

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede amministrativa del corso di dottorato

Dipartimento di Fisiologia e Patologia

XX ciclo di dottorato

in patologia sperimentale e clinica

(settore scientifico disciplinare: MED04)

Il sistema del complemento come strumento terapeutico nella terapia dei tumori

Dottorando:
Paolo Macor

Coordinatore:
prof. Pietro Dri

Relatore:
prof. Francesco Tedesco

Indice

1. Premessa.....	4
2. Introduzione	8
2.1 Leucemia linfatica cronica	8
2.2 Linfomi maligni	10
2.3 Il carcinoma ovarico.....	13
2.4 Immunoterapia dei tumori	21
2.4.1 Teoria dell'immunosorveglianza	21
2.4.2 Antigeni tumorali	21
2.4.3 Anticorpi e loro bersaglio	27
2.4.4 Anticorpi ricombinanti da librerie fagiche	29
2.4.4.1 <i>Struttura di un fago e vettori di clonazione</i>	
2.4.4.2 <i>Produzione e selezione delle librerie anticorpali</i>	
2.4.4.3 <i>Modifica dei scfv</i>	
2.4.4.4 <i>Limiti degli anticorpi</i>	
2.4.5 Meccanismi d'azione degli anticorpi antitumorali	35
2.4.5.1 <i>Citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC)</i>	
2.4.5.2 <i>Fagocitosi</i>	
2.4.5.3 <i>Apoptosi</i>	
2.4.5.4 <i>Il sistema del complemento</i>	
2.4.5.5 <i>Citotossicità cellulare complemento-dipendente (CDCC)</i>	
2.5 Terapia cellulare	48
2.5.1 Cellule endoteliali e targeting vascolare	50
2.6 L'epitopo alfa-gal e gli anticorpi naturali anti-alfa-gal	50
3. Scopo della tesi	52

4. Risultati	55
4.1 Immunoterapia del carcinoma ovarico sfruttando l'attivazione del sistema del complemento indotta dalla miscela di anticorpi anti-FR, cMov18 e cMov19	55
4.2 Immunoterapia del linfoma Non-Hodgkin's e delle leucemie linfatiche croniche sfruttando l'attivazione del sistema del complemento indotta dalla miscela Rituximab e Campath-1H.....	64
4.3 Isolamento MB55 ed MB59, anticorpi bloccanti CD55 e CD59, e caratterizzazione <i>in vitro</i> su cellule di linfoma Non-Hodgkin's.....	69
4.4 Caratterizzazione di MB55 ed MB59 in un modello <i>in vivo</i> di linfoma Non-Hodgkin's	79
4.5 Caratterizzazione di un vettore codificante per alfa1,3GT.....	88
5. Discussione e conclusione	94
5.1 Ruolo del complemento nell'immunoterapia dei tumori	95
6. Bibliografia	109

I. Premessa

Il cancro e le malattie cardiovascolari rappresentano le prime cause di morte nei paesi sviluppati; se queste ultime possono beneficiare di terapie chirurgiche e farmacologiche sempre più efficaci, i tumori, soprattutto alcuni tipi, continuano a rappresentare patologie con poche alternative terapeutiche. Nella maggior parte dei casi la chirurgia rappresenta la principale arma per eliminare le masse tumorali. La chemioterapia e la radioterapia cercano soprattutto di eliminare le cellule residue agendo sulla loro continua proliferazione, ma mancano di una reale specificità d'azione e causano ancora notevoli effetti collaterali. Le terapie più innovative puntano invece a sfruttare il sistema immunitario umano come meccanismo effetore. I tumori però derivano da cellule del nostro organismo ed il fatto che abbiano potuto svilupparsi dimostra che il nostro sistema immunitario non li riconosce come estranei e quindi non costruisce contro di essi un'efficiente risposta. I meccanismi effettori del sistema immunitario sono quindi potenzialmente in grado di distruggere in maniera selettiva le cellule tumorali e di causare in questo modo pochissimi effetti collaterali, ma necessitano di qualcosa che indirizzi e faccia partire la loro azione. L'utilizzo degli anticorpi monoclonali come strumento terapeutico vuole appunto sfruttare la loro capacità di raggiungere in maniera molto selettiva uno specifico bersaglio e di attivare di seguito il sistema immunitario.

I meccanismi d'azione utilizzati dagli Ab, una volta legati alle cellule tumorali, si basano sull'induzione di processi apoptotici (in maniera dipendente dall'antigene a cui si sono legati), sull'attivazione della citotossicità cellulare e sull'attivazione della cascata complementare. Diversi autori hanno messo in risalto il fatto che gli anticorpi più efficaci in clinica sono proprio quelli con la maggior capacità di sfruttare quest'ultimo meccanismo. A differenza dell'apoptosi e della citotossicità cellulare, il complemento si basa su un sistema di proteine extracellulari che si attivano a cascata e portano alla morte della cellula tumorale, principalmente creando un poro transmembranario e provocando quindi la lisi osmotica del bersaglio. Il suo principale vantaggio sta proprio nell'azione rapida e diretta, che

non necessita dell'attivazione di processi intracellulari (apoptosi) o del richiamo di cellule effettrici nella sede in cui si è sviluppato il tumore (citotossicità cellulare).

Come detto però, non tutti gli anticorpi si sono dimostrati in grado di attivare la cascata complementare (1); altri, pur attivandola, non portano alla lisi della cellula bersaglio (2); altri ancora, pur avendo un buon effetto citotossico su cellule tumorali *in vitro*, si sono dimostrati poco efficaci una volta testati *in vivo* (3).

In questi tre anni abbiamo voluto studiare le cause di questi insuccessi e abbiamo cercato di intervenire per proporre delle nuove strategie da utilizzare nell'immunoterapia dei tumori.

1. L'incapacità di attivare la cascata complementare, nella maggior parte dei casi, è da imputare ad un'insufficiente concentrazione degli antigeni associati al tumore; questo non permette di ottenere una congrua vicinanza tra gli anticorpi ad essi legati, che è la condizione essenziale perché attivino il sistema complementare. Utilizzando diversi anticorpi diretti contro epitopi distinti dello stesso antigene associato al tumore è stato possibile dimostrare che è possibile creare una densità anticorpale sufficiente ad ottenere buona attivazione complementare anche sfruttando molecole poco espresse sulla superficie delle cellule tumorali. Un effetto analogo si può ottenere anche utilizzando anticorpi diretti contro due diversi antigeni presenti sulla superficie delle cellule tumorali.

2. Le cellule tumorali derivano da cellule del nostro organismo e come tali esprimono sulla loro superficie delle molecole la cui funzione fisiologica è quella di inibire un'attivazione indesiderata della cascata complementare. Ne deriva che l'espressione, e spesso l'iper-espressione, degli inibitori di membrana del complemento sulle cellule tumorali riduce l'azione degli anticorpi e quindi la lisi delle cellule bersaglio. Sulla base di questo concetto abbiamo pensato di estendere la terapia anticorpale anche a queste molecole, isolando e caratterizzando degli anticorpi in grado di bloccare l'azione degli inibitori di

membrana, affiancandoli poi ai comuni anticorpi terapeutici. In questo modo il sistema del complemento, attivato sulle cellule tumorali, non troverebbe ostacoli nella sua azione litica e potrebbe eliminare un maggior numero di cellule tumorali.

3. Se è ipotizzabile un'efficiente azione del complemento su cellule tumorali isolate o aggregati cellulari, è più difficile immaginare la riduzione di una massa tumorale già sviluppata solo attraverso la sua azione. Va ricordato che, se gli anticorpi possono diffondere nell'organismo, non è stata dimostrata la presenza di tutti gli elementi del sistema complementare nel micro-ambiente tumorale. E' possibile quindi che anticorpi, con ottime prospettive dopo gli esperimenti su cellule in coltura, non dimostrino un reale effetto terapeutico negli esperimenti *in vivo* semplicemente perché manca il meccanismo effettore nella sede tumorale. Molte cellule dei distretti periferici, e le stesse cellule tumorali, possono produrre alcune proteine della cascata complementare, ma è indubbio che la maggior parte delle molecole del sistema del complemento sono prodotte dal fegato e circolano nel sangue. Creare dei danni ai vasi sanguigni intra-tumorali, oltre ad un effetto "anti-angiogenetico" diretto, permetterebbe quindi il passaggio delle proteine complementari dal circolo al micro-ambiente tumorale ed una migliore azione citotossica degli anticorpi antitumorali. A questo scopo abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'utilizzo di cellule endoteliali umane modificate geneticamente che possono venir reclutate dai vasi in via di formazione nelle masse tumorali ed in seguito venir lisate dal sistema del complemento in maniera specifica ed efficace; in questo caso si indurrebbe, come auspicato, un aumento della permeabilità vascolare nelle regioni tumorali, con un passaggio di anticorpi anti-tumorali, proteine complementari e cellule effettrici proprio in quella sede.

Con questi obiettivi ci siamo concentrati su alcuni modelli sperimentali:

a) in primo luogo uno studio sul carcinoma ovarico utilizzando due anticorpi diretti contro due epitopi diversi di un antigene associato a questo tumore e che in precedenza, utilizzati singolarmente, non si erano dimostrati capaci di attivare il

complemento. Questo studio è il risultato della collaborazione con l'Istituto Tumori di Milano ed in particolare con il gruppo della dottoressa Silvana Canevari, la quale ha potuto fornirci molti campioni prelevati da pazienti con carcinoma ovarico, utili per confermare i risultati ottenuti su linee cellulari.

b) a fianco a questo ci siamo occupati delle leucemie linfatiche croniche, che esprimono sulla superficie cellulare due marker tumorali, CD20 e CD52, e contro cui sono diretti due anticorpi monoclonali utilizzati in clinica, Rituximab e Campath-1H. Sono state utilizzate cellule di pazienti con questa patologia, isolate e caratterizzate dal gruppo del dottor Valter Gattei del Centro di Riferimento Oncologico di Aviano (PN).

c) Il Rituximab, primo anticorpo entrato in clinica nella terapia dei tumori, esercita la sua azione principalmente in seguito all'attivazione del sistema complementare; tale azione risulta però limitata dalla presenza degli inibitori di membrana del complemento, come già da noi dimostrato in uno studio in collaborazione con il gruppo della dottoressa Josee Golay dell'Istituto Mario Neri di Milano e degli Ospedali Riuniti di Bergamo.

Ogni linea di ricerca è partita con lo studio delle rispettive linee cellulari per avvalorare le idee proposte; i dati ottenuti sono stati poi confermati con analisi su campioni prelevati da pazienti o con modelli animali il più possibile rappresentativi della patologia umana. Una parte dei risultati sono stati oggetto delle pubblicazioni incluse, altri sono stati valorizzati dalla concessione di brevetti sulle molecole prodotte, altri ancora fanno parte di progetti tuttora in corso, ma nel loro insieme rappresentano la base di partenza degli studi che andremo a sviluppare in futuro.

2. Introduzione

Il cancro consiste in una neoformazione di tessuto che è indipendente dal punto di vista evolutivo, funzionale e nutrizionale rispetto al tessuto normale dal quale deriva. Una condizione patologica di natura neoplastica può essere causata da mutazioni di geni che controllano la crescita cellulare, da alterazioni di natura genetica che convertono un proto-oncogene in un oncogene, da infezioni da parte di virus oncogeni. La cellula, come conseguenza di questi eventi, non riesce più a controllare nel modo corretto la propria crescita ed il proprio differenziamento(1).

Le neoplasie possono essere divise in benigne e maligne. I tumori benigni presentano un accrescimento localizzato e limitato nel tempo, sono costituiti da cellule uguali o simili a quelle del tessuto dal quale derivano e la massa tumorale benigna che si viene a formare “si limita” a comprimere i tessuti normali vicini. I tumori maligni hanno un accrescimento più rapido e progressivo, sono dotati di attività invasiva nei confronti dei tessuti circostanti, possono propagarsi a distanza in altri organi attraverso il torrente circolatorio (metastasi) e presentano più o meno spiccati segni di atipia cellulare rispetto all'organo dal quale provengono (1). I tumori maligni vengono classificati in base all'origine embrionale del tessuto dal quale derivano: i carcinomi derivano da tessuti di origine endodermica o ectodermica come la cute o gli epitelii, le leucemie ed i linfomi originano dalle cellule ematopoietiche del midollo osseo (le prime proliferano come cellule singole mentre i secondi tendono a crescere come masse tumorali), mentre i sarcomi derivano da tessuti connettivi di origine mesodermica (osso, tessuto adiposo e cartilagine) (1).

2.1 Leucemia linfatica cronica

La leucemia linfatica cronica (LLC) è una patologia onco-ematologica, caratterizzata da un processo linfoproliferativo cronico che coinvolge linfociti B attivati. Gli elementi cellulari tipici della LLC, morfologicamente simili ai piccoli

linfociti maturi del sangue periferico, tendono ad accumularsi a livello di midollo osseo, sangue periferico, linfonodi e milza.

