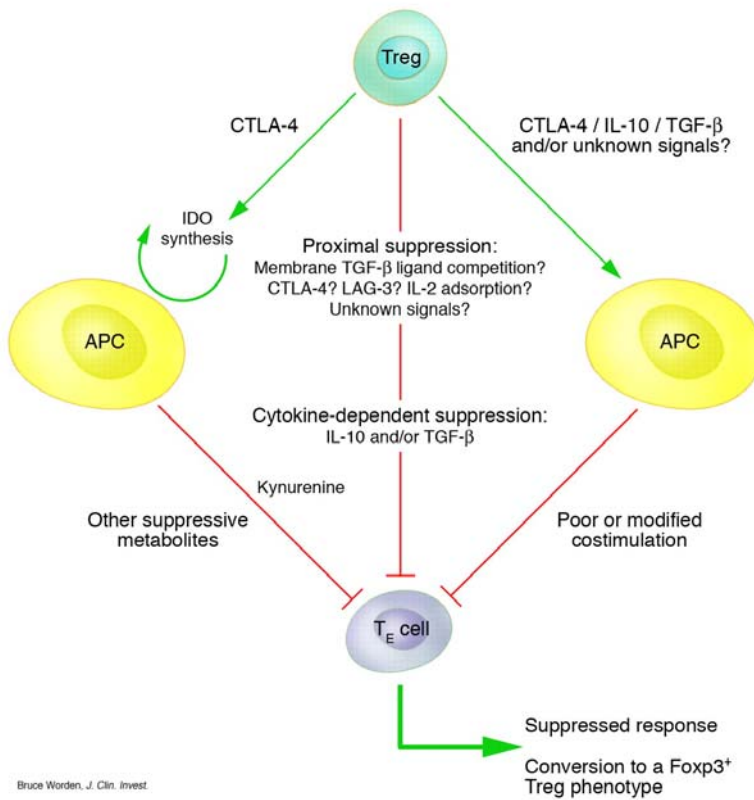


Figura 3. Diagramma riassuntivo sulle ipotesi di inibizione delle T_R (Fehervari and Sakaguchi, 2004)

Scopo del Lavoro

CEA è uno dei TAA meglio conosciuti e caratterizzati, già utilizzato in molti studi pre-clinici e clinici per indurre una risposta autoimmunitaria contro un TAA. Le caratteristiche di espressione di tale proteina over-espressa in molti tumori, primo fra tutti quello del colon retto, e solo molto poco espressa nella mucosa del colon dell'adulto induce a pensare alla possibilità di indurre una risposta immune contro una proteina self che però non crei problemi all'intero organismo. L'evidenza di anticorpi anti-CEA e di cellule T in grado di rispondere contro CEA in pazienti affetti da carcinoma del colon fa presupporre ad una possibilità di oltrepassare la tolleranza e quindi alla possibilità di indurre una risposta efficace in grado di eradicare o mantenere sottocontrollo l'evoluzione dei tumori esprimenti CEA. Ovviamente il problema di utilizzare tale sistema è quello di innescare una risposta immunitaria contro un antigene self. A questo riguardo allora è stata utilizzata una strategia tale da bloccare in modo transitorio il sistema regolatorio di controllo, così da poter indurre una risposta immunitaria forte ed efficiente contro CEA, che permettesse anche una forte protezione antitumorale nello stesso sistema murino.

Il mio lavoro di tesi di dottorato è stato quello di generare vari adenovirus esprimenti l'antigene del carcinoma embrionario umano (hCEA) usati per vaccinare topi transgenici per CEA, tolleranti allo stesso antigene. Il protocollo di vaccinazione prevede una doppia iniezione di adenovirus preceduta da un'iniezione di un anticorpo prodotto in ratto contro il recettore CD25 (IL2 α chain), tale da bloccare la risposta la popolazione T_R . La risposta immunitaria indotta dalla vaccinazione è stata misurata *ex vivo* sia mediante una analisi al citofluorimetro, per valutare la produzione di Interferone- γ da parte delle cellule T CD8 e CD4 (risposta cellulo mediata) che con un saggio ELISA, per la determinazione della risposta anticorpale (risposta umorale). Negli animali iniettati con Ab AntiCD25 ho osservato un incremento significativo della risposta cellulo mediata (CD8 e CD4) e di quella anticorpale ($p < 0.05$). La risposta CD8 è stata monitorata costantemente per valutarne la persistenza. Si è osservato un incremento del segnale nel tempo negli animali che avevano subito la deplezione/inattivazione prima della vaccinazione. Inoltre ho dimostrato che l'incremento della risposta immunitaria utilizzando la deplezione/inattivazione delle cellule regolatorie non è ristretta solo a CEA, ma anche ad altri antigeni. Per dimostrare ciò ho utilizzato lo stesso protocollo di vaccinazione in un sottogruppo di topi outbred CD1 (MHC

q/q), i quali sono responsivi per la vaccinazione contro mEp-CAM. Questo genotipo di animali è stato identificato in un nostro lavoro precedente, nel quale abbiamo dimostrato l'importanza del background genetico nella responsività immunologica. Nel contesto T_R quello che abbiamo osservato è che l'iniezione di un adenovirus esprimente mouse Ep-CAM se preceduta dalla deplezione/inattivazione delle T_R , induce un notevole incremento della risposta CD8, statisticamente significativa.

L'incremento osservato nei topi CEA è associato ad un aumento del numero di cellule memoria CEA specifiche. Con questo protocollo la crescita tumorale osservata negli animali trattati è decisamente ridotta, in modo statisticamente significativo. Da esperimenti di monitoraggio della crescita tumorale *in vivo* (cellule tumorali esprimenti luciferasi), ho osservato oltre alla regressione della crescita del tumore primario, anche l'eliminazione delle recidive (utilizzato modalità di "tumor challenge" metastatizzante). Inoltre sono stati effettuati anche esperimenti di deplezione delle popolazioni linfocitarie CD8 e CD4, e di trasferimento di siero da animali immunizzati, e ciò ha indicato che l'aspetto fondamentale per la regressione tumorale è una forte risposta CD8.

Tutto ciò indica che l'incremento della risposta cellulo mediata e anticorpale è importante per l'attivazione di una funzionale popolazione CD8, fondamentale nella prevenzione della crescita tumorale nel modello utilizzato.

2. Materiali e Metodi

2.1 Costruzione dei Virus ricombinanti.

Il gene CEA utilizzato è un sequenza sintetica ottimizzata per l'espressione dell'antigene stesso. Il plasmide pCR-CEAopt è stato digerito con EcoRI e l'inserito di 2156 paia di basi (bp) dopo purificazione da gel purificato è stato clonato nel plasmide polyMRK-Ad5 shuttle (intermedio per la costruzione di adenovirus). Il plasmide così ottenuto è stato poi digerito PacI/StuI, così da isolare la cassetta di espressione di CEAopt, fiancheggiata dalle regioni E1 di Ad5. A questo punto è stata effettuata una ricombinazione omologa tra il frammento isolato da pMRK e il plasmide per Ad5 linearizzato ClaI, sfruttando le zone di omologia E1, il tutto in cellule BJ5183 *E. Coli*.

Il plasmide ottenuto è stato poi linerizzato PacI, così da rilasciare le ITRs di adeno e trasfettato con Lipofectamina (Invitrogen) in cellule murine PerC-6, quindi l'amplificazione è stata ottenuta con passaggi successivi di infezione in PerC6. Allo stesso modo sono stati ottenuti gli adenovirus Ad6-CEA e Ad5-mSurvivin.

2.2 Amplificazione dei virus e purificazione.

Le Perc6 sono state tenute in cultura a 37°C, 5% CO₂. Il terreno utilizzato è stato Dulbecco Modified Eagle's medium addizionato del 10% di siero bovino, 2mM L-Glutamina, 100 U penicillina G per ml e 100 U streptomycina per ml, 2mM Hepes buffer. La purificazione dei virus è stata effettuata, dopo che l'effetto citopatico aveva raggiunto circa il 70%, con una prima centrifugata a 1500 rpm per concentrare le cellule. Il pellet ottenuto è stato risospeso in una soluzione composta da Tris 10 mM, NaCl 135 mM e MgCl₂ 1mM. Dopo sono stati effettuati tre passaggi di congelamento e scongelamento per rompere le membrane cellulari e il tutto centrifugato per 20 minuti a 5500 rpm. Al surnatante poi viene aggiunta benzonasi (10 U/ml) e incubato per 30 minuti a RT; poi si effettua una centrifugata per 10' a 5500 rpm, a 4°C. Il surnatante viene caricato su un gradiente a strati di Cesio (densità: 1.25-1.35-1.5), ed isolata la banda di interesse (tra 1.25 e 1.35), ricaricata poi su un gradiente unico a 1.35 di densità per un'ulteriore purificazione finale. Il virus ottenuto viene quantificato calcolando la

quantità di DNA estratta dalla preparazione, esso infatti viene diluito 1:10 in 0.1% di SDS in PBS, vortexato e centrifugato a 14000 rpm. Il surnatante viene così letto allo spettrofotometro a 260 nm. Per determinare il numero di particelle fisiche ottenute si utilizza la seguente formula:

$$\text{Particelle per ml} = (\text{OD}_{260})(\text{fattore di diluizione})(1.1 \times 10^{12})$$

2.3 Rivelazione dell'espressione di CEA.

L'efficienza del costrutto adenovirale è stata effettuata infettando cellule HeLa, le quali sono state mantenute in Dulbecco Modified Eagle's medium addizionato del 10% di siero bovino (inattivato a 56°C per 30 minuti), 2mM L-Glutammina, 100 U penicillina G per ml e 100 U streptomina per ml. Quaranta ore dopo le cellule sono state lisate in un buffer di lisi (50mM tris-HCL, pH 6.8, 0.1 dithiothreitol, 2% sodio dodecil solfato e 10% glicerolo) e l'estratto proteico è stato separato con una corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide al 7.5% che quindi è stato trasferito su un filtro di nitro-cellulosa ed utilizzato per un saggio Wester Blot utilizzando anticorpi specifici CEA.

2.4 Colture cellulari.

Le cellule MC38-CEA (Clarke et al., 1998) sono state cresciute in DMEM 10%FBS, con l'aggiunta di Penicillina e Streptomina (10.000 unità di penicillina e 1 0mg Streptomina/ml), Glutammina (2mM) e Zeocina (400 µg/ml). Le cellule A20 (ATCC, Manassas, VA) e l'ibridoma PC61 (ATCC, Manassas, VA) in DMEM 10%FBS.

2.5 Monitoraggio crescita tumorale *in vivo*.

Per sviluppare un saggio non invasivo di analisi della crescita tumorale *in vivo*, le cellule MC38-CEA sono state trasfettate con un plasmide esprimente la luciferasi e vari cloni stabili sono stati selezionati. Una linea cellulare, chiamata MC38-CEA-Luc è stata selezionata *in vitro* in base alla forte espressione della luciferasi. La crescita tumorale di questa linea è stata paragonata con quella della linea parentale mediante esperimenti di "tumor challenge" sottocutaneo. La misurazione delle dimensioni dei due tumori ha

indicato che le due linee crescevano in modo simile. Dopo la validazione di questa nuova linea si è proceduto all'utilizzo di essa in procedure di "tumore challenge" intrasplenico, così da poterne seguire la crescita in vivo sia nell'organo primario che negli organi secondari come il fegato. La crescita è stata poi seguita col sistema Xenogen Ivis200.