Questa patologia è più comunemente riscontrata in pazienti di età superiore ai 50 anni, ma una diagnosi più accurata identifica molti pazienti più giovani. La LLC, che risulta essere la forma leucemica più frequente negli Stati Uniti e, più in generale, nei Paesi occidentali industrializzati, è contraddistinta da maggior incidenza nel sesso maschile.

Le cellule della LLC presentano solitamente una trisomia del cromosoma 12 isolata oppure associata ad altre anomalie cromosomiche. La clonalità è stata dimostrata anche dall'espressione di una singola catena leggera (κ o λ) o con la specificità dell'idiotipo immunoglobulinico. Di rado, cellule che sembrano essere di leucemia linfatica cronica possono essere di origine T o natural killer (NK); queste varietà meno comuni comprendono malattie un tempo riconosciute come T-LLC, ma attualmente definite come leucemie linfocitiche a grandi cellule granulari, leucemia a cellule T suppressor, leucemia a cellule T dell'adulto e leucemia prolinfocitica T(2).

La diagnosi di LLC si basa sull'esame obiettivo e sull'osservazione dello striscio periferico. Gli esami di laboratorio denotano la presenza di leucocitosi e le cellule maligne appaiono tipicamente come piccoli linfociti con morfologia normale. La doppia espressione in superficie di antigeni cellulari B (CD19, CD20, CD21 e CD24) con un antigene cellulare T (CD5) è di solito diagnostica di LLC. Nella maggior parte dei casi può inoltre essere dimostrata una immunoglobulina monoclonale sulla superficie cellulare, benché l'immunofluorescenza sia di solito debole. Circa il 3% dei pazienti con disordini linfoproliferativi presenta la variante a cellule T oppure, ancora più raramente, una neoplasia a cellule NK: le cellule neoplastiche T solitamente, non possono essere distinte morfologicamente dalle cellule B della LLC, ma l'espressione di marcatori di cellule T è facilmente rilevata dalla citofluorimetria a flusso; la leucemia a cellule NK è positiva per il CD16 ed i relativi linfociti neoplastici sono solitamente granulati.

2.2 Linfomi maligni

I linfomi maligni, a differenza delle leucemie, sono trasformazioni neoplastiche delle cellule che risiedono principalmente nei tessuti linfatici, le cui principali varianti sono il linfoma Non-Hodgkin's e il morbo di Hodgkin. Nonostante queste due forme tumorali infiltrino entrambe gli organi reticolo-endoteliali, sono distinte sia biologicamente che clinicamente. I linfomi Non-Hodgkin's si distinguono dai linfomi di Hodgkin in base alla derivazione cellulare, le sedi di malattia, la presenza di sintomatologia sistemica, le traslocazioni cromosomiche, la curabilità.

Linfoma Non-Hodgkin's

Negli Stati Uniti si osservano circa 40 000 nuovi casi di linfoma Non-Hodgkin's ogni anno e con una progressiva tendenza all'incremento. Sebbene il numero totale di pazienti sia relativamente limitato, se paragonato a quello di tumori solidi più comuni, i linfomi maligni sono le neoplasie più comuni nei pazienti di età compresa fra i 20 e 40 anni.

Nonostante vi siano stati pochi progressi nell'identificazione degli agenti che potrebbero essere coinvolti nell'indurre linfomi Non-Hodgkin's, progressi interessanti si sono ottenuti con l'identificazione di geni potenzialmente coinvolti nella trasformazione linfomatosa. Anomalie citogenetiche sono state documentate in numerosi linfomi Non-Hodgkin's: l'analisi delle sequenze di DNA di numerose traslocazioni cromosomiche ha evidenziato che i geni, che normalmente regolano la sintesi delle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline, sono affiancati ai geni che regolano la normale attivazione e proliferazione cellulare. Si presume che questi oncogeni siano sotto il controllo di quegli elementi di regolazione che in condizioni normali controllano la proliferazione e la differenziazione delle cellule B.

In un certo numero di patologie primitive si osserva un'aumentata incidenza nello sviluppo successivo di linfomi Non-Hodgkin's e in misura minore del linfoma di

Hodgkin. Le malattie da immunodeficienza congenita e acquisita, così come quelle autoimmuni, sono associate ad un'aumentata incidenza di linfomi. L'associazione tra immunosoppressione e induzione di linfomi Non-Hodgkin's sembra essere convincente poichè, se l'immunosoppressione è reversibile (per esempio, farmaci immunosoppressori somministrati in maniera discontinua in seguito ad un trapianto d'organo), una parte di questi casi di linfomi regredisce spontaneamente. L'incidenza dei linfomi nell'immunosoppressione iatrogena, nell'AIDS e nelle malattie autoimmuni suggerisce fortemente l'ipotesi di una deregolazione immune che contribuisce allo sviluppo del linfoma.

Alla fine degli anni Settanta erano in uso nel mondo sei schemi anatomicopatologici differenti e perciò non si è potuto fare dei paragoni tra i diversi studi terapeutici. Data questa mancanza di chiarezza fu proposta una classificazione operativa con le caratteristiche migliori delle varie classificazioni e, cosa ancor più importante, con rilevanza clinica. La classificazione operativa suddivide i linfomi Non-Hodgkin's in tre diversi sottogruppi a basso, intermedio e alto grado di malignità, in rapporto alla storia naturale. I linfomi a basso grado sono caratterizzati da un decorso clinico lento e la loro storia naturale non viene significativamente modificata dalla terapia. I linfomi a grado intermedio e alto erano in passato associati ad una sopravvivenza molto breve; con l'avvento di aggressive associazioni chemioterapiche e con nuovi approcci di immunoterapia, alcuni di questi pazienti con tumori di grado intermedio ed alto dimostrano una buona sopravvivenza a lungo termine libera da malattia.

La stadiazione dei linfomi Non-Hodgkin's si basa sul numero di siti di localizzazione del tumore (linfonodali ed extra linfonodali) e sulla presenza o assenza di sintomi sistemici. Negli stadi I e II le localizzazioni di malattia sono poste dalla stessa parte del diaframma. Nello stadio III la malattia interessa entrambi i lati del diaframma, mentre nello stadio IV si ha un interessamento extralinfonodale, più frequentemente del midollo osseo e del fegato.

Il concetto di stadiazione ha un minore impatto per quanto riguarda la strategia terapeutica del linfoma Non-Hodgkin's che per il Morbo di Hodgkin. Poiché solo il

10% dei pazienti con linfoma follicolare ha malattia localizzata, molti pazienti in stadio avanzato sono trattati in modo simile. La maggioranza dei pazienti con linfoma diffuso hanno malattia allo stadio avanzato e vengono perciò trattati con approccio sistemico. La stadiazione, quindi, è utilizzata nei linfomi Non-Hodgkin's per identificare quel piccolo numero di pazienti che può essere trattato con terapia locale e per classificarlo nelle sottoclassi istologiche in modo da stabilire la prognosi e valutare il tipo di schema terapeutico.

Numerosi studi scientifici hanno preso in esame, nei linfomi Non-Hodgkin's, la correlazione esistente tra l'espressione di marcatori della superficie cellulare e la prognosi. Sebbene molti studi abbiano trovato che il fenotipo della superficie cellulare può essere una variabile prognostica, questi studi spesso hanno fallito nella stratificazione dei pazienti per i differenti sottotipi istologici del linfoma Non-Hodgkin's e, a dispetto dei molti tentativi di determinare se l'immunofenotipo si correla con la prognosi, questo aspetto rimane ancora controverso. L'espressione di marcatori di superficie in relazione alla prognosi è stata esaminata in diverse casistiche. È stata esaminata l'espressione del recettore della transferrina (CD71), che identifica cellule proliferanti normali; sebbene gli studi iniziali avessero suggerito che pazienti con neoplasie positive per il CD71 hanno una sopravvivenza ridotta, questi studi non erano controllati attentamente per il sottotipo istologico o per la terapia. Studi più recenti, che hanno preso in esame l'espressione del CD71 all'interno di definiti sottotipi istologici di linfomi Non-Hodgkin's sia a basso che intermedio o alto grado, non sono riusciti a dimostrare una correlazione tra espressione antigenica e risultato clinico. È stato studiato poi un antigene nucleare espresso anche in normali cellule proliferanti, identificato dall'anticorpo monoclonale Ki-67. Recentemente, un'analisi multivariata ha riportato che in linfomi diffusi a grandi cellule l'antigene Ki-67 era un fattore predittivo indipendente della sopravvivenza e che pazienti con più del 60 % delle cellule positive per Ki-67 avevano una sopravvivenza media significativamente più breve.

Ulteriori sforzi scientifici sono stati inoltre compiuti per correlare la linea cellulare tumorale con la risposta al trattamento ed alla sopravvivenza. Rimane controverso se la derivazione cellulare sia una variabile che influenza la prognosi, nonostante alcuni studi suggeriscano che linfomi Non-Hodgkin's di origine T abbiano una prognosi peggiore di tumori derivati da cellule B. All'interno dei linfomi B diffusi a grandi cellule, i pazienti con tumore con un immunofenotipo aberrante (che mancano di HLA-DR, CD20 o CD22) avevano una sopravvivenza significativamente più breve: inoltre, anche l'espressione del recettore di "homing" CD44 è stata associata con malattia disseminata e sopravvivenza breve. Sebbene questi risultati siano di grande interesse, saranno necessari molti studi prospettici per confermare queste osservazioni. Al momento attuale, il trattamento dei linfomi Non-Hodgkin's è influenzato dall'immunofenotipo delle cellule tumorali, soprattutto per quel che riguarda i nuovi approcci immunoterapici.

2.3 Il carcinoma ovarico

Il carcinoma ovarico è un tumore che colpisce le ovaie, due organi delle dimensioni di circa tre centimetri situate una a destra e una a sinistra dell'utero, al quale sono connesse dalle tube. Le ovaie sono deputate alla produzione di ormoni sessuali femminili e di ovociti: ogni mese, quando la donna è fertile e non in stato di gravidanza, le ovaie producono un ovocita che si muove verso l'utero per essere fecondato.

Nel mondo occidentale, fra i tumori ginecologici, il carcinoma ovarico è il secondo per frequenza ed il primo come causa di morte. In Italia il tumore dell'ovaio colpisce una donna ogni 97, circa 4.000 donne ogni anno, con un'incidenza di 18 casi su 100.000. Al nono posto tra le forme tumorali, costituisce il 2,9% di tutte le diagnosi di tumore in Italia ed il 5% di tutti i tumori femminili in Europa. È più frequente nella popolazione caucasica, nei Paesi dell'Europa nord occidentale e negli USA, mentre è assai meno frequente nei Paesi asiatici, africani, sudamericani (www.AIRC.it).

L'80-90% dei tumori ovarici si presenta in donne in età compresa fra 20 e 65 anni, e meno del 5% in età pediatrica. La neoplasia colpisce prevalentemente donne in peri e post-menopausa con un picco massimo d'incidenza fra i 55 e i 65 anni.

Nella grande maggioranza dei casi (80%) si tratta di tumori benigni: il 60% di questi è diagnosticato in donne di età inferiore a 40 anni. Il 15-20% dei tumori ovarici è maligno e di questi il 90% è diagnosticato in donne in età superiore ai 40 anni. Infine, il restante 5-10% dei tumori ovarici è definito a malignità intermedia (borderline). A differenza dei tumori maligni, che si osservano prevalentemente in età avanzata, i tumori borderline sono più comuni in donne giovani con picco di incidenza nella quarta e quinta decade (Linee guida AIOM 2007).

Il cancro all'ovaio dovuto alla proliferazione incontrollata delle cellule dell'organo è definito primario e va distinto dai tumori ovarici di tipo secondario, che derivano invece da metastatizzazione all'ovaio di neoplasie primarie extraovariche. I primitivi originano dai tre elementi che costituiscono l'ovaio: l'epitelio di superficie, che a sua volta deriva embriologicamente dai dotti mulleriani, lo stroma ovarico e le cellule germinali che migrano all'ovaio dal sacco vitellino e che sono totipotenti. I tumori epiteliali originano dalle cellule epiteliali che rivestono superficialmente le ovaie, rappresentano il 90% delle neoplasie maligne ovariche e colpiscono sia le donne in età riproduttiva che quelle di età avanzata. I tumori dell'ovaio di origine epiteliale sono classificati secondo il tipo cellulare in tumori sierosi (tappezzati da cellule cubiche basse, sono frequentemente associati ad iperplasia epiteliale tubarica e presentano un'importante tendenza alla diffusione peritoneale), mucinosi (tappezzati da un epitelio cilindrico mucosecerno simile a quello dell'intestino e hanno una minore tendenza alla diffusione peritoneale), endometrioidi e a cellule chiare.

I tumori germinali originano dalle cellule germinali che daranno origine agli ovociti; rappresentano il 5% circa delle neoplasie ovariche maligne e interessano principalmente individui in età giovanile (infanzia e adolescenza). Si differenziano dagli altri tumori maligni dell'ovaio per la produzione di marcatori tumorali riscontrabili nel sangue (come l'alfaproteina o la gonadotropina corionica).

I tumori stromali originano dallo stroma gonadico, che costituisce il tessuto di sostegno dell'ovaio, sono, per la maggior parte, caratterizzati da una bassa malignità e rappresentano il 4% circa delle neoplasie ovariche maligne. In teoria costituiscono un gruppo facilmente diagnosticabile poiché, alla sintomatologia comune a tutti i tumori ovarici, uniscono scompensi ormonali (legati ad un'eccessiva produzione di ormoni sia femminili sia maschili, data dal fatto che parte delle cellule è in grado di produrre testosterone).

Tra i fattori di rischio ricopre un ruolo fondamentale l'età e più precisamente l'ingresso in menopausa, come dimostra il fatto che la maggior parte dei casi viene identificata in questa fase, tra la fine della quinta e sesta decade di vita. Altri elementi importanti nell'eziologia del carcinoma ovarico, come suggeriscono numerosi studi epidemiologici, sono fattori genetici familiari e fattori endocrini (www.AIRC.it). Le condizioni genetiche associate all'insorgenza di questi tumori sono la sindrome familiare del carcinoma mammario ed ovarico, la sindrome specifica del carcinoma ovarico familiare, e la sindrome ereditaria del carcinoma colico non polipoide di tipo II. Le prime due neoplasie sono causate entrambe da una mutazione ereditaria dei geni BRCA1 (q17) e BRCA2 (q13) (3). Nella popolazione generale il rischio di sviluppare un carcinoma ovarico è dell'1.8%, ma sale al 20-60% tra le donne con mutazione di BRCA1 e BRCA2. Questi due geni oncosoppressori codificano per proteine multifunzionali espresse ubiquitariamente in un ampio spettro di cellule e tessuti umani (4). L'analisi di centinaia di soggetti di diverse etnie e con una storia familiare di tumore ovarico ha evidenziato la presenza di oltre 150 differenti mutazioni a livello di questi geni; la maggior parte causa la produzione di una proteina tronca che non ha più la sua funzione oncosoppressoria di partenza, mentre le due proteine nella conformazione corretta mantengono l'integrità e la stabilità genomica della cellula: si capisce così per quale motivo le mutazioni dei due geni in oggetto siano in grado di indurre trasformazione neoplastica (5).

Va sottolineato che l'esistenza in famiglia di persone colpite da carcinoma ovarico non determina necessariamente che esso si ripresenti in tutte le donne di quella

famiglia, ma solo che in queste ultime il rischio sia più elevato rispetto alla popolazione generale (www.AIRC.it).

Mutazioni a carico di questi geni soppressori sono responsabili della maggior parte delle forme ereditarie di carcinoma ovarico epiteliale. Dal punto di vista endocrino, altri fattori di rischio associati ad una più alta incidenza di tumore ovarico sono rappresentati dal menarca precoce, menopausa tardiva, basso numero di gravidanze, nulliparità e dall'uso di sostanze inducenti l'ovulazione. Di contro, un alto numero di gravidanze, l'allattamento al seno e un prolungato impiego di contraccettivi orali riducono il rischio di insorgenza del tumore e sono quindi fattori di protezione. In particolare, donne multipare presentano una riduzione del rischio del 30% rispetto a donne che non hanno mai avuto figli. Il fattore sterilità sembra essere correlato ad un maggiore rischio tumorale in relazione alla mancanza dell'effetto protettivo svolto dall'assetto endocrinologico della gravidanza (Linee guida AIOM 2007).

Non esistono al momento programmi di screening scientificamente affidabili per la prevenzione del tumore dell'ovaio. L'analisi proteomica è un metodo di screening promettente, ma non provato, nelle pazienti ad alto rischio. Si basa sulla determinazione di un marcatore presente nel sangue, il CA-125, che però al momento non risulta affidabile perché troppo poco specifico. Questo marcatore è invece molto utile nel monitorare l'eventuale ripresa della malattia in persone colpite in precedenza da un tumore ovarico.

Uno dei motivi di fallimento della terapia del carcinoma ovarico è la diagnosi in fase avanzata di malattia. Ancor oggi, infatti, non si dispone di procedure diagnostiche con adeguata sensibilità e specificità tali da permettere una diagnosi in stadio precoce. La difficoltà di una diagnosi precoce risiede nel fatto che il carcinoma ovarico non dà segni nelle fasi iniziali della malattia, infatti la maggior parte delle pazienti, con malattia in stadio precoce, è asintomatica. Solo quando le dimensioni sono critiche e il tumore è ad uno stadio avanzato, possono manifestarsi sintomi quali un rigonfiamento della parte inferiore dell'addome, un senso di pesantezza e tensione, una vaga sensazione di dolenzia addomino-pelvica

e modifiche della motilità intestinale. Segni del tumore ovarico includono la presenza di masse annessiali ed ascite (www.AIRC.it).

La diagnosi si effettua mediante l'esame pelvico ossia la visita ginecologica e la palpazione dell'addome. Il rilevamento di una massa mediante tale esame deve far sospettare una neoplasia maligna e rende necessarie ulteriori indagini quali ecografia pelvica e vaginale e dosaggio dei marcatori sierici, come CA-125 (i cui valori possono però essere elevati in molte situazioni sia tumorali ginecologiche e non ginecologiche, sia in patologie non neoplastiche come epatopatie croniche e pancreatite). Livelli sierici elevati del CA-125 nel preoperatorio possono essere utilizzati nel follow-up postoperatorio per valutare l'eventuale ripresa della malattia. Altri esami quali TAC del torace, addome, pelvi con mezzo di contrasto e laparotomia, pur non essendo indispensabili, sono utili per completare la valutazione preoperatoria della malattia potendo dare indicazioni sulla stadiazione del tumore. I tumori ovarici sono spesso ampiamente diffusi al momento della diagnosi, perfino tumori ovarici apparentemente precoci possono avere un coinvolgimento subclinico del diaframma, del peritoneo, del liquido peritoneale e dei linfonodi pelvici (6).

Purtroppo però, nella popolazione a rischio di neoplasia, l'esame clinico, l'esecuzione di ecografia pelvica per via transvaginale e la determinazione del CA-125 annuale non hanno portato ad una anticipazione della diagnosi di neoplasia tale da modificare la prognosi della malattia (LINEE GUIDA AIOM 2007).

Le neoplasie epiteliali sono stadiate secondo la classificazione FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics). La stadiazione è di tipo patologico cosicché l'intervento chirurgico è funzionale sia alla diagnosi che alla stadiazione del carcinoma ovarico poiché consente di valutare con precisione ed accuratezza l'estensione anatomica della malattia.

Il fatto che il carcinoma ovarico non dia segni di sé fino a quando non ha raggiunto dimensioni notevoli influenza pesantemente l'esito della terapia. Negli stadi iniziali, cioè quando la neoplasia è confinata ad un ovaio o anche a tutti e due, il risultato di una terapia adeguata è soddisfacente. Secondo il rapporto annuale 2006 della

FIGO quando il tumore viene individuato negli stadi iniziali (stadio I e II) la sopravvivenza a 5 anni è pari al 85-90%, mentre scende al 15-20% quando viene rivelato negli stadi avanzati (stadio III e IV) (www.AIRC.it).

Le donne colpite da cancro dell'ovaio vengono sottoposte ad intervento chirurgico la cui entità varia secondo lo stadio della malattia. Inizialmente la chirurgia è usata per confermare la diagnosi, per la stadiazione del tumore ovarico e per rimuoverlo più radicalmente possibile (citoriduzione chirurgica primaria). La definizione di chirurgia citroriduttiva ottimale è stata cambiata diverse volte negli ultimi venti anni, oggi è considerata ottimale quando il residuo tumorale post-chirurgico risulta inferiore ad 1 cm. Diverse analisi retrospettive hanno dimostrato che la quantità di residuo è direttamente correlata alla prognosi. La stadiazione chirurgica del tumore dell'ovaio comprende l'esecuzione dell'esame citologico sull'ascite o sul liquido di lavaggio peritoneale (6).

In un secondo tempo e successivamente all'inizio del trattamento chemioterapico, la terapia chirurgica può essere riutilizzata nelle pazienti in cui la chirurgia citroriduttiva primaria non era stata ottimale (chirurgia di intervallo).

La chemioterapia a base di platino è la terapia adiuvante standard per i tumori ovarici ad alto rischio, in stadio precoce ed avanzato. È ancora in corso di studio la chemioterapia intra-peritoneale, che sembra essere una via promettente per la somministrazione di dosi elevate di chemioterapici, poiché il tumore ovarico rimane confinato alla cavità addominale per gran parte della sua storia naturale.

La radioterapia non viene quasi mai impiegata nella terapia del carcinoma ovarico se non a scopo palliativo (trattamento di II linea dopo il fallimento della terapia precedente) su alcune sedi metastatiche. Trial randomizzati hanno infatti dimostrato che la radioterapia e la chemioterapia sono di eguale efficacia, ma gli effetti collaterali della radioterapia sono molto maggiori. Per questo la chemioterapia adiuvante viene generalmente preferita, rispetto alla radioterapia, per una minor tossicità gastro-intestinale (6).

Nonostante la terapia combinata, oltre il 50% di tutte le pazienti vanno incontro a ricadute. Una paziente con recidiva di tumore ovarico è trattata considerando attentamente l'intervallo libero da malattia dopo il trattamento di prima linea, il volume di malattia, la presenza di singole o multiple sedi di malattia, la presenza di sintomi, lo stato di salute complessivo e le eventuali tossicità da pregressa chemioterapia (neurotossicità, insufficienza renale). Viene inoltre valutato quali siano i tempi ottimali di inizio di un trattamento di II linea dopo il fallimento della terapia precedente. Un trattamento troppo precoce espone la paziente ad una tossicità deleteria per la qualità di vita, mentre un trattamento iniziato troppo tardi può ridurre sia la possibilità di risposta che la tollerabilità della paziente al trattamento stesso.

Sulla base dell'intervallo libero da malattia dopo il trattamento chemioterapico di I linea è possibile suddividere le pazienti con recidiva di tumore ovarico in due categorie: 1) pazienti che presentano recidiva di malattia entro 6 mesi dal termine del primo trattamento o non responsive alla terapia con platino di prima linea. Tali pazienti hanno una malattia cosiddetta "platino resistente" e dimostrano una scarsa probabilità di risposte alla chemioterapia in genere, anche se questa può migliorare la qualità della vita e la sopravvivenza. Attualmente non esiste uno standard accettato per il trattamento di queste pazienti e la prognosi risulta invariabilmente infausta. La sopravvivenza libera da progressione, nonostante l'impiego di nuovi farmaci, è di 3,6 mesi mentre la sopravvivenza globale è di 9,5 mesi. 2) pazienti con intervallo libero da malattia maggiore di 6 mesi, che al contrario hanno un'elevata probabilità di rispondere ad un nuovo trattamento con platino (malattia "platino sensibile") o ad altri agenti chemioterapici.

Riassumendo, la progressione celata all'interno della cavità peritoneale del carcinoma ovarico, che non dà segni di sé fino a quando non ha raggiunto dimensioni notevoli, risulta in una diagnosi tardiva che influenza pesantemente l'esito delle cure.

La combinazione di chirurgia e chemioterapia costituisce il protocollo terapeutico standard nelle pazienti con carcinoma ovarico. Tuttavia, sebbene tale trattamento

sia efficace nel ridurre la massa tumorale nella maggioranza delle pazienti, la sopravvivenza a lungo termine rimane scarsa (7) e la maggior parte delle pazienti va incontro a ricadute dopo il trattamento iniziale. Tutto ciò rende necessarie ulteriori ricerche per trovare nuove possibilità terapeutiche che permettano di ridurre le ricadute e migliorare conseguentemente l'esito terapeutico. Potenziali terapie in corso di studio includono la terapia genica, l'utilizzo di inibitori della trasduzione del segnale, molecole antiangiogenetiche e l'immunoterapia (8).

In particolar modo, i continui progressi in campo immunologico rendono l'immunoterapia una strategia promettente nella cura del tumore ovarico. Per la sua origine da un organo "non essenziale" e per il confinamento della massa tumorale all'interno del peritoneo per la maggior parte della sua storia naturale, il carcinoma ovarico rappresenta un bersaglio adatto all'immunoterapia ed in particolare le pazienti in remissione con una malattia residua minima sembrano essere le candidate ideali.

L'approccio immunoterapico per il carcinoma ovarico include: la terapia con citochine locoregionale e sistemica, i vaccini profilattici e terapeutici, l'utilizzo di anticorpi monoclonali e coniugati anticorpali.