2.6 Animali: stabulazione e trattamenti

Gli animali utilizzati in questo studio sono stati stabulati secondo le regole di stabulazione del comitato etico dell'Istituto Ricerca Biologia Molecolare (IRBM). Sono stati usati maschi di otto settimane del ceppo C57Bl/6 transgenici per CEA (J. Primus, Vanderbilt University (Clarke et al., 1998))(CEA.Tg). Gruppi di 10-15 animali sono stati iniettati con dosi di 10^9 particelle fisiche di virus ricombinanti. Con regime di somministrazione a giorno 0 e giorno 15. La via di somministrazione utilizzata è stata quella intramuscolo. Due settimane dopo la seconda iniezione gli animali sono stati sacrificati e le milze espianate per preparare gli splenociti usati per i saggi successivamente riportati.

2.7 Deplezione/Inattivazione cellule T e trasferimento sierico

La deplezione/inattivazione delle cellule regolatorie viene effettuata somministrando un anticorpo AntiCD25 di ratto (PC61) per via intraperitoneale (500 µg) al giorno -4. L'efficienza della inattivazione delle cellule T_R è dimostrata da un'analisi citofluorimetrica da sangue periferico, usando gli mABs: phycoerythrin-conjugated (PE) anti-CD4, peridinin-chlorophyll-protein (PercP) anti-CD8, allophycocyanin-conjugated (APC) anti-CD25 (BD Pharmingen, San Diego, CA); PE anti-mouse/rat FOXP3 Staining Set (eBioscience, San Diego, CA).

La deplezione delle cellule CD4 e CD8 è ottenuta mediante l'iniezione di 200 µg di Ab anti-CD4 (GK1.5 Ibridoma, ATCC) e anti-CD8 (2.43 Ibridoma, ATCC) al giorno -7 dal "tumor challenge" e mantenuta per le tre settimane successive.

Gli studi per il trasferimento di sero sono stati condotti nel seguente modo: 200 µl di siero proveniente da topi trattati con Ab AntiCD25+AdenoCEA sono stati iniettati nel peritoneo di topi non immunizzati al tempo -24, 0 e 120 ore dal "tumor challenge".

2.7 ELISPOT

Questa tecnica è stata adottata per la determinazione del numero degli splenociti che secernono Interferone- γ in risposta allo stimolo antigenico dopo immunizzazione. Questa tecnica non permette però la distinzione della risposta CD4 o CD8, ma fornisce un numero assoluto di cellule che secernono IFN- γ in rapporto alle cellule messe in stimolo.

Due settimane dopo l'ultima immunizzazione gli animali sono stati sacrificati e le milze sono state espantate chirurgicamente e mantenute in R10 (RPMI 1640 addizionato del 10% di Siero bovino inattivato al calore, 100U di penicillina, 100U di streptomina e 0.01M HEPES). Le milze si disgregano meccanicamente mediante grattugiamiento su grate di metallo. Quindi per eliminare gli eritrociti si procede con una lisi osmotica. Gli splenociti così ottenuti vengono contati, in colorante vitale, e depositati in doppio nel numero di 250000 o 500000 per pozzetto su piastre 96 pozzetti multi screen (Millipore Bredford) precedentemente cotate con un Ab anti IFN- γ (immunoglobulina G1, clone XMG 1.2, Pharmingen) diluito 1 a 400 in PBS e bloccate con 200 μ l di R10 per 2 ore a 37°C. Quindi si aggiungono i peptidi specifici dell'antigene; come controllo invece si usa la stessa quantità di DMSO in cui sono stati sciolti i peptidi. 24 ore dopo si lava per tre volte con PBS + 0.05% Tween20 e ancora tre volte con PBS. Si aggiunge quindi un anticorpo anti IFN- γ biotinilato diluito 1:250 in Assay buffer (PBS+5%FBS+0.05% Tween20) e si incuba over night a 37°C. Si procede successivamente con il lavaggio come già riportato in precedenza. Quindi si aggiunge Streptavidina coniugata con la perossidasi diluita 1:2500 in Assay buffer e si lascia al buio per 3 ore quindi si lava come nei passaggi precedenti e si aggiunge il substrato. Si attende lo sviluppo (che si presenta come puntini neri su uno sfondo bianco) sul fondo della piastra quindi si lava con H₂O e si lascia asciugare. Il numero degli "spots" vengono determinati mediante conta elettronica all'ELISPOT reader (AID ELR02).

2.8 ICS (Intra-cellular staining)

Questa tecnica è utilizzata per la determinazione della produzione di IFN- γ specifica in risposta ad uno stimolo antigenico e permette di discriminare la risposta CD4 e CD8, mediante una marcatura specifica con Ab anti CD8, anti CD4 e anti CD3 (BD Pharmingen, San Diego, CA). Per la produzione

degli splenociti si procede alla stessa maniera riportata per l'ELISPOT. Quindi gli splenociti così ottenuti vengono messi alla concentrazione di $1-2 \times 10^6$ /ml in stimolo con i peptidi alla concentrazione di 2-10 μ g/ml over night. Quindi si procede ad un lavaggio, aggiungendo 3 ml di FACS buffer (PBS + 1% FBS inattivato termicamente) si centrifuga per 10 minuti a 1200 rpm e si risospende in 100 μ l di FACS buffer. Alla diluizione di 1:50 si aggiunge l'anticorpo anti recettore dell'Fc e si incuba a 4°C per 15 minuti, si lava aggiungendo 3 ml di FACS Buffer e centrifugando per 10 minuti. Si procede risospendendo il pellet con 100 μ l di FACS Buffer e quindi con la marcatura superficiale aggiungendo 2 μ l di ognuno dei seguenti Anti CD3, Anti CD8 e Anti CD4, si lascia incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Dopo i 30 minuti di incubazione si lava come nel passaggio precedente quindi si permeabilizza la membrana cellulare aggiungendo 100 μ l di detergente Citofix/Citoperm (BD Pharmingen, San Diego, CA). Il passaggio successivo è il lavaggio con Perm Wash buffer (BD Pharmingen, San Diego, CA) e in fine si aggiunge un anticorpo Anti IFN- γ e si incuba per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Si lava come precedentemente riportato, quindi si fissa il campione aggiungendo 300 μ l di PBS + 1% Formaldeide. I campioni così ottenuti si analizzano al Citofluorimetro (FACSCalibur BD Immunocytometry System).

2.9 Analisi Cellule Memoria

Le cellule polimorfonucleate (PBMC) sono stata ottenute da sangue periferico e marcate con: Tetramer AntiCEA-PE (Proimmune, Oxford, UK); Ab AntiCD8-PercP (BD Pharmingen); Ab AntiCD62L-APC (BD Pharmingen). Le cellule memoria sono state identificate con pannelli sequenziali, seguendo i seguenti criteri: morfologico CD8⁺, Tetramero⁺, CD62L high expression.

2.10 Titolazione Anticorpale

Per la titolazione anticorpale contro CEA dei sieri degli animali immunizzati si è utilizzato un saggio ELISA. Piastre multy well 96 (NUNC multisorb plate) sono state quotate con la proteina CEA ricombinante (Fitzgerald, highly pure CEA). Il giorno successivo si lavano con Buffer di lavaggio (PBS + 0.05% Tween20) quindi si bloccano con PBS+5%

BSA+0.05% Tween20 per un ora a 37°C e si aggiunge il siero degli animali immunizzati diluito di un fattore 2 fino a 6400 e si incuba per o/n a 4°C. Si lava per 3 volte con PBS + 5% BSA + 0.05% Tween20 quindi si aggiunge un anticorpo “anti-anticorpo di topo” coniugato con fosfatasi alcalina e si incuba per 2-3 a RT, poi si lava per 3 volte con PBS + 5% BSA + 0.05% Tween20 e si aggiungono 100µl di substrato (TMB), si lascia sviluppare il colore per 30 minuti quindi si blocca la reazione con l’aggiunta di 20µl di acido solforico 1N e si va a leggere l’assorbanza con ELISAreader a 450 nm/620 nm di lunghezza d’onda.

2.11 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando come test statistici il T-Test ed il Log Rank Test. Quando il valore p ottenuto era <0.05 i dati sono stati ritenuti significativi.

3 Risultati

3.1 Costruzione del vettore adenovirale ricombinante esprimente hCEA.

Il vettore adenovirale utilizzato nei vari protocolli di immunizzazione è stato ottenuto mediante vari clonaggi successivi in vettori shuttle, sino all'ottenimento del costrutto finale utilizzato per la formazione del virus. In tale vettore la cassetta di espressione di CEA è fiancheggiata a 5' dal promotore di Citomegalovirus/Introne A, mentre a 3' dal segnale di poliadenilazione. Tale costrutto di circa 20000 bp è stato trasfettato in cellule di packagin Perc6, e dopo vari passaggi cellulari di amplificazione si è ottenuta una preparazione virale ad alta concentrazione. Per testare l'efficienza del vettore virale si è proceduto ad un'infezione in cellule HeLa, il cui estratto cellulare è stato raccolto a 48 ore e analizzato per western blot (figura 4).

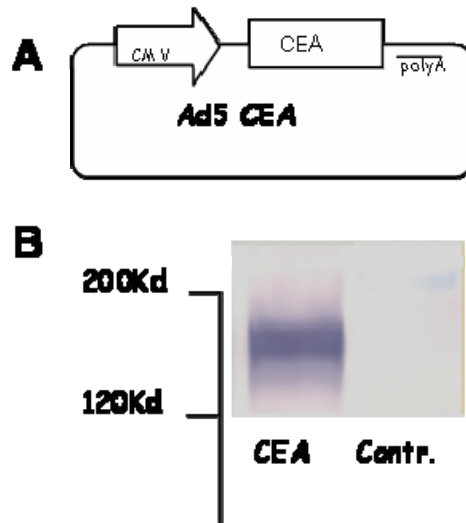


Figura 4. Generazione AdenoCEA.

(A) E' riportata una rappresentazione schematica della mappa del plasmide utilizzato per costruire il virus ricombinante. (B) E' riportato un esperimento di espressione in cellule di mammifero HeLa mediante saggio western blot in cui si dimostra l'espressione di CEA da parte di AdenoCEA.

3.2 Preparazione ed efficienza del anticorpo monoclonale AntiCD25 (PC61).

L'anticorpo monoclonale AntiCD25 è stato prodotto in asciti di topi nudi, iniettando nel peritoneo degli animali $5 \cdot 10^6$ di cellule dell'ibridoma PC61 (ATCC). Dopo circa 20 giorni le asciti vengono raccolte, poi scomplementate e pulite dai residui cellulari. L'ascite così ottenuta è stata infine purificata su proteina G e l'anticorpo quantificato per l'assorbanza a 280 nm.