I maggiori ostacoli che devono essere superati per poter sviluppare una strategia immunitaria di successo riguardano l'identificazione di target immunogenici ristretti al tumore, la generazione di una risposta immunitaria che sia sufficiente a causare la regressione del tumore e approcci per superare l'evasione dell'attacco immunitario da parte del tumore, nonché una precisa comprensione delle caratteristiche immunitarie del microambiente peritoneale (9).

2.4 Immunoterapia dei tumori

Fino ad oggi la terapia dei tumori era affidata alla chirurgia, che cerca di eliminare la maggior parte della massa tumorale sviluppata e dei linfonodi che risultano coinvolti, e alla chemio- e radio-terapia, che agiscono sfruttando l'elevato grado di duplicazione delle cellule cancerose. Purtroppo entrambe non sempre riescono ad eliminare la malattia residua alla chirurgia e causano ancora molti effetti collaterali, soprattutto perché mancano di una reale specificità d'azione. A questo scopo negli ultimi anni gli sforzi maggiori della ricerca oncologica si sono concentrati nel migliorare il targeting tumorale, in particolare sfruttando le capacità del sistema immunitario.

2.4.1 Teoria dell'immunosorveglianza

Le cellule tumorali, durante la trasformazione neoplastica e nella fase proliferativa, possono essere riconosciute dalle difese dell'ospite come strutture non "self" pur essendo delle componenti cellulari proprie del nostro organismo. Questo principio è alla base di quella che viene definita la teoria dell'immunosorveglianza, inizialmente formulata da Paul Ehrlich agli inizi del 1900. Tale concetto è stato ripreso da Thomas 50 anni dopo e definitivamente affrontato da Burnet nel corso degli anni '70: quest'ultimo ipotizzò che i meccanismi di rigetto fossero deputati all'eliminazione delle cellule potenzialmente neoplastiche (10).

La teoria dell'immunosorveglianza stabilisce che le cellule del sistema immunitario forniscono una continua e ampia sorveglianza dell'intero organismo e sono in grado di eliminare quelle cellule che hanno subito la trasformazione tumorale (10).

2.4.2 Antigeni tumorali

Con il termine antigene s'intende una qualsiasi sostanza di natura organica che, all'interno dell'organismo, viene riconosciuta dal sistema immunitario dell'ospite (11). Nell'ambito oncologico un antigene viene considerato una molecola in grado di discriminare tra una cellula tumorale e quella da cui ha avuto origine, anche se non sempre è associato con una risposta del sistema immunitario. In particolare

possono essere classificati in due tipi: gli antigeni tumore specifici e gli antigeni tumore associati. I primi sono presenti solo sulle cellule tumorali mentre i secondi vengono espressi sia da cellule neoplastiche che da cellule normali (11).

Per avere un significato dal punto di vista diagnostico ed immunoterapico, l'antigene deve avere alcune caratteristiche importanti, ed in particolare deve essere altamente e/o selettivamente espresso dalle cellule tumorali, deve avere una conformazione ed una espressione stabile utili al corretto e continuo riconoscimento anticorpale, deve essere presente sulla maggior parte delle cellule tumorali e deve avere una probabile correlazione funzionale con la tumorigenesi (12).

Classificazione degli antigeni tumorali	
Proteine associate a virus	Derivate da: EBV HPV HBV HCV HTLV-I e altri
Antigeni tumore-associati	Espressi su tessuti normali e aumentati su tumori: HER-2/neu Tyrosinase MART e altri
Antigeni tumore-specifici	Proteine autologhe mutate: ras, p53 e altre epitopi autologhi mutati: gangliosidi e mucine
Livelli anormali di antigeni espressi solo durante lo sviluppo tumorale e in particolari tessuti come i testicoli	MAGE, PAGE e altri Antigeni oncofetali (CEA e FP)

Il CD20 è stato il primo antigene tumore associato che è stato utilizzato a fini terapeutici. È una fosfoproteina di membrana di 35 KDa che forma delle strutture

tetrameriche ed è presente nelle fasi di maturazione dei linfociti B, ad eccezione dei precursori precoci e delle plasmacellule (13, 14). L'antigene viene espresso in modo omogeneo sul 90-95% dei linfomi a cellule B ad una densità di 50.000-200.000 molecole per cellula tumorale. Il CD20 non viene internalizzato in seguito al legame da parte di anticorpi specifici e non viene rilasciato nello spazio extracellulare (15). Agire in maniera specifica contro questo bersaglio permetterebbe di eliminare la maggior parte delle cellule B (comprese quelle tumorali), preservando i precursori necessari alla corretta ripopolazione dei linfociti B; a questo scopo è stato sviluppato Rituximab, un anticorpo monoclonale chimerico in grado di legare in maniera molto specifica il CD20 ed attivare il sistema immunitario. Il Rituximab è stato il primo (1997) anticorpo monoclonale approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per uso clinico a scopo terapeutico ed è già stato somministrato ad oltre 100.000 pazienti (15).

Un'altra proteina classificata come antigene associato a tumore è il CD52, una glicoproteina di 21-28 KDa panleucocitaria, abbondantemente espressa in particolar modo sulla membrana di linfociti e monociti (normali e neoplastici); viene riconosciuta dall' Alemtuzumab (Campath-1H), un anticorpo umanizzato approvato nel 2001 dalla FDA per il trattamento della leucemia linfocitica cronica (16).

Nel caso del carcinoma ovarico, sono importanti gli antigeni CA125 (Cancer Antigen 125), MUC1 (Human Mucin 1, episialina) e il recettore per il folato (FR). CA125 è una glicoproteina prodotta dall'epitelio sieroso che viene anche rilasciata in circolo: rappresenta il marcatore del carcinoma ovarico meglio studiato dal momento che viene espresso da diverse linee cellulari cancerose (17). MUC1 è una mucina epiteliale polimorfica legata alle membrane che viene espressa sulla superficie luminale dell'epitelio ghiandolare ed è altamente espressa in forma deglicosilata nei carcinomi e nelle lesioni metastatiche (18).

Altra importante proteina particolarmente studiata negli ultimi anni è il recettore per il folato. L'acido folico è una complessa molecola vitaminica costituita da acido pterico e da una o più molecole di acido glutammico; viene assunto dal nostro

organismo solamente in forma di acido pteroilmonoglutammico (19) e l'ingresso dei folati nella cellula è regolato da specifici recettori di membrana detti RFC1 (Reduced Folate Carrier) e FR (Folate Receptors). Mentre i primi consentono l'internalizzazione reversibile del folato attraverso la membrana, i secondi, presenti sulla superficie cellulare, mediano il trasporto unidirezionale della vitamina dall'esterno all'interno della cellula (20). Il FR è una glicoproteina di 38-39 KDa che trasporta il folato grazie alla formazione di vescicole di endocitosi nel punto in cui si verifica l'interazione tra l'acido folico e il suo recettore. In un secondo momento, il legame recettore-folato si rompe e il recettore ritorna così sulla membrana plasmatica e la molecola vitaminica si dirige verso i mitocondri. A livello mitocondriale, il folato viene nuovamente trasformato nel derivato poligluttammico ed è solo in questa forma che può essere trattenuto all'interno della cellula (21). Sono note tre isoforme del FR: la prima di queste è la FR- α che viene espressa a bassissimi livelli sulla superficie di tessuti epiteliali normali (epitelio dell'ovidotto), a livello medio in rene (tubuli prossimali e distali), polmone e mammella e ad alti livelli nei tessuti placentari (21). Nel 90% dei carcinomi ovarici si evidenzia un'iperespressione del FR- α e questo fatto è dovuto alle necessità delle cellule neoplastiche di avere a disposizione una quantità maggiore di materiale nucleotidico rispetto ad una cellula normale (22). Un importante derivato dell'acido folico, chiamato N10 formil FH4, è infatti estremamente importante nella sintesi dell'anello purinico delle basi azotate (19). E' quindi ragionevole interpretare l'iperespressione di FR da parte delle cellule tumorali come un tentativo delle stesse di avere a disposizione più materiale nucleotidico per far fronte ad una intensa attività proliferativa (20).

L'isoforma β del FR presenta una più bassa affinità per i folati rispetto all'isoforma α e viene espressa in quantità da basse a moderate nei tessuti normali e neoplastici di origine non epiteliale. È stato proposto che l'isoforma beta sia la forma fetale della proteina mentre l'isoforma alfa sia quella espressa nei tessuti dell'adulto (21).

Esiste infine l'isoforma γ del FR, la quale risulta essere una proteina secreta in quanto non possiede il sito di legame per l'ancora GPI presente, invece, nelle altre due isoforme. Questa proteina sembra essere espressa specificatamente a livello dei tessuti emopoietici quali milza e midollo osseo (23, 24).

FR- α è stato considerato come antigene associato al carcinoma ovarico ed è quindi stato utilizzato come bersaglio per l'immunoterapia di questo tumore. Dal momento che il livello di espressione di questa proteina di membrana nelle cellule tumorali (circa 1 milione di unità per cellula) è da 10 a 100 volte superiore rispetto alle cellule da cui deriva (25), va sottolineato il fatto che la possibilità di innesco di reazioni indesiderate verso cellule normali è conseguentemente ridotto al minimo. Inoltre nei tessuti non tumorali il FR- α ha una distribuzione confinata alla superficie apicale delle cellule mentre nei carcinomi ovarici è distribuito su tutta la superficie cellulare. Altra importante caratteristica è che il FR- α non viene internalizzato dopo legame con anticorpi specifici (22).

Un altro importante esempio di antigene tumore associato, soprattutto per la sua importanza a livello clinico è HER-2, un recettore tirosin-chinasico transmembrana la cui espressione è aumentata in circa il 30% dei tumori della mammella e risulta alterata anche in altre neoplasie come ad esempio gli adenocarcinomi dell'ovaio, della prostata, del polmone e del tratto gastrointestinale. Viene riconosciuto dall'anticorpo monoclonale umanizzato Trastuzumab approvato dalla FDA nel 1998 per il trattamento di alcune forme del carcinoma alla mammella (26).

Esempi di anticorpi monoclonali terapeutici

Target	Nome	Meccanismo d'azione	Ditta
Ab anti-idiotipo, mimetico del ganglioside GD3	BEC2 (mitumomab)	Vaccino che mima il glicopeptide GD3	ImClone System, MERK KGaA
Ab anti-idiotipo, mimetico del CEA	CeaVac	Stimola la risposta immune al CEA	Titan Pharmaceuticals
CA125	Ovarex	Induce una risposta immune al CA125	Altarex
CD20	Rituxan (Rituximab)	CDC and ADCC	IDEC Pharmaceuticals, Genentech
CD20	Zevalin (Ibritumomab tituxetan)	Radio-immunoterapia	IDEC Pharmaceuticals
CD20	Tositumomab (Bexxar)	Radio-immunoterapia e risposta immune	Corixa, Titan Pharmaceuticals, GlaxoSmith-Kline
CD22	Epratuzumab (LymphoCide)	Internalizzazione e fosforilazione dell'Ag	Immunomedics
CD33	Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin)	Chemio-immunoterapia	Wyeth Laboratories/AHP
CD33	Zamyl	Immune response	Protein Design Laboratories
CD52	Campath (alemtuzumab)	CDC and ADCC	Millennium, BTG; ILEX Oncology; Hoffman-LaRoche
EpCam	Panorex (edrecolomab)	mAb murino bloccante EpCam	GlaxoSmith-Kline, Centocor
Erb1/EGFR	Erbix (certuximab, IMC225)	Lega e blocca EGFR	ImClone Systems, Merck KGaA
ErbB1/EGFR	EMD72000 (matuzumab)	Lega e blocca EGFR	Merck KGaA
ErbB1/EGFR	ABX-EGF (panitumumab)	Lega e blocca EGFR	Abenix
ErbB2/Her2/neu	Herceptin (Trastuzumab)	Blocca EGF legandosi a Her2	Genentech
ErbB2/Her2/neu X CD64 (FcγRI)	MDX-210	Ab bispecifico che induce una risposta immune	Medarex, Immuno Dsigned Molecules
HMFG	TriAb	Risposta immune	Titan Pharmaceuticals
IL-2 receptor, CD25	Daclizumab (Zenapax)	Blocca l'attivazione del recettore dell' IL-2	Protein Design Labs, Hoffman-LaRoche
PEM	Theragyn (pentumomab)	ADCC	Antisoma
VEGF	Avastin (bevacizumab)	Inibitore dell'angiogenesi	Genentech BioOncology

Questi sono solo alcuni esempi delle molecole che si sono dimostrate in grado di caratterizzare alcuni tipi di cellule tumorali ma la lista è in continuo aumento, soprattutto considerando i risultati dei nuovi approcci della ricerca che riescono a confrontare in maniera sempre più precisa i tessuti tumorali e quelli sani da cui derivano.

2.4.3 Anticorpi e loro bersaglio

Il linfocita B maturo lascia il sito della sua sintesi (midollo osseo) esprimendo immunoglobuline di membrana (IgM e IgA) che hanno una singola specificità antigenica. Questi linfociti B vergini che non hanno mai incontrato l'antigene circolano nel sangue e nella linfa e sono trasportati negli organi linfatici secondari. Quando un linfocita B è attivato dall'antigene specifico per il suo anticorpo di membrana, prolifera (espansione clonale) e si differenzia generando una popolazione di plasmacellule secernenti anticorpi e una di linfociti B memoria (1).

Gli anticorpi, o immunoglobuline, sono delle glicoproteine tetrameriche costituite da due catene pesanti (H) di circa 440 aminoacidi e da due catene leggere (L) di 220 aminoacidi, uguali a due a due. Catene pesanti e leggere sono tenute insieme da ponti disolfuro intercatenari e sono costituite da una porzione variabile (V, che presenta la regione determinante la complementarità specifica per il legame con l'antigene) e da una porzione costante (C). Catene leggere e pesanti sono costituite da domini ciascuno dei quali è formato da 110 aminoacidi; abbiamo 2 domini nella catena L e 4 domini nella catena H (nella catena pesante delle IgM e delle IgE ne è presente uno in più). Nell'uomo esistono 5 classi di immunoglobuline: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Le IgG sono la classe immunoglobulinica più abbondante nel siero e rappresentano circa l'80% delle immunoglobuline sieriche totali. Nell'uomo sono presenti 4 sottoclassi di IgG distinte in base a differenze presenti nella sequenza della catena pesante (g per le IgG) e numerate sulla base della concentrazione media decrescente nel siero: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Le IgM possono essere sia monomeriche (espresse a livello dei linfociti B) che pentameriche (a livello sierico) e rappresentano il 5-10% delle

immunoglobuline del siero. Le IgA rappresentano solo il 10-15% delle immunoglobuline del siero ma sono la classe di anticorpi predominante nelle secrezioni esterne come il latte, la saliva e le lacrime. Le IgE mediano le reazioni di ipersensibilità immediata che producono i sintomi di febbre da fieno, asma e shock anafilattico. Le IgD, infine, rappresentano solo lo 0,2% delle immunoglobuline sieriche e, insieme alle IgM, costituiscono le immunoglobuline di membrana dei linfociti B. Si ritiene che abbiano un ruolo chiave nell'attivazione del linfocita da parte dell'antigene. Le molecole anticorpali vengono funzionalmente divise in due frammenti: Fab (frammenti di legame all'antigene costituiti dalle porzioni VLCL accoppiate a quelle VHCH) connessi da una regione flessibile (cerniera) al frammento Fc (costituito dai domini CH2-CH3 o CH2-CH4) mediatore delle funzioni effettrici degli anticorpi (1).

La maggior parte degli antigeni presentano più epitopi (chiamati anche determinanti antigenici), che sono le regioni immunologicamente attive di un antigene, le regioni che effettivamente legano gli anticorpi. Per questo motivo le molecole antigeniche inducono la proliferazione e la differenziazione di più cloni di cellule B, ciascuno derivato da un linfocita B le cui immunoglobuline riconoscono un particolare epitopo. Da questa risposta deriva una produzione eterogenea di anticorpi sierici che vengono definiti anticorpi policlonali (1).

Estremamente importanti in un contesto di immunoterapia antitumorale sono gli anticorpi monoclonali che possono venire creati in laboratorio dalla fusione tra cellule spleniche di topo con cellule mielomatose umane; cellule B immortali producono immunoglobuline che riconoscono tutte lo stesso epitopo sull'antigene (1).

L'efficacia dell'utilizzo di anticorpi murini nell'uomo è notevolmente influenzata dal fatto che essi possono, per loro natura, indurre una significativa risposta immunitaria che porta ad una rapida eliminazione delle strutture anticorpali usate; tutto questo causa anche una drastica diminuzione degli effetti terapeutici. Per risolvere questo problema si sono creati, grazie alla tecnologia del DNA ricombinante, gli anticorpi monoclonali chimerici (es. Rituximab) che sono formati

dalla regione Fc di una IgG1 umana e dalla porzione variabile delle catene leggere e pesanti murina. Quest'ultime però sono ancora in grado di indurre una risposta immunitaria e per questo motivo sono stati prodotti gli anticorpi umanizzati (es. Campath) che, contrariamente ai precedenti, sono quasi completamente umani, ad eccezione per la regione determinante la complementarità (CDR) che rimane murina. Si è visto però che anche utilizzando cronicamente queste molecole si ha una risposta immunitaria; è possibile creare in laboratorio degli anticorpi monoclonali completamente umani che non inducono risposte immunitarie ma che solo negli ultimi anni stanno entrando nella pratica clinica (1), prodotti da topi transgenici in cui il locus delle immunoglobuline è stato inattivato e sostituito da quello delle immunoglobuline umane oppure costruendo in laboratorio anticorpi isolati da librerie fagiche anticorpali.

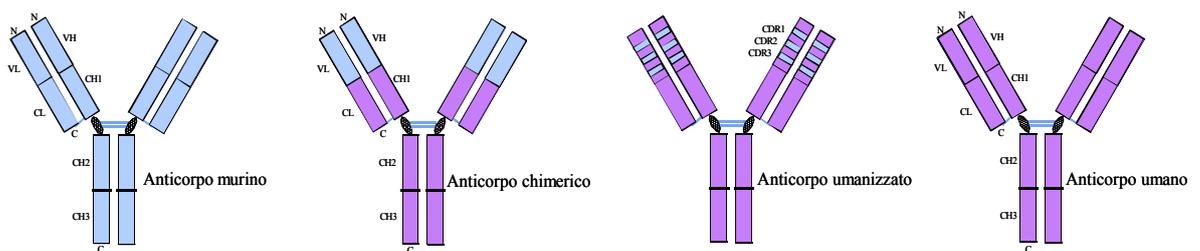


Figura 2.1 Rappresentazione schematica della struttura degli anticorpi monoclonali murini (azzurro), chimerici (VH e VL in azzurro), umanizzati (CDR in azzurro) e umani (viola).

2.4.4 Anticorpi ricombinanti da librerie fagiche

Il phage display, ossia l'esposizione di polipeptidi sulla superficie di fagi filamentosi, permette di creare ampi repertori di ligandi da cui selezionare le proteine con le caratteristiche desiderate; i polipeptidi vengono espressi come prodotti di fusione delle proteine di superficie del capsido dei fagi.

La tecnologia del phage display ha un importante campo d'applicazione nella produzione di anticorpi ricombinanti monoclonali. Il più piccolo frammento anticorpale specifico per l'antigene che è stato clonato ed esposto sui fagi è composto solamente dalle regioni VL e VH (Fv) (figura 1.2).

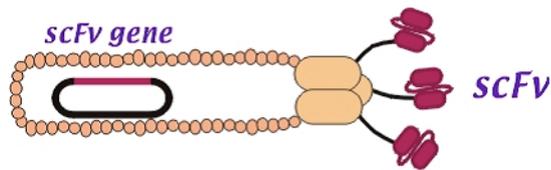


Figura 2.2 Rappresentazione schematica di un fago che espone sulla superficie molecole di scFv.

La versione ricombinante Fv viene detta frammento variabile a singola catena (scFv), in cui le due regioni variabili sono connesse artificialmente da una catena peptidica flessibile ('linker') costituita da circa 15 molecole di glicina (vedi figure 2.2, 2.3 e 2.4).

2.4.4.1 *Struttura di un fago e vettori di clonazione*

I fagi filamentosi possiedono un DNA a singolo filamento circolare che codifica per dieci proteine implicate nella replicazione, morfogenesi e formazione del capsido virale.

Il capsido è formato da cinque proteine diverse: la g8p, che è la più abbondante e interagisce con il DNA virale, la g3p, che ha la funzione di riconoscere il pilus batterico durante il processo infettivo, la g6p, che connette la struttura formata dalla g8p con la proteina g3p, e la g7p e la g9p, presenti alle estremità e necessarie per il corretto assemblaggio del capsido attorno al DNA (27, 28).

Il fago infetta la cellula batterica attraverso il pilus, dopodiché gli enzimi batterici provvedono alla replicazione e traduzione del genoma virale e producono tutte le proteine necessarie alla sintesi di nuove particelle virali. Durante il ciclo vitale di un batterio possono essere prodotte fino a 100-300 particelle fagiche.

Le librerie fagiche sono costituite da fagi di fusione, ossia fagi nel cui genoma è stato inserito il gene della proteina estranea che viene quindi espressa come prodotto di fusione con una delle proteine del capsido. Normalmente il gene viene inserito all'estremità 5' del gene codificante per la g8p, se la proteina non ha eccessivo ingombro sterico, mentre, se la proteina estranea interferisce con

l'assemblaggio del capsido stesso, allora verrà inserita all'estremità 5' del gene della g3p.

I batteriofagi possono essere quindi utilizzati come vettori di clonazione; si possono distinguere due tipi di vettori: fagici e fagmidici.

Come già detto in precedenza, nei vettori fagici il gene della proteina da clonare viene inserito all'estremità 5' del gene della g3p. In questo caso, tuttavia, la proteina di fusione risultante può causare una riduzione dell'infettività in quanto la proteina g3p riconosce l'estremità del pilus batterico. Inoltre, inserzioni di DNA di elevate dimensioni possono dar luogo a fenomeni di ricombinazione genica. Per superare questi problemi sono stati sviluppati i vettori fagmidici, plasmidi che contengono, oltre all'origine di replicazione fagica e altri elementi necessari per la sintesi del DNA fagico e per il suo incapsidamento, anche un'origine di replicazione non fagica, una resistenza ad un antibiotico e il DNA della proteina di fusione sotto il controllo di un promotore inducibile. Usando il vettore fagmidico, per costruire particelle fagiche mature in grado di infettare altri batteri, è necessario l'apporto di un fago coadiutore (helper) che porti l'informazione per tutte le proteine necessarie e non codificate dal fagmide. Un'altra caratteristica fondamentale del vettore fagmidico è data dalla possibilità di ottenere la proteina clonata in forma solubile. Questo viene ottenuto inserendo una mutazione amber, corrispondente ad un codone di stop, tra il gene clonato ed il gene virale. In condizioni normali, la mutazione viene soppressa utilizzando batteri ospiti come il ceppo di *Escherichia Coli* DH5 α F' che sintetizza un tRNA che riconosce la mutazione e porta alla formazione della proteina di fusione. Quando invece si utilizzano ceppi come l'HB2151, la mutazione causa l'interruzione della sintesi proteica e la proteina clonata viene secreta nel periplasma batterico.

2.4.4.2 Produzione e selezione delle librerie anticorpali

Una libreria di scFv viene prodotta generalmente a partire da mRNA isolato da linfociti B umani del sangue periferico. I geni che codificano per le catene leggere e pesanti dell'anticorpo vengono amplificati mediante RT-PCR, utilizzando oligonucleotidi specifici, e successivamente assemblati in maniera casuale in un singolo gene (VH-linker-VL). Il frammento di DNA, corrispondente all'informazione per un scFv, viene inserito in un vettore fagmidico ed introdotto mediante elettroporazione in *Escherichia coli*.

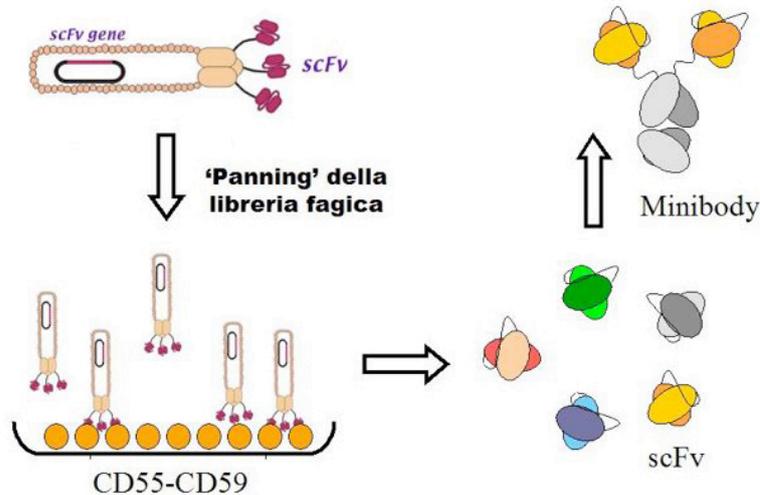


Figura 2.3 Schema di isolamento e produzione di un minibody.