L'anticorpo purificato è stato utilizzato per effettuare la deplezione/inattivazione delle cellule T_R ; 500 μ g dello stesso vengono iniettati nel peritoneo degli animali e la sua efficienza valutata già dopo 3-4 giorni dall'iniezione. I protocolli di immunizzazione hanno previsto la deplezione/inattivazione al giorno -4 rispetto al trattamento col vaccino adenovirale esprimente CEA umano. Esattamente l'anticorpo non induce una reale deplezione delle T_R , ma una loro inattivazione funzionale. Infatti tutti i lavori precedenti hanno sempre parlato di deplezione delle cellule regolatorie, in quanto i markers CD4 e CD25 negli animali trattati tendevano a zero, ma se invece si osserva la % di cellule $CD4^+/FOXP3^+$ dopo l'iniezione di Ab AntiCD25, in realtà non ci sono variazioni rispetto al controllo. Per cui le cellule T_R sono ancora circolanti, ma in uno stato non funzionale (Recettore CD25 è down regolato, per cui la % $CD4^+/CD25^+$ va a zero) (Kohm et al., 2006). **(figura 5A-B)**. L'inattivazione funzionale dei T_R è revertibile, infatti dopo circa 35 giorni dall'iniezione di Ab AntiCD25 gli animali tornano a valori fisiologici di T_R funzionali e circolanti **(figura 5C)**.

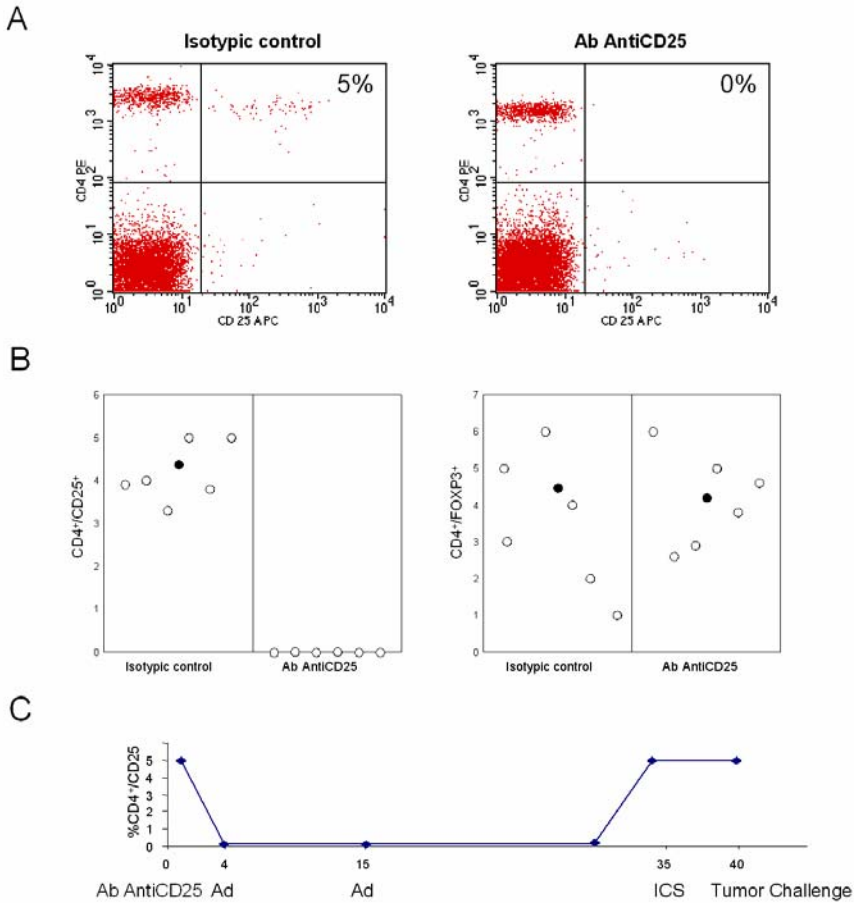


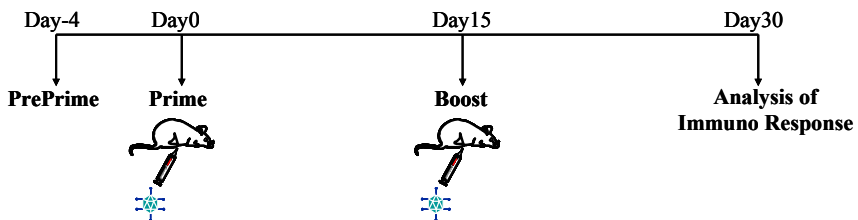
Figura 5. Deplezione/Inattivazione cellule T_R .

(A) Esempio di down regolazione di CD25 in T_R osservato al giorno 0, mediante analisi al citofluorimetro, della popolazione $CD4^+/CD25^+$. Si osserva come nel controllo (animali non iniettati con Ab AntiCD25) la popolazione T_R sia il 5% del totale dei CD4, mentre in quelli depleti sia completamente assente. (B) Confronto % cellule $CD4^+/CD25^+$ e $CD4^+/FOXP3^+$ in animali iniettati con Ab AntiCD25 e non, i singoli animali sono rappresentati dal bollino bianco (○) mentre la media dalla croce (●). (C) Efficienza della T_R deplezione/inattivazione monitorata in topi trattati mediante FACS.

3.3 Protocollo di vaccinazione.

La inattivazione delle cellule T_R è un approccio che razionalmente dovrebbe incrementare l'efficienza della risposta immunitaria contro un antigene self. Infatti se si pensa che il limite di una vaccinazione genetica contro un antigene self è quello di rompere la tolleranza del sistema immunitario, più o meno forte, l'eliminazione di quello che oggi è considerato uno dei più potenti sistemi di regolazione dovrebbe aiutare a questo scopo. Quindi basandomi su questo razionale ho tentato di ottimizzare un protocollo di immunizzazione basato sull'utilizzo di adenovirus come vettore per l'antigene CEA associato alla inattivazione T_R .

Dopo varie prove per definire le condizioni e i tempi ottimali di inattivazione e le dosi migliori di vaccino, il protocollo sul quale l'intero studio è stato condotto è il seguente:



Per cui sono stati presi in considerazione gruppi di animali +/- Ab AntiCD25, trattati con 2 iniezioni di adenovirus (1×10^9 particelle fisiche), distanziate di 15 giorni, al giorno 30 invece è stata effettuata l'analisi immunologica mediante ICS, ELISPOT per determinare la produzione di Interferone- γ da parte delle cellule CD8 e CD4 in risposta ad uno stimolo specifico, ELISA per la produzione di anticorpi.

3.4 La inattivazione T_R incrementa la risposta cellulo-mediata.

Studi precedenti hanno dimostrato che si può indurre una risposta CEA specifica mediante vaccinazione con AdenoCEA in animali CEA.Tg (Mennuni et al., 2005). In questo lavoro invece abbiamo cercato di valutare se inattivando le cellule T_R sarebbe stato possibile incrementare la risposta CEA specifica e ottenere una sostanziale protezione antitumorale.

Nei nostri studi abbiamo utilizzato come marcatore di attivazione IFN- γ . Questa citochina è tipicamente prodotta da cellule T che sono attivate mediante il loro recettore T (TCR), ad opera di APC che presentano sia con

MHC di classe I (per T CD8⁺), che di classe II (per T CD4⁺). A questo punto abbiamo valutato se la risposta cellulo-mediata in animali trattati secondo il protocollo precedentemente introdotto fosse stata potenziata. Questa analisi è stata effettuata 15 giorni dopo l'ultima iniezione di adenovirus, mediante la tecnica della rilevazione intracellulare di IFN- γ (ICS). Gli splenociti preparati dalle milze dei topi iniettati +/- Ab AntiCD25 (il gruppo non inattivato è stato iniettato con un anticorpo isotipico, col fine di escludere un eventuale effetto aspecifico dell'adiuvante), sono stati stimolati "overnight" con un pool di peptidi (peptidi di 15 aa, che si sovrappongono per 11 aa), ricoprenti l'intera proteina CEA. Sono stati analizzati gruppi di 8-10 animali singolarmente per tipologia di trattamento. La risposta è stata valutata al citofluorimetro, osservando la % di cellule IFN- γ ⁺CD3⁺CD8⁺.

In **figura 6A** vediamo l'esempio di una analisi per ICS di un animale trattato con Ab AntiCD25+AdenoCEA, in cui viene valutata la % di cellule CD3⁺CD8⁺ produttori IFN- γ , questo viene effettuato mediante pannelli sequenziali: morfologico->CD3⁺->CD8⁺-> IFN- γ ⁺CD8⁺. Nel pannello **B** invece osserviamo un plot dei valori di tutti gli animali, e si vede come l'incremento della risposta CD8⁺ CEA specifica negli animali che hanno visto l'adiuvante ab AntiCD25 sia notevole, il tutto convalidato da analisi statistica mediante T-test (P<0.05).

Così come per la risposta CD8 è stata effettuata un'analisi della risposta CD4 (**figura 7**), in questo caso gli splenociti degli animali trattati sono stati stimolati col Pool di peptidi (PoolC) ricoprente la zona centrale della proteina CEA. Come descritto in precedenza è stata valutata al citofluorimetro la % di cellule IFN- γ ⁺CD3⁺CD4⁺.

Nella **figura 7 pannello A** vediamo un esempio su singolo topo della risposta IFN- γ ⁺CD4⁺, mentre nel pannello **B** il valore dei singoli animali e la media (P<0.05).

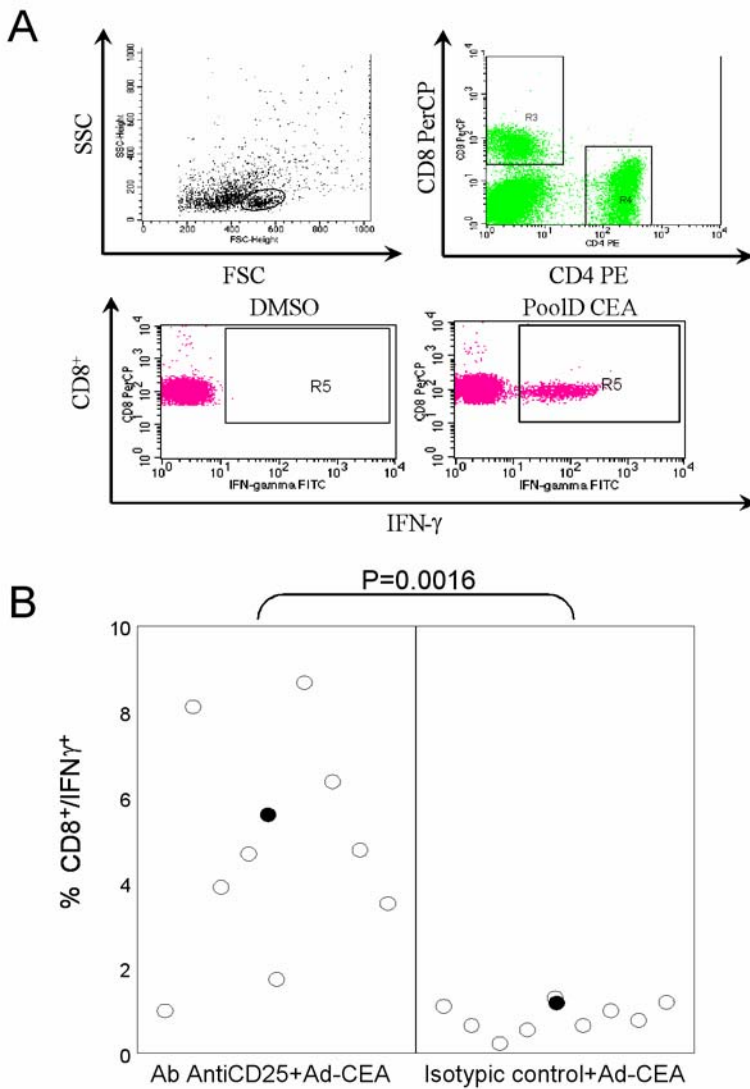


Figura 6. Analisi risposta CD8 nel modello CEA.

(A) Esempio di ICS su singolo animale, gli splenociti dopo stimolazione col PoolD di peptidi per CEA sono stati marcati con diversi anticorpi fluorescenti. L'analisi è stata effettuata con "gates" sequenziali, così da determinare la % di cellule $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD8}^+$ CEA specifiche. Come controllo si utilizza il DMSO, il quale è il solvente in cui i peptidi stessi sono disciolti. (B) L'analisi per ICS dimostra l'incremento della risposta CD8 specifica contro CEA, i singoli animali sono rappresentati dal simbolo bianco (\circ) mentre la media dal simbolo nero (\bullet).

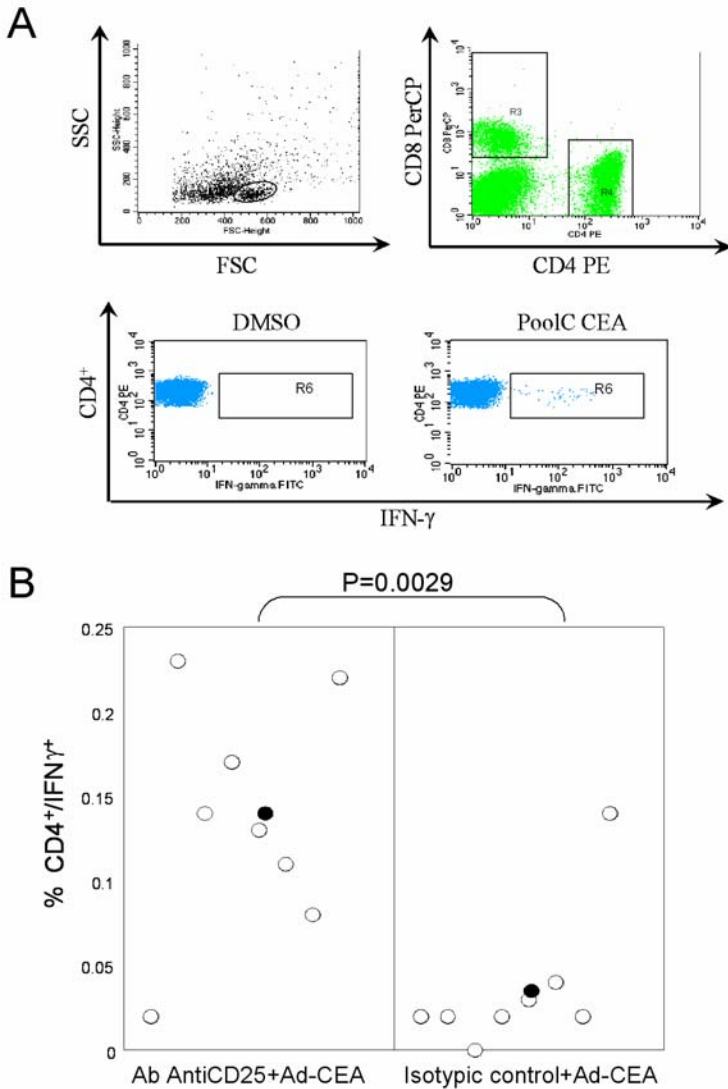


Figura 7. Analisi risposta CD4 nel modello CEA.

(A) Esempio di ICS su singolo animale, gli splenociti dopo stimolazione col PoolC di peptidi per CEA sono stati marcati con diversi anticorpi fluorescenti. L'analisi è stata effettuata con pannelli sequenziali, così da determinare la % di cellule IFN- γ ⁺CD4⁺ CEA specifiche. Come controllo si utilizza il DMSO, il quale è il solvente in cui i peptidi stessi sono disciolti. (B) L'analisi per ICS dimostra l'incremento della risposta CD4 specifica contro CEA, i singoli animali sono rappresentati dal simbolo bianco (○) mentre la media dal simbolo nero (●).

3.4.1 Incremento risposta CD8 anti Ep-CAM in topi CD1 q/q.

A dimostrazione della efficacia generica di adjuvanza del anticorpo Ab AntiCD25 sono stati condotti studi di immunizzazione in un ceppo differente, con un diverso immunogeno. Da miei studi paralleli ho identificato un sottogruppo di topi outbred CD1 capaci, a differenza di vari ceppi inbred utilizzati, di presentare una risposta immunitaria nei confronti di mEp-CAM (Elia et al., 2006). Questi animali hanno delle caratteristiche genetiche che permettono loro di essere responsivi ad un antigene self altamente tollerato. Esattamente quello che caratterizza questi animali è il tipo di MHC sulle APC (essi sono omozigoti q/q sia per classe I che II), ed il livello di TCR V β 4 e V β 8 espotto dalle cellule T responsive. Per cui questo modello è stato da me utilizzato per dimostrare che la inattivazione delle T_R potesse funzionare in un contesto self diverso da CEA.

Gli animali sono stati così immunizzati seguendo le stesse modalità di vaccinazione per CEA, e 15 giorni dalla seconda iniezione di adenovirus, siamo andati a valutare la % di cellule IFN- γ ⁺CD3⁺CD8⁺. Ed abbiamo visto che come per CEA anche per Ep-CAM avevamo un incremento della risposta immunitaria statisticamente rilevante (**Figura 8**).

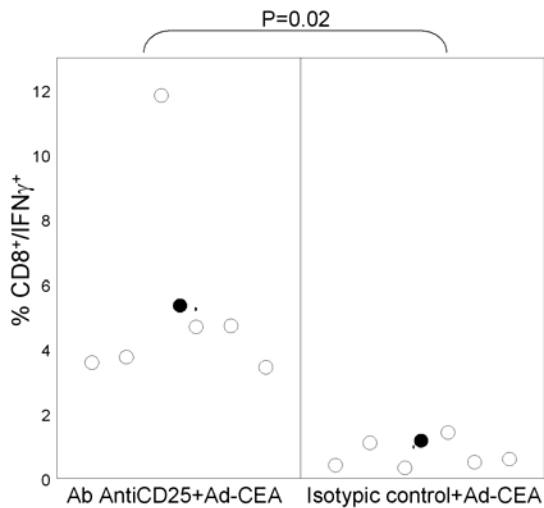


Figura 8. Analisi risposta CD8 in modello Ep-CAM.

L'analisi per ICS dimostra l'incremento della risposta CD8 specifica contro mEp-CAM, i singoli animali sono rappresentati dal simbolo bianco (○) mentre la media dal simbolo nero (●).

3.4.2 Identificazione peptidi responsivi.

Dopo l'analisi della risposta cellulo-mediata sono andato a verificare quali fossero i peptidi della proteina CEA che nel pool utilizzato mi davano la risposta IFN- γ^+ . Per fare ciò ho utilizzato la tecnica dell'ELISPOT in cui le cellule derivanti da animali immunizzati sono state stimulate con i singoli peptidi. Non ho osservato differenze tra il gruppo depleto e non in termini di peptidi responsivi, e precisamente il peptide CD8 identificato è stato il numero 143 (Pool D), mentre il CD4 (Pool C) il numero 107, entrambi poi riconfermati per ICS (**Tabella I**).

Pool	Peptide	Posizione	Sequenza	CD8 ⁺	CD4 ⁺
C	CEA-107	425-439	TYYPGPNLSLSCHA	0.02	0.13
D	CEA-143	569-583	YVCGIQNSVSANRSD	5	0.02
	DMSO			0.01	0.01

3.5 Incremento della risposta umorale.

L'inattivazione delle cellule regolatorie permette anche lo "sblocco" della risposta umorale antigene specifica. Infatti dall'analisi della risposta umorale utilizzando un saggio ELISA, in cui la proteina CEA sintetica viene quotata su piastra, si osserva che gli animali trattati con Ab AntiCD25 mostrano un incremento della risposta, calcolata sulle IgG totali; si tratta quasi di un fenomeno tutto o nulla, rispetto al controllo non trattato. La **figura 9** mostra un plot di 8 animali per gruppo, utilizzando come parametro di riferimento la diluizione limite. Ed infatti si può osservare che 6/8 animali trattati con Ab AntiCD25+Adeno sono positivi, mentre 1/8 per il trattamento Isotipico+Adeno.

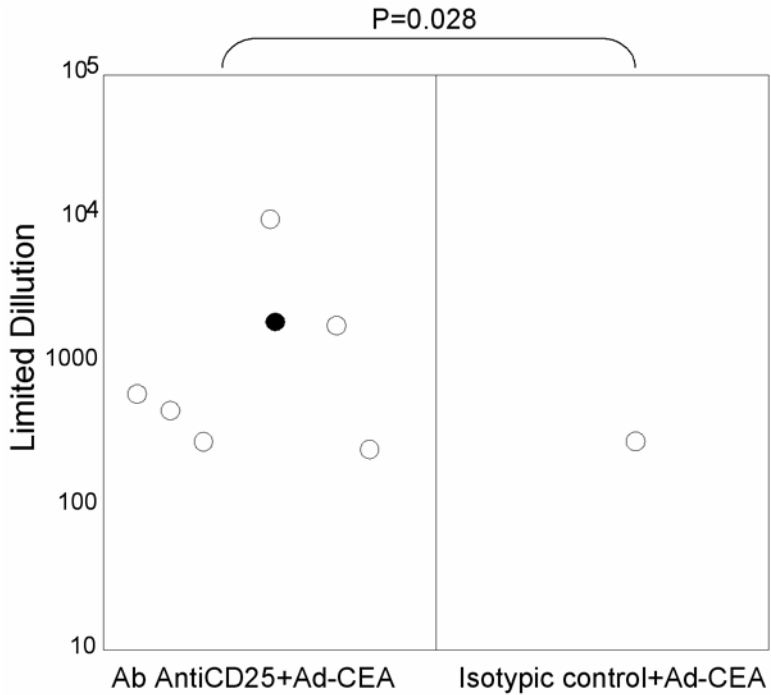


Figura 9. Analisi risposta umorale modello CEA.

L'analisi per ELISA dimostra l'incremento della risposta umorale specifica contro CEA, i singoli animali sono rappresentati dal simbolo bianco (○) mentre la media dal simbolo nero (●), analizzati 8 animali per gruppo.

3.6 Cinetica della risposta cellulo-mediata CD8 e analisi della memoria immunologica.

La risposta cellulo-mediata è stata monitorata nel tempo per valutarne la persistenza. Questo tipo di analisi è stata effettuata utilizzando cellule polimorfonucleate (PBMC) derivanti da prelievi sanguinei retroorbitali degli animali in trattamento. Le cellule così ottenute sono state stimulate col pool di peptidi per CEA, specifici per la risposta CD8. Per ogni punto ho analizzato dei campioni derivanti da un pool di 6 animali per gruppo.