La caratteristica più importante di una libreria è la sua variabilità, ossia la possibilità di creare un numero di anticorpi diversi il più elevato possibile. Il tipo di libreria usata quindi dipenderà dai linfociti di partenza da cui verranno amplificate le catene pesanti e leggere. Si potranno avere librerie umane oppure no, a seconda della provenienza; librerie dedicate o "naive", a seconda che ci sia stata o meno una risposta immunitaria specifica prima dell'isolamento dei linfociti di partenza, nel qual caso si potranno ottenere scFv con maggiore affinità verso un determinato antigene. In tutti questi casi, comunque, si utilizzano linfociti che hanno superato la selezione timica nell'organismo di provenienza; questo implica il fatto che difficilmente si potranno ottenere scFv verso epitopi "self". La libreria che abbiamo utilizzato invece (29) è caratterizzata dal possedere una variabilità molto elevata,

ottenuta sfruttando una ricombinazione *in vitro*, e questo potrebbe permettere di trovare con maggiore facilità scFv diretti contro siti conservati.

L'esposizione dei frammenti di anticorpo sulla superficie del fago permette di effettuare un processo di selezione chiamato "panning": in questo processo i fagi vengono messi in contatto con la molecola bersaglio immobilizzata su un supporto. I fagi che espongono un scFv in grado di interagire con la molecola restano legati al supporto, mentre gli altri vengono lavati via. La frazione dei fagi legati viene eluita, utilizzata per infettare *E. coli* (DH5 α F') ed amplificata prima di un successivo ciclo di selezione; i cicli di selezione di solito sono almeno tre e servono ad arricchire la libreria con i cloni specifici più affini.

Questa tecnologia ha il vantaggio di accoppiare direttamente il fenotipo al genotipo incapsulato (figura 1.2). Infatti, dopo aver selezionato un scFv reattivo, agendo sul DNA codificante, si potranno ottimizzare le caratteristiche delle molecole prodotte, migliorandone affinità, valenza, dimensioni e funzioni effettrici (30).

2.4.4.3 *Modifica dei scfv*

Le limitate dimensioni dei scFv (circa 25KDa) permettono la loro efficace penetrazione all'interno di tessuti ed organi, ma anche una rapida "clearance" renale; inoltre, essendo monovalenti, sono dotati di bassa avidità. Attraverso modificazioni alla loro sequenza, i scFv possono essere dimerizzati o polimerizzati, formando costrutti multivalenti con maggiore avidità di legame (31).

Si può inoltre intervenire migliorando le funzioni effettrici degli anticorpi, fondendo la sequenza degli scFv a parte di quella dell'Fc di un'immunoglobulina, e formando in questo modo i cosiddetti minibody (o miniantibody); al fine di potenziare l'efficacia terapeutica è possibile inoltre sceglierne l'isotipo appropriato. La maggior parte degli attuali anticorpi chimerici o umanizzati in uso presentano la regione Fc dell'IgG1, attiva nel mediare fagocitosi, ADCC e attivazione del complemento (32). Nella fusione di un scFv all'Fc è necessario inserire anche la regione cerniera che permetta la formazione dei ponti disolfuro tra due minibody e che faccia sì

che la flessibilità della molecola garantisca la corretta presentazione del dominio CH2 in modo da permettere le funzioni effettrici indotte dall'Fc *in vivo* (31).

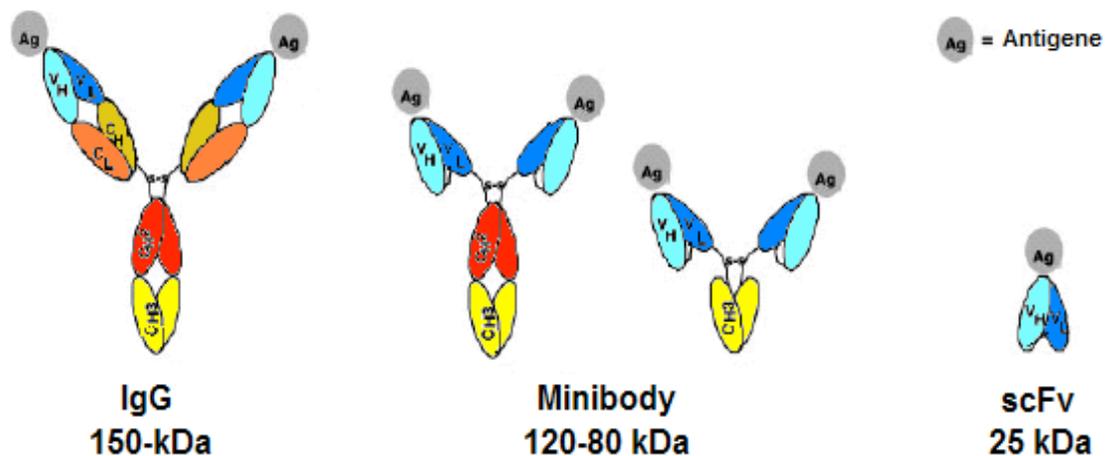


Figura 2.4 Rappresentazione schematica di una molecola di IgG e di molecole anticorpali ingegnerizzate derivate da diversi domini immunoglobulinici (figura modificata da (33)).

Molti studi hanno anche caratterizzato anticorpi bispecifici; in particolare, nel trattamento dei tumori, si sono sfruttati scFv capaci di legare un antigene sulla superficie della cellula tumorale e una molecola capace di stimolare l'attività della cellula effettrice (per esempio: recettori delle cellule T come TCR, CD3 e CD28; recettori FcγRI e FcγRIII su cellule NK o fagociti) (34, 35). Altri esempi di modifiche della sequenza degli scFv sono il legame a tossine, utile per il loro “targeting”, o il legame a biotina, che permette poi di sfruttare l'elevata affinità del legame avidina-biotina per un “targeting” indiretto.

2.4.4.4 Limiti degli anticorpi

Generalmente per avere una buona dose di anticorpo (o derivato ingegnerizzato) è necessario bilanciare la rapida rimozione della molecola dal sangue con il profilo di biodistribuzione. Questo bilancio è correlato principalmente alle dimensioni: un intervallo di 60-120 kDa viene considerato un buon compromesso e comprende, per esempio, scFv-Hinge-CH2-CH3 e la sua forma dimerica, oltre alle modifiche specifiche apportate alla molecola. A parità d'azione, molecole delete di CH1 e

CL mostrano una prolungata emivita plasmatica, mentre delezioni del CH2 la diminuiscono (31, 36).

Il legame degli anticorpi a proteine in circolo è sicuramente un fattore che ne aumenta l'emivita plasmatica limitandone l'eliminazione. Il blocco di una proteina in circolo però non sempre si traduce anche nell'azione a livello locale, dove la proteina di interesse può essere prodotta da cellule residenti; in questo caso, il legame preferenziale alle molecole in circolo può risultare controproducente per la riuscita del trattamento *in vivo* in quanto la proteina plasmatica tamponerà la diffusione dell'anticorpi nei diversi tessuti.

2.4.5 Meccanismi d'azione degli anticorpi antitumorali

Gli anticorpi monoclonali e i loro derivati ingegnerizzati ottengono il loro effetto terapeutico con diversi meccanismi d'azione. Prima di tutto vanno distinte due forme di anticorpi terapeutici: anticorpi coniugati e anticorpi non coniugati.

Gli anticorpi coniugati vengono resi citotossici mediante il legame covalente con radioisotopi (utilizzati in radioimmunoterapia), tossine batteriche e tossine vegetali e hanno essenzialmente la funzione di veicolare, in maniera molto specifica, il farmaco in sede tumorale; in pratica viene utilizzata principalmente la sua parte variabile che fornisce il legame con l'antigene tumore associato.

I meccanismi d'azione indotti agli anticorpi non coniugati sono invece generalmente connessi all'abilità dell'anticorpo, una volta riconosciuto e legato l'antigene sulla membrana delle cellule cancerose, di reclutare meccanismi effettori naturali che portano alla morte delle cellule tumorali quali la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, la fagocitosi indotta da anticorpi, l'apoptosi e meccanismi legati al sistema del complemento.

2.4.5.1 Citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC)

Un primo meccanismo attraverso cui gli anticorpi promuovono la lisi delle cellule tumorali è l'ADCC, mediata dall'interazione della porzione Fc dell'anticorpo (a sua volta legato all'antigene della cellula bersaglio) con i recettori per Fc (FcR) espressi

su un'ampia varietà di cellule. L'ADCC è stata studiata maggiormente per le cellule NK, le quali hanno la capacità di uccidere le cellule tumorali senza fagocitosi o coinvolgimento di molecole MHC. Le NK identificano i loro bersagli attraverso FcγRIII, un recettore a bassa affinità che permette di riconoscere qualsiasi cellula ricoperta da immunoglobuline. In seguito al riconoscimento del bersaglio, le NK rilasciano nello spazio circostante il contenuto dei loro granuli citoplasmatici, costituito da perforine e granzimi. Le perforine sono proteine in grado di polimerizzare e formare pori sulla membrana della cellula, determinandone la lisi; i granzimi attivano invece dei meccanismi che producono dei segni tipici della morte cellulare programmata (figura 2.5).

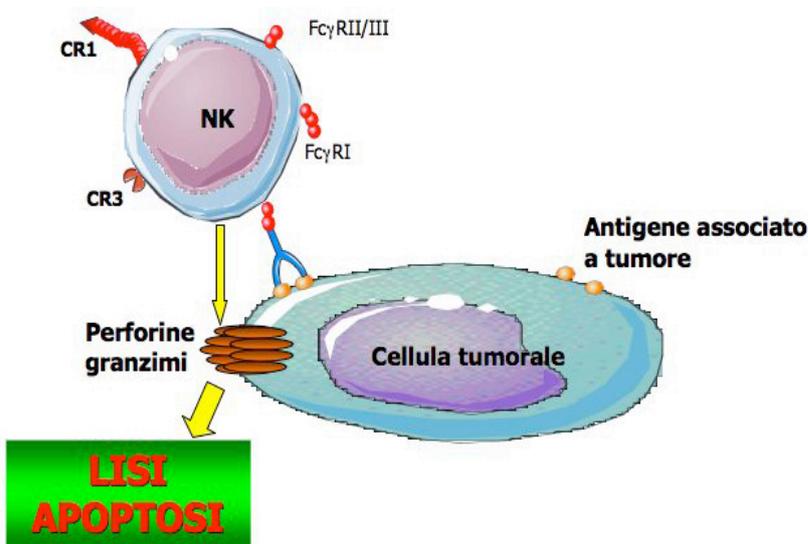


Figura 2.5. Citotossicità cellulare anticorpo dipendente (ADCC). Attraverso il recettore FcγRIII le cellule NK riconoscono gli anticorpi diretti verso antigeni tumorali e lisano la cellula bersaglio mediante la secrezione di varie molecole quali enzimi litici, perforina, granzimi.

Altri possibili tipi cellulari in grado di agire via ADCC possono essere mastcellule, basofili e macrofagi (con rilascio di enzimi litici, metaboliti dell'ossigeno e dell'azoto).

2.4.5.2 Fagocitosi

La fagocitosi indotta da anticorpi (talvolta denominata ADCP, Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis) consiste nell'internalizzazione della cellula tumorale. L'adesione tra le due cellule coinvolte viene promossa dalle molecole di anticorpo presenti sulla superficie della cellula tumorale che vengono riconosciute

dai recettori per il frammento Fc presenti su macrofagi e leucociti polimorfonucleati. Dopo l'adesione, la cellula tumorale viene fagocitata e degradata dagli enzimi lisosomiali (figura 2.6).

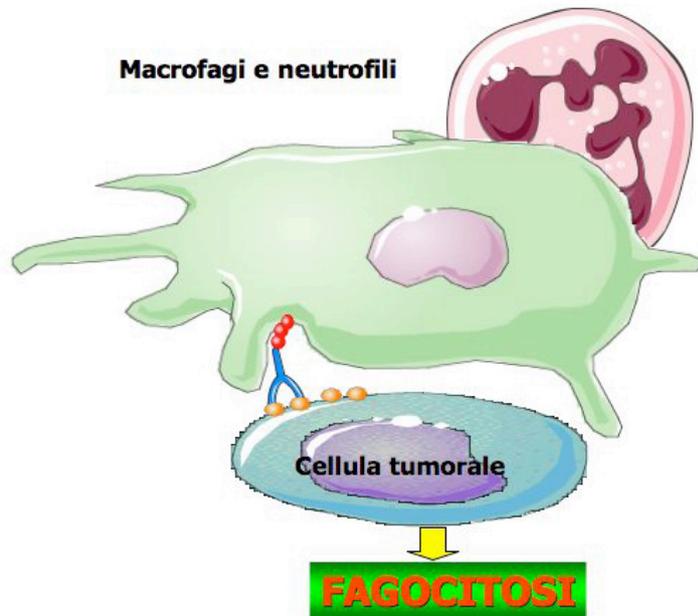


Figura 2.6 Fagocitosi mediata da anticorpi. Le cellule fagocitiche esprimono, analogamente alle cellule NK, recettori per Fc in grado di legarsi agli anticorpi adesi alle cellule tumorali. L'attività tumoricida è mediata dall'internalizzazione della cellula tumorale e dalla sua degradazione mediante attività lisosomiale.