Quello che si osserva è che cineticamente la risposta $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD8}^+$ non differisce tra i due gruppi di trattamento, la differenza è solo sull'intensità della risposta stessa (**figura 10**). Inoltre nello studio sono andato a ristimolare gli animali trattati con un'iniezione di un altro sierotipo di adenovirus veicolante CEA (Ad6-CEA), ristimolo effettuato quando la risposta CD8^+ era giunta a livelli non più monitorabili. L'utilizzo di un altro sierotipo si è reso necessario per evitare l'abbattimento della risposta dovuta ad anticorpi neutralizzanti contro le proteine di adeno stesso (Youil et al., 2002). Quello che ho osservato è stato un incremento della risposta citotossica con un andamento analogo a quello già osservato prima del "boost", per cui gli animali trattati con Ab AntiCD25 presentavano una risposta $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ più intensa degli animali -Ab AntiCD25 anche dopo il richiamo immunologico .

Inoltre ho determinato la % di cellule memoria presenti nei due gruppi, in modo da definire una correlazione con l'incremento della risposta CD8 dopo il "boost", che mi faceva supporre la presenza di un numero di cellule memoria CEA specifiche maggiore negli animali trattati con Ab AntiCD25. A questo scopo ho analizzato i PBMC derivanti da un pool di 6 animali, le cui cellule sono state colorate per CD8, Tetramero CEA e CD62L. L'analisi è stata fatta una settimana prima del "boost" col sierotipo 6 di AdenoCEA. Per cui sono andato a valutare il livello di espressione di CD62L nelle cellule $\text{CD8}^+/\text{TetrameroCEA}^+$ come marker per determinare la situazione delle cellule memoria centrali (Klebanoff et al., 2005; Sallusto et al., 1999). Quello che ho potuto così osservare è che gli animali in cui era stata effettuata l'inattivazione delle T_R presentano un numero di cellule memoria maggiore rispetto al controllo (174 contro 120), ed ulteriormente il livello di espressione del marcatore della memoria centrale CD62L è incrementato nel gruppo +Ab AntiCD25 (la media dei valori di espressione di CD62L è 929 contro 529). Ciò correla con l'incremento della risposta CD8 osservato nell'analisi cinetica (**figura 11**).

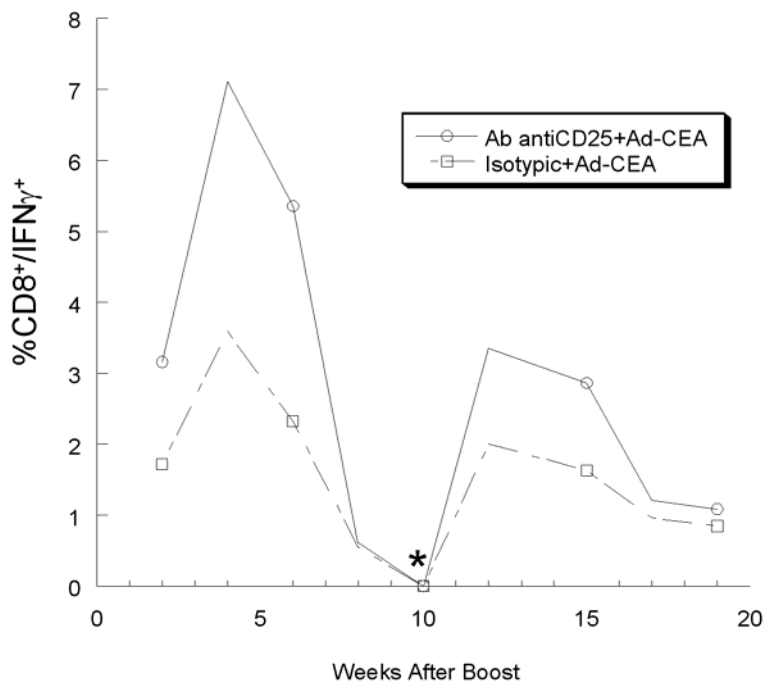


Figura 10. Cinetica della risposta CD8 nel modello CEA mediante ICS.

Ogni punto si riferisce ad un pool di 6 animali per gruppo, e la risposta è stata monitorata a partire dal 15 giorno dopo la fine del protocollo di immunizzazione. Quando la risposta alla settimana 10 è giunta sotto i livelli di rilevazione è stato effettuato un ulteriore “boost” (*) con un diverso sierotipo di AdenoCEA e la risposta è stata ulteriormente monitorata seguendo le stesse modalità.

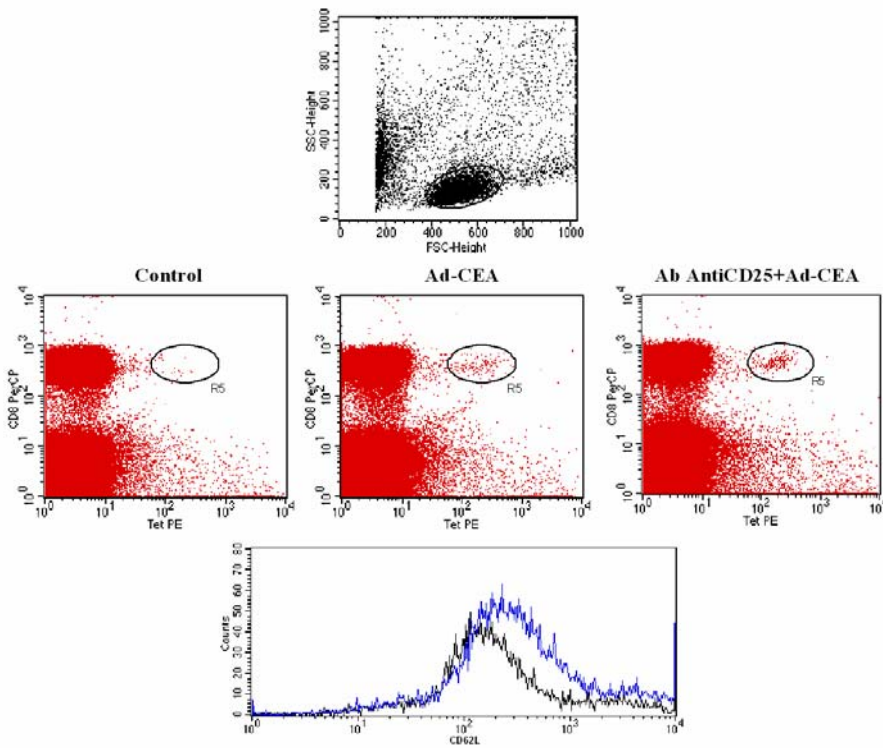


Figura 11. Analisi cellule memoria.

Le cellule sono state marcate per CD8, MHC classe I CEA specifico e CD62L e analizzate con pannelli sequenziali: morfologico->CD8⁺/Tetramero⁺-> CD62L. Si osserva come le cellule del gruppo trattato con Ab AntiCD25+AdenoCEA (linea blu) abbiano un livello di espressione di CD62L maggiore rispetto al gruppo trattato solo con AdenoCEA (linea nera).

3.7 Il miglioramento della risposta immune di riflesso induce una marcata protezione tumorale.

A questo punto, dopo aver dimostrato come il protocollo utilizzato incrementi tutti i parametri immunologici, il passo successivo era quello di dimostrare che esso fosse effettivamente capace di proteggere gli animali dal tumore. Per far ciò è stata utilizzata una linea tumorale murina ingegnerizzata per l'espressione del nostro antigene CEA. La via di induzione del tumore utilizzata è stata quella intrasplenica. L'utilizzo di

questa modalità di “tumor challenge” è stata scelta perchè permette al tumore di seguire un iter quasi fisiologico e poter metastatizzare a livello di fegato e polmoni. In questo esperimento sono stati utilizzati 15 animali per gruppo e l’impianto delle cellule tumorali è stato effettuato circa 40 giorni dopo l’ultima iniezione di vaccino, quando le cellule T_R erano già tornate a livelli fisiologici. Anche in questo caso sono stati utilizzati vari gruppi di controllo per scongiurare l’effetto aspecifico dell’adiuvanza di Ab AntiCD25. Il parametro di osservazione è stata la sopravvivenza degli animali dopo il challenge (**figura 12**). Come si osserva in figura il nostro protocollo di vaccinazione risulta essere notevolmente efficace ($p < 0.0003$) anche nella protezione contro il tumore, dato essenziale per validare tutto quello ossevato in precedenza (13/15 animali sopravvivono a 300 giorni dal tumor challenge).

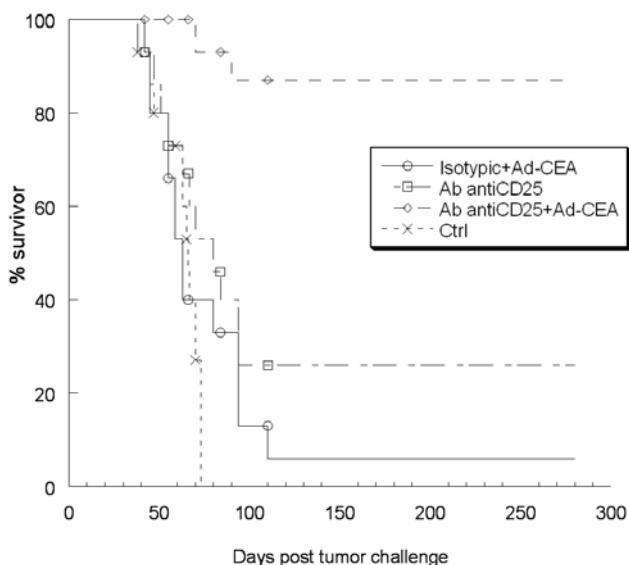


Figura 12. “Tumor challenge” intrasplenico (5.10^4 cellule per topo).

I gruppi utilizzati (15 animali per gruppo) sono: Ab Isotipico+AdenoCEA (\circ), Ab AntiCD25 solo (\square), Ab antiCD25+AdenoCEA (\diamond) e gruppo non trattato (\times). Il gruppo di trattamento di interesse (\diamond) ha una % di sopravvivenza maggiore del 90 e l’analisi statistica utilizzando il Log Rank Test conferma l’osservazione empirica rispetto al gruppo trattato col solo Ab AntiCD25 (\square), $P < 0.0003$.

3.7.1 Meccanismi di protezione tumorale: 1) deplezione T; 2) trasferimento siero

Utilizzando questo modello metastatico ci siamo chiesti se la protezione fosse dovuta al fatto che nei topi trattati il tumore attecchisse o no, oppure se il trattamento fosse invece capace di far revertire il tumore metastatizzante. Per far ciò abbiamo utilizzato un sistema di monitoraggio non invasivo basata sulla misurazione della cheiluminescenza prodotta dalla linea tumorale MC38-CEA modificata per l'espressione della luciferasi (Immagini e analisi effettuate con il sistema IVIS200 della Xenogen). Animali iniettati con le MC38-CEA-Luc evidenziano un chiaro segnale oltre che nel luogo di iniezione (milza) anche nel fegato e occasionalmente nei polmoni. In **figura 13 A** si può osservare un'immagine ventrale di differenti misurazioni di due gruppi rappresentativi. Entro due settimane dall'iniezione un segnale compare nella milza sia degli animali di controllo che trattati con Ab AntiCD25+AdenoCEA, ma a tempi successivi la situazione cambia drasticamente, in quanto nei controlli il tumore cresce esponenzialmente mentre nei trattati tende ad essere eliminato (**figura 13 B**). Interessante è il caso del topo n°1, in cui si osserva che il segnale nella zona destra del ventre, corrispondente al fegato tende a scomparire nel tempo. Con questa osservazione possiamo speculare che la metastasi epatica reverta, almeno in questo caso.