2.4.5.3 Apoptosi

Gli anticorpi monoclonali terapeutici possono determinare la morte cellulare tramite l'induzione dell'apoptosi. L'apoptosi, ovvero la morte cellulare programmata, è mediata dai linfociti T citotossici attivati che possono rilasciare fattori come il TNF- α o esprimere sulla loro superficie il ligando FAS, che legandosi al CD95, espresso a livello della cellula tumorale,

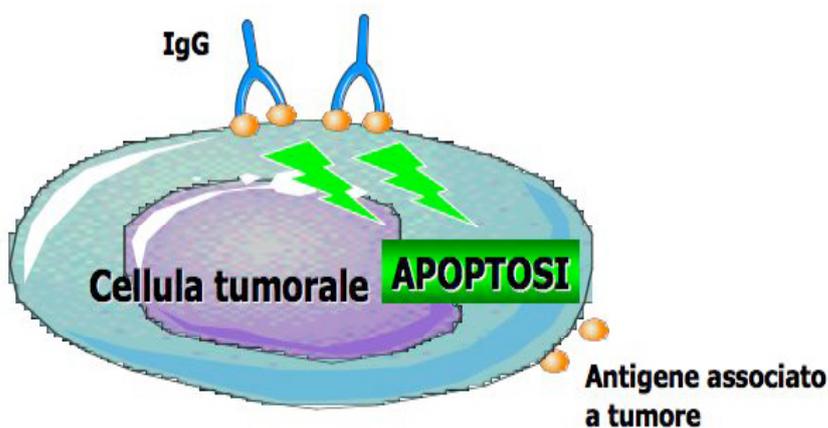


Figura 2.7 Apoptosi indotta da anticorpi. Il legame all'antigene associato al tumore può attivare quest'ultimo ed innescare le reazioni che portano alla morte cellulare programmata.

ne induce l'oligomerizzazione. In entrambi i casi la conseguenza è l'attivazione di enzimi proteolitici detti caspasi che scatenano la morte cellulare tagliando proteine specifiche nel citosol e nel nucleo.

Un ruolo particolare nell'induzione dell'apoptosi è svolto dal complesso di attacco alla membrana C5b-9, rilevato soprattutto in processi infiammatori. È stato osservato che sia dosi sublitiche di C5b-9 che l'iTCC (inactive terminal complement complex ovvero MAC formatosi in soluzione non in grado di portare alla lisi) hanno effetto apoptotico, dovuto probabilmente a diverse vie di attivazione delle caspasi (Figura 2.7).

2.4.5.4 *Il sistema del complemento*

Il complemento (C) è il principale effettore della branca umorale del sistema immunitario innato; esplica una serie di funzioni il cui obiettivo finale è quello di proteggere l'organismo attraverso la rimozione degli agenti patogeni, facilitando la loro eliminazione e il loro controllo da parte di altri sistemi biologici cellulari o sierici.

La funzione più nota del C è quella della citolisi della cellula bersaglio, che si attua sostanzialmente attraverso la costituzione del Complesso Terminale di Attacco alla Membrana (MAC), un complesso di diverse molecole che costituisce un poro transmembrana e causa la morte per lisi. A fianco a questo, altri meccanismi vengono coinvolti e portano al riconoscimento dell'agente patogeno nel processo di difesa, alla rimozione degli immunocomplessi circolanti e a modulare le azioni di tipo pro-infiammatorio nelle fasi acute e croniche della risposta immunitaria (37, 38).

L'importanza del C viene evidenziata dai dati clinici riguardanti le infezioni batteriche recidivanti nei soggetti con difetti ereditari o acquisiti del sistema complementare (39).

Una volta attivato quindi, il sistema del C assume un ruolo centrale nell'amplificazione della flogosi, ma questo può culminare in un danno tessutale in caso di eccessiva attivazione; è stato dimostrato infatti, sia a livello sperimentale

animale, sia a livello clinico umano, come gli eventi patologici siano spesso dovuti ad una non regolata condizione di attivazione del sistema.

Riconoscimento del bersaglio ed attivazione del sistema complementare

Il C è composto da più di trenta glicoproteine, solubili o legate a membrane cellulari, che interagiscono tra loro in seguito ad attivazione del sistema (40). I componenti complementari sono indicati secondo un ordine numerico (C1-C9), con lettere (Fattore D, B, H) o con speciali denominazioni.

Le proteine della cascata complementare sono sintetizzate principalmente dagli epatociti, ma sono anche prodotte da monociti, macrofagi tissutali, cellule endoteliali e cellule epiteliali del sistema gastrointestinale e genitourinario (1, 41-46). Vengono secrete sotto forma di proteine inattive (zimogeni); l'attivazione avviene tramite scissione enzimatica che permette la rimozione di un frammento inibitorio, l'esposizione del sito attivo e l'azione sui componenti successivi della cascata (47).

Il sistema complementare ha bisogno di essere attivato per agire; questo presuppone prima di tutto il riconoscimento del bersaglio da parte dei primi componenti, con conseguente modifica della struttura della proteina che permetta di attivare a cascata gli altri componenti.

Tre sono le possibili vie di attivazione (Fig. 2.8), che vedremo descritte dettagliatamente in seguito:

- la via classica, che si attiva in seguito all'interazione antigene-anticorpi e C1q;
- la via alternativa, attivata in seguito all'interazione fra particolari superfici con il C3;
- la via lectinica, che si attiva in seguito all'interazione fra carboidrati ed MBL.

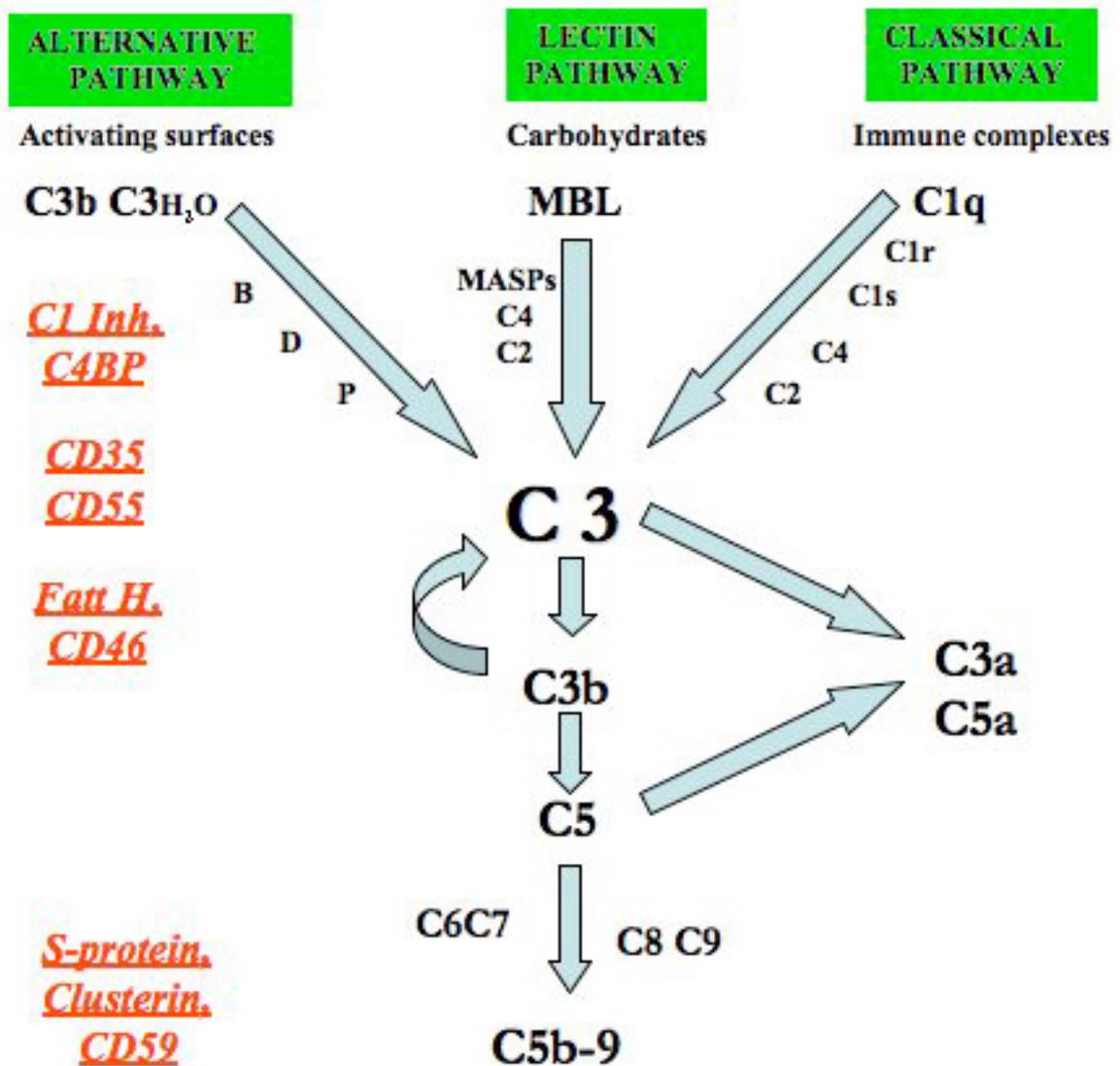


Figura 2.8 Schema riassuntivo della cascata complementare.

Il legame con determinati bersagli garantisce una certa specificità verso le componenti estranee e la cascata di proteine che interagiscono in seguito permette di amplificare gli effetti finali.

La *via classica* prende avvio dall'interazione del componente C1 con la porzione Fc di IgM e IgG fissate all'antigene. Solo gli anticorpi di alcune classi immunoglobuliniche, IgG e IgM, sono capaci di innescare la cascata complementare, mentre sono generalmente inattive le IgA, le IgD e le IgE. Le IgG

attivano il complemento con efficienza diversa, in ordine decrescente $IgG3 > IgG1 > IgG2$, mentre le $IgG4$ non attivano il complemento.

Il primo evento è il legame non covalente del $C1q$, con i siti presenti sul frammento Fc di IgG e IgM legate all'antigene. Il $C1$ infatti è una glicoproteina sierica costituita da 3 subunità legate tra loro in modo non covalente: $C1q$, $C1r$ e $C1s$, che sono tenute insieme grazie alla presenza di ioni calcio e sono presenti in un rapporto molare di $1/2/2$. Il $C1q$ a sua volta è costituito da sei subunità, ciascuna formata da tre catene avvolte ad α -elica. La porzione terminale globulare di ciascuna subunità del $C1q$ è in grado di legarsi alle Ig soltanto quando queste si trovano in una certa conformazione, in particolare in seguito al loro legame con l'antigene, che rende accessibili dei siti presenti nell' Fc , ovvero nel dominio $CH2$ delle IgG o nel dominio $CH3$ delle IgM . In particolare il legame avviene quando due porzioni Fc di anticorpi legati all'Ag si trovano sufficientemente vicini da legare la stessa molecola di $C1q$. A causa della differenza di struttura tra IgG e IgM , una singola IgM , in quanto pentamerica, è capace di attivare il $C1q$, mentre le IgG devono essere almeno due e strettamente adiacenti.

Il legame del $C1q$ ai frammenti Fc delle Ig porta all'attivazione di $C1r$ che attraverso la sua attività proteolitica attiva il $C1s$.

Il $C1s$ attivato scinde il $C4$ in $C4a$ che si libera nel plasma, e in $C4b$, frammento più grande, che rimane ancorato alla membrana della cellula bersaglio o all'anticorpo attraverso un legame tioesterico. Successivamente il $C2$ si associa al $C4b$ e viene tagliato dal $C1s$ in due frammenti: $C2b$ e $C2a$ che rimane legato al $C4b$. Questo complesso enzimatico, $C4b2a$, viene definito $C3$ convertasi della via classica (37), ha la capacità di legare il $C3$, attraverso il $C4b$, e di scinderlo in due frammenti, $C3a$ e $C3b$; quest'ultimo è estremamente instabile e può andare incontro a idrolisi se non si lega alla membrana della cellula bersaglio. Il $C3b$ depositato si associa alla $C3$ convertasi formando il complesso $C4b2a3b$, noto come $C5$ convertasi della via classica, la cui funzione è quella di attivare il $C5$ dando avvio alle fasi terminali della cascata complementare (47).

La *via alternativa* è attivata dal C3b depositato sulla superficie microbica indipendentemente dalla presenza di anticorpi legati all'antigene. In condizioni fisiologiche esiste una scissione spontanea continua del C3 presente nel plasma («tickover»), quasi a fornire uno stato di pronta attivazione del sistema (47).