Per cui per determinare quale potesse essere il meccanismo di protezione indotto da questa procedura profilattica e/o quale popolazione cellulare responsabile della protezione, ho condotto esperimenti di deplezione cellulare e di trasferimento di siero in animali CEA impiantati col tumore. Per cui gli animali vaccinati col protocollo ottimale, sono stati depletati della popolazione CD8 o CD4 prima del tumor challenge (vedi materiali e metodi). Poi la crescita tumorale è stata seguita col sistema Xenogen, e si è osservato che la deplezione CD8 e non la CD4 è fortemente influente sulla crescita del tumore (**figura 14 A**). Per vedere se invece gli anticorpi prodotti negli animali vaccinati potessero essere in parte responsabili della protezione, il siero derivante da animali trattati è stato iniettato in animali non immunizzati, i quali hanno poi subito il tumor challenge. Il tumore è stato poi seguito con sistema Xenogen, ma non si è osservata alcuna inibizione della crescita tumorale (**figura 14 B**).

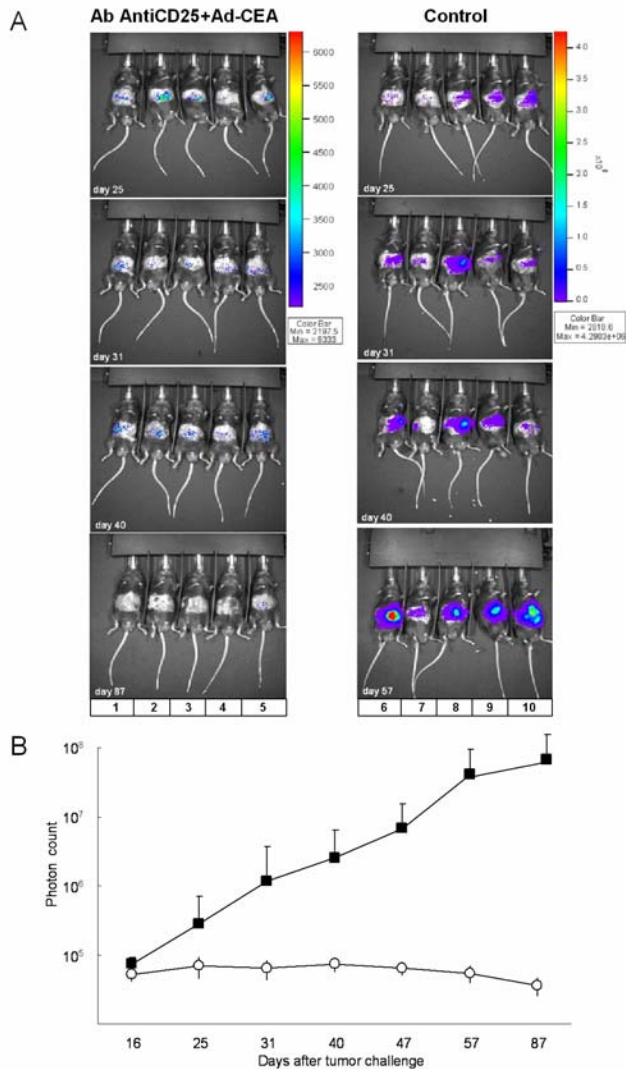


Figura 13. Monitoraggio crescita tumorale *in vivo*.

Per seguire la metastazzazione del tumore è stata utilizzata una linea tumorale esprimente la luciferasi. La crescita tumorale è stata monitorata e misurata settimanalmente utilizzando il sistema Xenogen IVIS200, ed ogni gruppo era formato da 10 animali. (A) Immagine ventrale della cheiluminescenza *in vivo* di due gruppi rappresentativi (Ab AntiCD25+AdenoCEA - pannello di sinistra, Controllo - pannello di destra). Le immagini sono state ottenute dopo due minuti di esposizione e normalizzate tra i due gruppi. (B) Grafico riassuntivo della cinetica della crescita tumorale dei due gruppi. Una differenza statisticamente significativa è stata osservata tra i due gruppi, Ab AntiCD25-AdenoCEA (○) e Controllo (■), già a partire dal giorno 16 dopo il “tumor challenge” ($P < 0.05$).

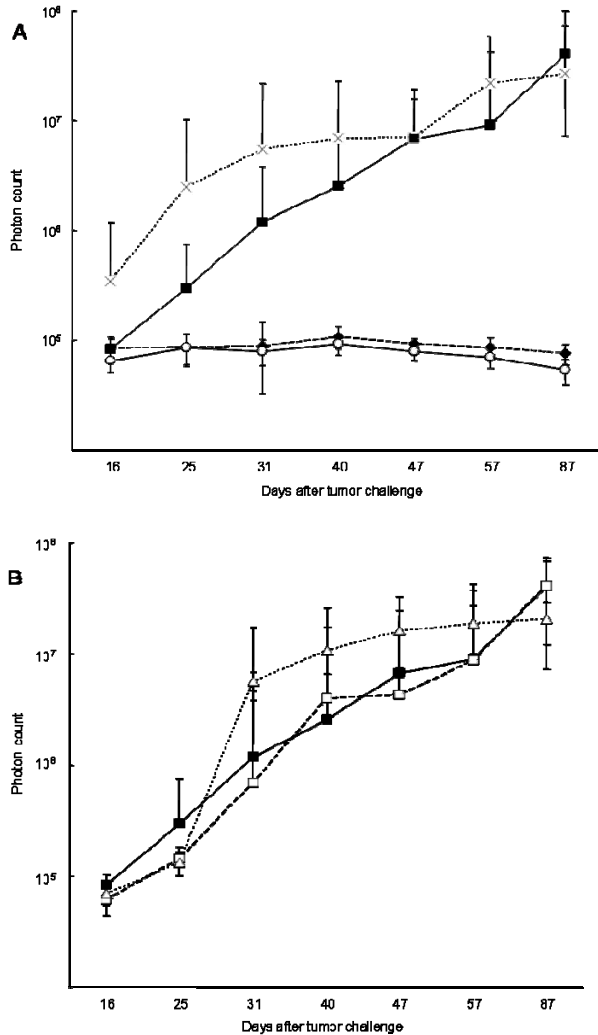


Figura 14. Effetto della deplezione CD4, CD8 e del trasferimento di siero sulla potenza antitumorale della vaccinazione Ab AntiCD25+AdenoCEA.

(A) Gruppi di topi CEA (n°10 per gruppo) vaccinati con Ab AntiCD25+AdenoCEA sono stati: non depleti (○), depleti CD4 (◆) o depleti CD8 (x) e successivamente iniettati con le cellule MC38-CEA-Luc, con un ulteriore gruppo di controllo non vaccinato (■). (B) Per verificare se l'incremento del titolo anticorpale Anti-CEA osservato nei topi vaccinati con Ab AntiCD25+AdenoCEA potesse contribuire alla protezione antitumorale, siero proveniente da topi vaccinati Ab AntiCD25+AdenoCEA (Δ) o vaccinati con Isotipico+AdenoCEA (□) o da topi non trattati (■) è stato trasferito in topi CEA non immunizzati (10 animali per gruppo) prima del "tumor challenge" (vedi materiali e metodi). Non si è però osservata alcuna differenza significativa in termini di luminescenza tra i due gruppi, a nessun tempo.

3.7.2 Protezione antitumorale contro Survivin.

L'efficacia della inattivazione delle T_R in adjuvanza con un vaccino adenovirale, nella protezione antitumorale, non è ristretta solo a modelli quali CEA. Infatti per dimostrare ciò sono andati a studiare l'impatto delle T_R nella vaccinazione contro mSurvivin in topi balb/c. Il protocollo utilizzato è stato lo stesso degli esperimenti precedenti. Però rispetto a CEA la differenza sta nel fatto che questi animali non presentavano alcuna risposta $INF-\gamma^+$, né $CD8^+$ né $CD4^+$. Probabilmente avremmo potuto seguire come marcatore immunitario anche IL-2 e/o $TNF-\alpha$. In ogni caso la cosa interessante è che questi animali così immunizzati e sottoposti poi ad un tumor challenge sottocutaneo presentavano una notevole protezione antitumorale rispetto ai controlli (**figura 15**).

Tutto ciò andava pertanto a confermare che questo tipo di adjuvanza seguiva un meccanismo generale, non antigene specifico.

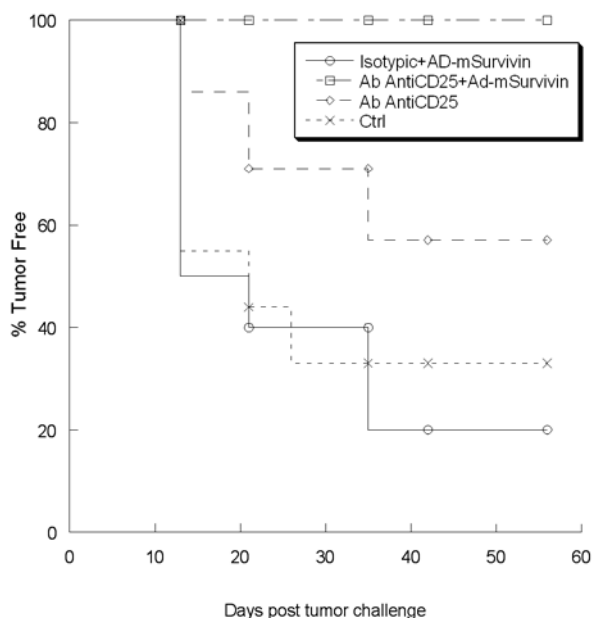


Figura 15. Tumor challenge sottocutaneo in topi vaccinati contro mSurvivin.

I gruppi utilizzati (15 animali per gruppo) sono: Ab Isotipico+AdenoSurvivin (\circ), Ab antiCD25 solo (\diamond), Ab AntiCD25+AdenoSurvivin (\square) e gruppo non trattato (\times). Il gruppo di trattamento di interesse (\square) ha una % di sopravvivenza del 100 e l'analisi statistica utilizzando il Log Rank Test conferma l'osservazione empirica rispetto al gruppo trattato col solo Ab AntiCD25 (\diamond), $P < 0.05$.

4 Discussione

I meccanismi di regolazione del sistema immunitario sono ad oggi forte argomento di indagine e discussione. La scoperta di una popolazione cellulare come i T_R ha permesso di comprendere molte cose a riguardo e di iniziare a sfruttarle per l'ottimizzazione dei protocolli di vaccinazione genetica. Infatti l'eliminazione temporanea di questa popolazione dal circolo (mediante l'uso di un MoAb specifico) è stata sfruttata per incrementare la responsività immunitaria indotta da vaccini cellulari, sia cellulo mediata che anticorpale. In realtà ciò che fino a poco tempo fa veniva definito come deplezione dei T_R oggi è definito come inattivazione dei T_R , che rimangono in circolo sotto forma inattiva (Kohm et al., 2006) (**Figura 5**).

I dati riportati in questo lavoro indicano che l'inattivazione delle cellule T_R in associazione con la vaccinazione utilizzando un adenovirus esprimente CEA induce un incremento della risposta CD8, CD4 ed inoltre un aumento del titolo anticorpale. Il miglioramento della risposta immunitaria è associato alla protezione tumorale in un modello metastatico e ciò indicherebbe che la vaccinazione Ab AntiCD25+AdenoCEA è effettivamente preventiva nei confronti dello sviluppo del tumore.

L'inattivazione delle cellule T_R è stato esplorato in vari lavori precedenti, in cui si riportava il suo impatto associato alla vaccinazione utilizzando linee cellulari, ma ciò poteva essere rischioso per la possibilità di induzione di effetti collaterali associati alla presenza di un ampio spettro di antigeni espressi dalle cellule utilizzate come vaccino. La vaccinazione gene specifica potrebbe ridurre la possibilità di effetti collaterali nei tessuti esprimenti quei determinati antigeni. Infatti, nei nostri esperimenti utilizzando CEA come antigene in animali CEA.Tg, non abbiamo osservato alcun effetto collaterale né di tipo tissutale né sistemico (**Tabella II**). Questa mancanza di effetti collaterali sembra però essere in contrasto con molti lavori che riportano invece danni di vario tipo negli animali inattivati CD25. In realtà noi crediamo che l'utilizzazione di una breve periodo di inattivazione e la specifica vaccinazione contro un antigene determinato possa ridurre notevolmente la presenza di essi più efficientemente di altri tipi di protocolli. Tuttavia, siamo pienamente consapevoli della possibilità che questi protocolli possano indurre effetti collaterali dovuti alla vaccinazione concomitante con antigeni non desiderati, così come riportato in recenti lavori (Wei et al., 2005).

Quando si esplorano strategie di vaccinazione antitumorale per futuri "trials" clinici è fondamentale definire protocolli ottimali e avere la

possibilità di monitorare l'effettività della vaccinazione stessa. Così, l'utilizzo di tecniche come l'ICS/IFN- γ ha dimostrato che l'inattivazione delle T_R è abile ad indurre una più robusta risposta CD8 rispetto al vaccino da solo (**Figura 6**). Apparentemente questo tipo di protocollo incrementa la risposta cellulo-mediata non solo nel modello tollerante CEA. Infatti, noi abbiamo osservato un comportamento analogo utilizzando il gene murino Ep-CAM, sempre in un contesto tollerante (**Figura 8**). Interessante sono i risultati osservati, infatti noi riusciamo a misurare l'incremento di risposta in questo ceppo outbred CD1 (MHC q/q), nel quale comunque già vediamo una bassa risposta col solo utilizzo del Adeno-mEp-CAM, mentre ciò non è vero in altri ceppi in cui la risposta immune senza adiuvanza non è presente. Da qui la conclusione che esiste un meccanismo generale di adiuvanza mediato dalla inattivazione delle T_R , solo se il vaccino originale è capace, da solo, di rompere la tolleranza immunitaria. Ulteriormente la combinazione inattivazione T_R + vaccino adenovirale è risultata responsiva anche in un terzo modello (Survivin); in questo caso però noi abbiamo osservato ne una risposta cellulo mediata (IFN- γ^+) ne anticorpale negli animali vaccinati, i quali invece presentano una totale protezione tumorale (**Figura 15**). Però non possiamo neanche escludere che il tipo di vaccinazione possa indurre una risposta immunitaria basata anche su altre molecole come TNF- α o IL-2, da noi non misurata, per cui le nostre osservazioni devono essere comunque ristrette all'osservazione della produzione di IFN- γ .

Tornando a CEA, l'incremento della risposta immunitaria osservato è associato ad una concreta protezione tumorale in un modello metastatico. Noi abbiamo valutato solo la potenzialità profilattica e non terapeutica di questo approccio, e ciò perchè da varie nostre osservazioni l'inattivazione delle cellule T_R blocca la crescita tumorale (se effettuata dopo il "tumor challenge") in accordo con molteplici dati pubblicati (Golgher et al., 2002; Tawara et al., 2002). Il trattamento profilattico esplorato potrebbe essere applicato a pazienti che abbiano subito un trattamento chirurgico per eliminare il tumore primario, così da evitare l'insorgenza di recidive. Inoltre, il rationale di un trattamento profilattico può differire da quello di tipo terapeutico. In prima istanza una lunga ed effettiva risposta memoria potrebbe privilegiare un'immediata risposta immunitaria, la quale avrebbe la capacità di eradicare un'esistente massa tumorale preesistente (Kudo-Saito et al., 2005). In questa direzione in questo lavoro noi abbiamo dimostrato che la inattivazione T_R incrementa l'esistente risposta immunitaria, così come indicato dal livello elevato di marcatori di cellule memoria, e dalla forte risposta CD8 osservata dopo il richiamo con un adenovirusCEA differente

tre mesi dopo l'iniziale trattamento (**Figure 10 e 11**). Questa osservazione è in linea con le precedenti osservazioni sui vaccini virali o più in generale col ruolo delle T_R nella risposta memoria CD8 specifica (Kursar et al., 2002).

In conclusione, il mio lavoro di dottorato ha dimostrato che la transiente inattivazione delle cellule T_R in sinergia con una vaccinazione genetica induce una più potente risposta immunitaria, associata ad una forte protezione antitumorale, in un modello self. Un risultato analogo (incremento risposta immunitaria + protezione antitumorale) è confermato anche in un lavoro recente, nel quale viene usato però un modello tumorale neuronale (Fecci et al., 2006).

	Adeno	CD25+Adeno	CD25	Reference Values
WBC ($10E03/\mu L$)	7.46 \pm 1.41	8.60 \pm 0.23	9.55 \pm 1.93	3.2 - 12.7
RBC ($\times 10E06/\mu L$)	9.87 \pm 0.15	9.92 \pm 0.53	9.79 \pm 0.13	7.0 - 10.1
HGB (g/dL)	14.34 \pm 0.21	14.23 \pm 0.32	14.27 \pm 0.15	11.8 - 14.9
HCT (%)	48.88 \pm 0.85	48.43 \pm 1.97	48.17 \pm 0.75	36.7 - 46.8
MCV (fL)	49.52 \pm 0.47	48.83 \pm 0.64	49.20 \pm 0.1	42.2 - 59.2
MCH (pg)	14.56 \pm 0.13	14.40 \pm 0.44	14.57 \pm 0.15	13.8 - 18.4
MCHC (g)	29.38 \pm 0.23	29.43 \pm 0.55	29.63 \pm 0.29	31 - 34.7
PLT (pg)	1487 \pm 71	1648 \pm 467	1500 \pm 72.29	766 - 1657
NEUT (%)	16.18 \pm 3.31	13.73 \pm 2.67	12.17 \pm 0.99	6.8 - 31.1
LYM (%)	77.28 \pm 4.14	80.30 \pm 4.01	81.90 \pm 1.06	60.2 - 95
MONO (%)	2.10 \pm 0.77	2.03 \pm 0.21	1.60 \pm 0.69	0 - 4.3
EOS (%)	2.94 \pm 0.56	2.60 \pm 1.28	2.53 \pm 0.86	0.2 - 5.9
LUC (%)	1.30 \pm 0.69	1.13 \pm 0.46	1.53 \pm 0.85	0 - 3.2
BASO (%)	0.18 \pm 0.08	0.27 \pm 0.06	0.27 \pm 0.12	0 - 0.3
#NEUT ($\times 10E03/\mu L$)	1.23 \pm 0.46	1.19 \pm 0.26	1.16 \pm 0.20	0.5 - 2.0
#LYM ($\times 10E03/\mu L$)	5.75 \pm 0.98	6.90 \pm 0.18	7.82 \pm 1.54	3.8 - 8.9
#MONO ($\times 10E03/\mu L$)	0.15 \pm 0.04	0.17 \pm 0.02	0.15 \pm 0.04	0 - 0.3
#EOS ($\times 10E03/\mu L$)	0.22 \pm 0.07	0.22 \pm 0.11	0.25 \pm 0.13	0 - 0.4
#LUC ($\times 10E03/\mu L$)	0.10 \pm 0.07	0.10 \pm 0.04	0.16 \pm 0.12	0 - 0.3
#BASO ($\times 10E03/\mu L$)	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02	0 - 0.1
RETIC (%)	2.81 \pm 0.34	3.02 \pm 0.09	2.77 \pm 0.33	1.4 - 5.7
#RETIC ($\times 10E09/L$)	277.5 \pm 35.9	298.9 \pm 7.7	271.2 \pm 36.34	125.8 - 469.1

Tabella II. Analisi ematologica su topi vaccinati.

Come preliminare analisi sui possibili effetti collaterali indotti dalla inattivazione delle T_R, abbiamo effettuato un'analisi dei parametri ematologici.

In tabella è indicata la media \pm deviazione standard dei valori sanguinei di tre diversi gruppi di trattamento (Ad-CEA solo, Ab AntiCD25+Ad-CEA, Ab AntiCD25 solo). Non si osserva nessuna differenza statistica tra i vari gruppi.

BIBLIOGRAFIA

1. Acsadi, G., Dickson, G., Love, D. R., Jani, A., Walsh, F. S., Gurusinghe, A., Wolff, J. A., and Davies, K. E. (1991). Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 352, 815-818.
2. Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921.
3. Armstrong, A., and Eck, S. L. (2003). EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther* 2, 320-326.
4. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190, 995-1004.
5. Balzar, M., Briaire-de Bruijn, I. H., Rees-Bakker, H. A., Prins, F. A., Helfrich, W., de Leij, L., Riethmuller, G., Alberti, S., Warnaar, S. O., Fleuren, G. J., and Litvinov, S. V. (2001). Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of EpCAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol* 21, 2570-2580.
6. Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J., and Litvinov, S. V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 77, 699-712.
7. Chang, P. L., Shen, N., and Westcott, A. J. (1993). Delivery of recombinant gene products with microencapsulated cells in vivo. *Hum Gene Ther* 4, 433-440.
8. Chen, C. M., Chao, K., and Su, I. J. (1991). Acute primary Epstein-Barr virus infection presenting as acute abdomen. *Pediatr Infect Dis J* 10, 471-473.
9. Chowdhury, N. R., Wu, C. H., Wu, G. Y., Yerneni, P. C., Bommineni, V. R., and Chowdhury, J. R. (1993). Fate of DNA targeted to the liver by asialoglycoprotein receptor-mediated endocytosis in vivo. Prolonged persistence in cytoplasmic vesicles after partial hepatectomy. *J Biol Chem* 268, 11265-11271.
10. Clarke, P., Mann, J., Simpson, J. F., Rickard-Dickson, K., and Primus, F. J. (1998). Mice transgenic for human carcinoembryonic antigen as a model for immunotherapy. *Cancer Res* 58, 1469-1477.
11. Collins, A. V., Brodie, D. W., Gilbert, R. J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D. I., van der Merwe, P. A., and

- Davis, S. J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* *17*, 201-210.
12. Crystal, R. G., Mastrangeli, A., Sanders, A., Cooke, J., King, T., Gilbert, F., Henschke, C., Pascal, W., Herena, J., Harvey, B. G., and et al. (1995). Evaluation of repeat administration of a replication deficient, recombinant adenovirus containing the normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the airways of individuals with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* *6*, 667-703.
 13. Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H., and Blaese, R. M. (1992). In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* *256*, 1550-1552.
 14. Curotto de Lafaille, M. A., Lino, A. C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J. J. (2004). CD25⁻ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* *173*, 7259-7268.
 15. de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* *34*, 2480-2488.
 16. Elia, L., Mennuni, C., Storto, M., Podda, S., Calvaruso, F., Salucci, V., Aurisicchio, L., Scarito, A., Ciliberto, G., La Monica, N., and Palombo, F. (2006). Genetic vaccines against Ep-CAM break tolerance to self in a limited subset of subjects: initial identification of predictive biomarkers. *Eur J Immunol* *36*, 1337-1349.
 17. Farhood, H., Gao, X., Son, K., Yang, Y. Y., Lazo, J. S., Huang, L., Barsoum, J., Bottega, R., and Epan, R. M. (1994). Cationic liposomes for direct gene transfer in therapy of cancer and other diseases. *Ann N Y Acad Sci* *716*, 23-34; discussion 34-25.
 18. Fecci, P. E., Sweeney, A. E., Grossi, P. M., Nair, S. K., Learn, C. A., Mitchell, D. A., Cui, X., Cummings, T. J., Bigner, D. D., Gilboa, E., and Sampson, J. H. (2006). Systemic anti-CD25 monoclonal antibody administration safely enhances immunity in murine glioma without eliminating regulatory T cells. *Clin Cancer Res* *12*, 4294-4305.
 19. Fehervari, Z., and Sakaguchi, S. (2004). CD4⁺ Tregs and immune control. *J Clin Invest* *114*, 1209-1217.
 20. Fontenot, J. D., and Rudensky, A. Y. (2005). A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* *6*, 331-337.

21. Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T., and Gallimore, A. (2002). Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol* 32, 3267-3275.
22. Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3, 1097-1101.
23. Huang, E. H., and Kaufman, H. L. (2002). CEA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1, 49-63.
24. Huber, S., Schramm, C., Lehr, H. A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P. R., Neurath, M. F., and Blessing, M. (2004). Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 173, 6526-6531.
25. Ikeguchi, M., Ueta, T., Yamane, Y., Hirooka, Y., and Kaibara, N. (2002). Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 8, 3131-3136.
26. Klebanoff, C. A., Gattinoni, L., Torabi-Parizi, P., Kerstann, K., Cardones, A. R., Finkelstein, S. E., Palmer, D. C., Antony, P. A., Hwang, S. T., Rosenberg, S. A., *et al.* (2005). Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9571-9576.
27. Kobayashi, K., Hatano, M., Otaki, M., Ogasawara, T., and Tokuhisa, T. (1999). Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1457-1462.
28. Kohm, A. P., McMahon, J. S., Podojil, J. R., Begolka, W. S., DeGutes, M., Kasprovicz, D. J., Ziegler, S. F., and Miller, S. D. (2006). Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 176, 3301-3305.
29. Kudo-Saito, C., Schlom, J., Camphausen, K., Coleman, C. N., and Hodge, J. W. (2005). The requirement of multimodal therapy (vaccine, local tumor radiation, and reduction of suppressor cells) to eliminate established tumors. *Clin Cancer Res* 11, 4533-4544.
30. Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Kohler, A., Hurwitz, R., Kamradt, T., Kaufmann, S. H., and Mittrucker, H. W. (2002).

- Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 196, 1585-1592.
31. Li, F., and Altieri, D. C. (1999). Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* 344 Pt 2, 305-311.
 32. Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, H. E., and Gerharz, C. D. (1999). Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 59, 6097-6102.
 33. Mennuni, C., Calvaruso, F., Facciabene, A., Aurisicchio, L., Storto, M., Scarselli, E., Ciliberto, G., and La Monica, N. (2005). Efficient induction of T-cell responses to carcinoembryonic antigen by a heterologous prime-boost regimen using DNA and adenovirus vectors carrying a codon usage optimized cDNA. *Int J Cancer* 117, 444-455.
 34. Momburg, F., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J., and Moller, P. (1987). Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res* 47, 2883-2891.
 35. Monzo, M., Rosell, R., Felip, E., Astudillo, J., Sanchez, J. J., Maestre, J., Martin, C., Font, A., Barnadas, A., and Abad, A. (1999). A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 17, 2100-2104.
 36. Muchmore, S. W., Chen, J., Jakob, C., Zakula, D., Matayoshi, E. D., Wu, W., Zhang, H., Li, F., Ng, S. C., and Altieri, D. C. (2000). Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Mol Cell* 6, 173-182.
 37. O'Connor, D. S., Wall, N. R., Porter, A. C., and Altieri, D. C. (2002). A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2, 43-54.
 38. Osta, W. A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y. A., Cole, D. J., and Gillanders, W. E. (2004). EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 64, 5818-5824.
 39. Quantin, B., Perricaudet, L. D., Tajbakhsh, S., and Mandel, J. L. (1992). Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2581-2584.
 40. Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345-352.

41. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
42. Satoh, K., Kaneko, K., Hirota, M., Masamune, A., Satoh, A., and Shimosegawa, T. (2001). Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 92, 271-278.
43. Schwartz, R. H. (2005). Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 6, 327-330.
44. Shively, J. E., and Beatty, J. D. (1985). CEA-related antigens: molecular biology and clinical significance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2, 355-399.
45. Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58, 5315-5320.
46. Tanaka, K., Iwamoto, S., Gon, G., Nohara, T., Iwamoto, M., and Tanigawa, N. (2000). Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 6, 127-134.
47. Tawara, I., Take, Y., Uenaka, A., Noguchi, Y., and Nakayama, E. (2002). Sequential involvement of two distinct CD4+ regulatory T cells during the course of transplantable tumor growth and protection from 3-methylcholanthrene-induced tumorigenesis by CD25-depletion. *Jpn J Cancer Res* 93, 911-916.
48. Thompson, J. A., Grunert, F., and Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5, 344-366.
49. Verdecia, M. A., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D. A., Hunter, T., and Noel, J. P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 7, 602-608.
50. Wei, W. Z., Jacob, J. B., Zielinski, J. F., Flynn, J. C., Shim, K. D., Alsharabi, G., Giraldo, A. A., and Kong, Y. C. (2005). Concurrent induction of antitumor immunity and autoimmune thyroiditis in CD4+ CD25+ regulatory T cell-depleted mice. *Cancer Res* 65, 8471-8478.
51. Went, P. T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., and Dirnhofer, S. (2004). Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 35, 122-128.
52. Ye, Z. Q., Burkholder, J. K., Qiu, P., Schultz, J. C., Shahidi, N. T., and Yang, N. S. (1994). Establishment of an adherent cell feeder

- layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 12140-12144.
53. Youil, R., Toner, T. J., Su, Q., Chen, M., Tang, A., Bett, A. J., and Casimiro, D. (2002). Hexon gene switch strategy for the generation of chimeric recombinant adenovirus. *Hum Gene Ther* *13*, 311-320.
 54. Zhao, J., Tenev, T., Martins, L. M., Downward, J., and Lemoine, N. R. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* *113 Pt 23*, 4363-4371.

Curriculum Vitae Leonardo Elia

Education and degrees

- 2002-06 Molecular and Cellular biology PhD studentship, University of Rome “Tor Vergata“. Practical training at IRBM-Merck MRL Laboratories, Pomezia (Rome). Research Field: Gene therapy/Cancer Vaccine.
- 2002 Post-lauream practical training in Molecular Biology at TIGEM Institute-Naple.
- March 2001 Degree in Pharmaceutical Biotechnology - 110/110 (with honors) – University of Bologna.
- 2000-01 Practical training at University of Bologna. Field: Molecular Biology.
- 1995-00 Undergraduate student in Biotechnology, University of Bologna.
- 1995 High school certificate - Liceo Scientifico “E. Fermi”, Martina Franca (TA).

Training and research experience

- From November 2003 to 2006.
PhD studentship, Molecular and Cellular Biology Department, IRBM- Merck MRL, Pomezia (Rome).
Obj.: Improvement of Adeno-vector systems and application for tumor vaccination.
Supervisor: Prof. Gennaro Ciliberto, Dr Fabio Palombo.
- From June 2002 to October 2003.
Fellowship, Molecular and Cellular Biology Department, IRBM-Merck MRL, Pomezia (Rome).
Obj.: Improvement of Adeno-vector system.
Supervisor: Prof. Gennaro Ciliberto, Dr Fabio Palombo.

From March 2002 to May 2002.

Fellowship, TIGEM Institute – Telethon Foundation, Naples.

Obj.: In silico analysis of epithelial mouse EST libraries.

Supervisor: Dott. Caterina Missero.

From January 2000 to March 2001.

Undergraduate student, Biochemistry Department, University of Bologna.

Thesis: "Evolution in vitro of human DNA topoisomerase I with DNA Shuffling".

Supervisor: Prof. Giovanni Capranico.

Lista Pubblicazioni/Comunicazioni Leonardo Elia

ELIA L, MENNUNI C, STORTO M, PODDA S, CALVARUSO F, SALUCCI V, AURISICCHIO L, SCARITO A, CILIBERTO G, LA MONICA N AND PALOMBO F. “DNA- and adenovirus-based vaccines against Ep-CAM break tolerance to self in a limited subset of subjects: initial identification of predictive biomarkers of immune response.” European Journal of Immunology, 2006 May;36(5):1337-49.

ELIA L, AURISICCHIO L, FACCIABENE A, GIANNETTI P, CILIBERTO G, LA MONICA N AND PALOMBO F. “CD4[±]CD25[±] regulatory T cell-depletion in combination with adenovirus vaccines enhances T-cell responses and tumor immunity to self antigens in mouse models”. *In Press*, Cancer Gene Therapy.

FACCIABENE A, AURISICCHIO L, **ELIA L**, PALOMBO F, MENNUNI C, CILIBERTO C AND LA MONICA N. “DNA and Adenovirus vectors encoding CEA fused to immuno-enhancing sequences augment antigen specific immune response and confer tumor protection.” Human Gene Therapy, 2006 Jan;17(1):81-92.

ELIA L, STORTO M, PODDA S, SALUCCI S, AURISICCHIO L, SCARITO A, MONACI P, CILIBERTO G, LA MONICA N AND PALOMBO F. “Tumor Protection and Immuno-response in Mice Vaccinated with Human Ep-CAM but not with the Mouse Ep-CAM Homologue.” Poster Session: International Meeting of CANCER VACCINES, Istituto Superiore di Sanità, Rome.

ELIA L, AURISICCHIO L, STORTO M, FACCIABENE A., LA MONICA N AND PALOMBO F. “CD25 depletion in adenovirus vaccination resulted in a more effective immunoresponse and tumor protection in CEA transgenic mice.” Poster Session: 6° Convegno FISV, Riva del Garda (Italy).

FACCIABENE A, AURISICCHIO L, **ELIA L**, MENNUNI C, CALVARUSO F, SCARSELLI E., CILIBERTO G, LA MONICA N. “Immunogenic and antitumor efficiency of plasmid dna and adenovirus vectors encoding cea fusion proteins.” For presentation at: American Association For Cancer Research 96th Annual Meeting, Anaheim, California.