Al C3b depositato su cellule estranee si lega il Fattore B, il quale viene scisso dall'attività serin-esterasica del Fattore D, portando alla produzione del frammento Bb, che rimane associato alla membrana. Il complesso che si forma, C3bBb, è detto C3 convertasi della via alternativa (37). La sua funzione è quella di scindere quantità sempre maggiori di C3 e rappresenta un importante punto di amplificazione dell'attivazione del complemento. Il complesso C3bBb si lega ad un altro frammento di C3b e forma un complesso enzimatico attivo, C3bBb3b, definito C5 convertasi della via alternativa (1).

La *via lectinica* si attiva in seguito all'interazione tra i polisaccaridi presenti sulla superficie batterica e l'MBL. Questa proteina, una volta fissata sul bersaglio, lega alcune serin-proteasi dette MASP, che, a loro volta, sono in grado di attivare in sequenza C4 e C2 portando alla formazione della C3 convertasi. Sono stati identificati due diversi tipi di MASP, MASPI e MASP2, che hanno struttura e funzione molto simile al C1r e al C1s della via classica (48). Anche in questo caso l'attivazione del C3 porterà alla formazione di un complesso in grado di attivare il C5 e quindi la fase terminale comune della cascata complementare.

Fase terminale della cascata complementare

La scissione del C5 in C5a e C5b da parte delle C5 convertasi generate dalla via classica, dalla via alternativa o dalla via lectinica, è l'ultimo processo proteolitico della cascata complementare.

Il C5b, il frammento più grande derivante dall'attivazione del C5, si lega alla membrana della cellula bersaglio e fa proseguire la reazione complementare legando il componente successivo, il C6. Si forma così il complesso C5b6, che s'inserisce nella membrana cellulare in modo stabile solo in presenza di C7. Il

C5b67 possiede, infatti, una parte idrofobica che gli consente di penetrare nel doppio strato lipidico di membrana.

Il complesso appena formato è in grado di legare una molecola di C8, che permette un suo più profondo inserimento nella cellula ospite ed una limitata capacità di lisare la cellula. L'efficienza litica del complesso aumenta notevolmente quando si lega l'ultimo componente complementare, il C9; esso è in grado di polimerizzare portando alla formazione del MAC e creando un poro del diametro di circa 70-100 Å. Il canale formato dal MAC permette il passaggio di ioni e molecole non in maniera selettiva ma esclusivamente in base alle loro dimensioni e causa la morte cellulare per shock osmotico (49).

Funzioni biologiche del complemento

Le funzioni del sistema del C sono molteplici e sostanzialmente riconducibili a fenomeni di lisi cellulare, di opsonizzazione e di promozione della fagocitosi, dell'anafilassi e della chemiotassi (50).

Per agire come antimicrobico e come mediatore del processo flogistico il sistema deve aver completato la fase preliminare di riconoscimento del bersaglio ed aver attivato i meccanismi successivi di amplificazione del processo stesso, con la conseguente formazione di prodotti di degradazione o complessi molecolari aventi azioni biologiche.

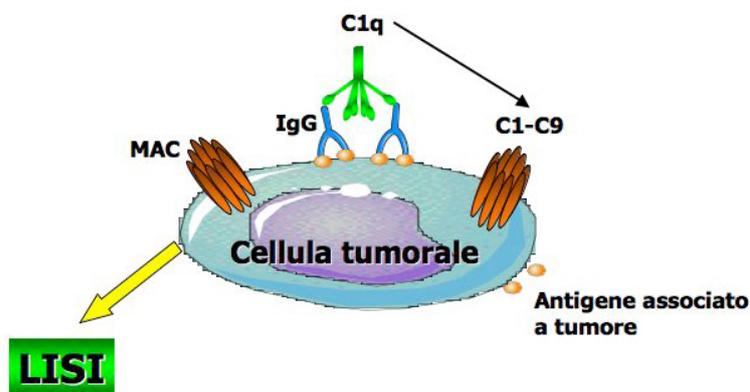


Figura 2.9 Citotossicità complemento dipendente. Il legame degli anticorpi alla cellula tumorale il dice deposito di C1q, l'attivazione della via classica e la lisi osmotica della cellula bersaglio.

Come abbiamo visto, il complesso C5b678 lega 12-18 molecole di C9, che polimerizzando determinano la formazione del MAC, capace di determinare sulla membrana cellulare pori che inducono direttamente la lisi osmotica delle cellule bersaglio.

L'opsonizzazione è un importante strumento di difesa contro le infezioni batteriche, promuovendo il riconoscimento di agenti patogeni da parte dei fagociti (50). Il processo è il risultato dell'interazione di frammenti complementari, come C3b e iC3b, con i recettori specifici presenti sulla superficie dei macrofagi. Si conoscono quattro tipi di recettori: il CR1 (CD35), che presenta specificità di legame con i frammenti C3b e C4b; il CR2 (CD21), che reagisce con il frammento C3dg, il CR3 (CD11b/CD18) ed il CR4 (CD11c/CD18) aventi rapporti di legame con i frammenti iC3b.

L'anafilassi è la conseguenza di una produzione di specifici prodotti di degradazione del C ed è un fenomeno che a carattere sistemico può raggiungere livelli d'intensità tali anche da provocare la morte (51). I frammenti del sistema complementare C3a, C4a e C5a sono stati chiamati anafilatossine poiché, inducendo la liberazione di rilevanti quantità di istamina ed altre sostanze ad azione vasoattiva da parte di mastociti o basofili (52), provocano uno spasmo della muscolatura liscia con stasi emodinamica a livello del microcircolo ed il rapido aumento della permeabilità vascolare. L'internalizzazione poi del complesso C5a/recettore provoca a livello dei neutrofili lo stimolo a produrre radicali liberi e a rilasciare enzimi lisosomiali.

I prodotti solubili di attivazione del C3 e del C5, ovvero C3a e C5a, sono fra i più importanti agenti chemiotattici del nostro organismo (53). Il frammento C5a, qualora liberato in quantità considerevole in ambito vascolare sistemico, è in grado di provocare leucopenia a causa della sequestrazione periferica dei leucociti polimorfonucleati, mentre l'azione del C3a è minore (54). L'azione chemiotattica si esplica, oltre che sui neutrofili, anche sui monoliti; agisce anche favorendo la liberazione di mediatori vasoattivi e chemiotattici, responsabili a loro volta dell'aumento della permeabilità vascolare e della mobilitazione leucocitaria verso

il sito di infiammazione da parte di cellule stimulate da C3a e C5a. Inoltre il C5a può indurre degranulazione cellulare causando il rilascio di un ampio spettro di mediatori infiammatori, tra i quali i prodotti del metabolismo dell'acido arachidonico. Infine ha anche un ruolo nell'induzione del fenotipo proadesivo, inducendo l'espressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule mieloidi.

Anche le cellule endoteliali possono essere direttamente attivate da questa anafilotossina: in seguito all'interazione tra C5a e il suo recettore vengono prodotti radicali liberi dell'ossigeno e vengono espresse molecole di adesione, in particolare P-selectina.

Tutte queste funzioni suggeriscono che il C5a ha un ruolo fondamentale nel provocare e nell'amplificare la risposta infiammatoria nel sito in cui è in atto l'infezione (55). E' stato dimostrato che anche il TCC formatosi in soluzione (iTCC) riveste un ruolo importante nella migrazione, soprattutto dei neutrofilii, sia *in vitro* che *in vivo* (56, 57).

Regolazione della cascata complementare

Il sistema del C, data la sua facilità di attivazione e le importanti funzioni svolte, necessita di regolatori molecolari che ne limitino e ne controllino l'azione, sia a livello sierico che di membrana. Dopo essersi attivato, il sistema del C non è più in grado di riconoscere in modo specifico il bersaglio al quale si lega e da ciò potrebbero derivare effetti lesivi sui tessuti dell'organismo stesso. Ci sono due tipologie di regolatori biologici che controllano l'attivazione della cascata complementare, ovvero i regolatori solubili e gli inibitori di membrana (58).

Il sistema del C è regolato da inattivatori solubili presenti nel siero e nei liquidi biologici che agiscono su componenti attivati a diversi livelli della sequenza complementare.

La via classica è regolata già a livello del C1 attraverso C1-inibitore (C1-INH), inattivatore delle serin-proteasi, che agisce legandosi stabilmente ai frammenti C1r e C1s e bloccando quindi la loro capacità di tagliare i rispettivi substrati. Sulla via

classica agisce anche la C4BP (C4 binding protein), inibitore della C3-convertasi che agisce sul complesso C4b2a favorendone la dissociazione irreversibile. E' un cofattore per la scissione enzimatica del frammento C4b ad opera del fattore I plasmatico che scinde il frammento C3b in iC3b e il frammento C4b in iC4b.

Anche la via alternativa è regolata da diverse proteine. Il fattore H, ad esempio, è un inibitore solubile simile alla proteina C4BP che agisce a livello della C3 convertasi; svolge la sua funzione regolatrice con tre diversi meccanismi: compete con il fattore B per il legame al frammento C3b; accelera il distacco del fattore Bb dal frammento C3b ed infine agisce da cofattore per il fattore I, causando la scissione del frammento C3b in C3b inattivo (iC3b).

Anche a livello della formazione del MAC sono presenti alcuni regolatori solubili del C. La clusterina (SP40-40) è una proteina che lega il complesso terminale del C prevenendone l'inserzione nelle membrane cellulari; la proteina S (vitronectina) inibisce l'attività dei componenti terminali del C legando i complessi C5b-7, C5b-8 e C5b-9 durante il loro assemblaggio, prevenendo così la generazione di un MAC sulle membrane cellulari.

Per evitare danni tissutali dovuti al C autologo, le cellule producono una serie di inibitori del C direttamente sulla membrana (59, 60).

Il recettore di membrana di tipo I (CRI o CD35) è una glicoproteina presente sulle membrane di eritrociti, linfociti B e alcuni linfociti T, neutrofili, monociti, eosinofili, cellule follicolari e dendritiche. Accelera la dissociazione delle C3 convertasi agendo come cofattore per il clivaggio del frammento C3b in iC3b (successivamente in C3c e C3dg) e del frammento C4b in iC4b mediato dal fattore I.

Il fattore di accelerazione del decadimento (DAF o CD55) è una glicoproteina legata alla membrana delle cellule ematiche, endoteliali e di molte cellule epiteliali, attraverso una glicofosfolipoproteina (glicosil-fosfatil-inositolo o GPI). Il DAF lega e dissocia le C3 convertasi (61).

La proteina cofattore di membrana (MPC o CD46) è una proteina integrale di membrana presente su epiteli ed endoteli, su tutte le cellule ematiche (ad

eccezione dei globuli rossi) e su gran parte delle cellule sino ad ora esaminate. Svolge la sua azione legandosi al frammento C3b e agendo come cofattore per il fattore I (62).

Il CD59 o inibitore di membrana della lisi reattiva (MIRL o PROTECTINA) è una glicoproteina presente su numerose cellule e anch'essa è fissata per mezzo di una coda glicosilfosfatidil-inositolica (GPI). La sua funzione è quella di inibire l'ultima fase dell'assemblaggio del MAC sulle membrane, legandosi al C8 e ad una molecola di C9, ma impedendo la polimerizzazione di quest'ultimo e quindi la formazione di un complesso terminale liticamente attivo.

Il CD59, come altri inibitori di membrana, è presente anche in forma solubile nel plasma, nelle urine, nella saliva, nelle lacrime o in altri liquidi biologici, ma non è ancora chiaro se questa forma derivi dal rilascio diretto da parte della membrana cellulare, da una secrezione attiva della cellula o da un taglio enzimatico del CD59 di membrana effettuato da una fosfolipasi (63).

2.4.5.5 *Citotossicità cellulare complemento-dipendente (CDCC)*

La CDCC opera in modo simile all'ADCC: i componenti complementari depositati sulla superficie della cellula bersaglio (C1q, C3b, iC3b -C3b inattivato- e C4b) possono infatti essere riconosciuti dai recettori per il complemento. I recettori per il C3, per esempio, CR1 e CR3 (CD11b/CD18), sono presenti su leucociti polimorfonucleati neutrofili, cellule NK e macrofagi. Questa interazione tra frammenti del complemento e rispettivo recettore può facilitare la fagocitosi e la citotossicità mediata dalle NK. Normalmente il meccanismo che coinvolge il CR3 non viene attivato direttamente dalle cellule tumorali, ma recentemente è stato utilizzato il b-glucano (normalmente presente nella parete cellulare di lieviti e funghi), che media l'interazione tra iC3b e CR3, come adiuvante per l'induzione dell'effetto antitumorale mediato da CR3 (64). Nell'immunoterapia dei tumori tuttavia, gli anticorpi utilizzati fanno depositare prodotti di attivazione del complemento sulla superficie delle cellule tumorali, e quindi permettono l'interazione con i recettori specifici sulle cellule effettrici (figura 2.10).

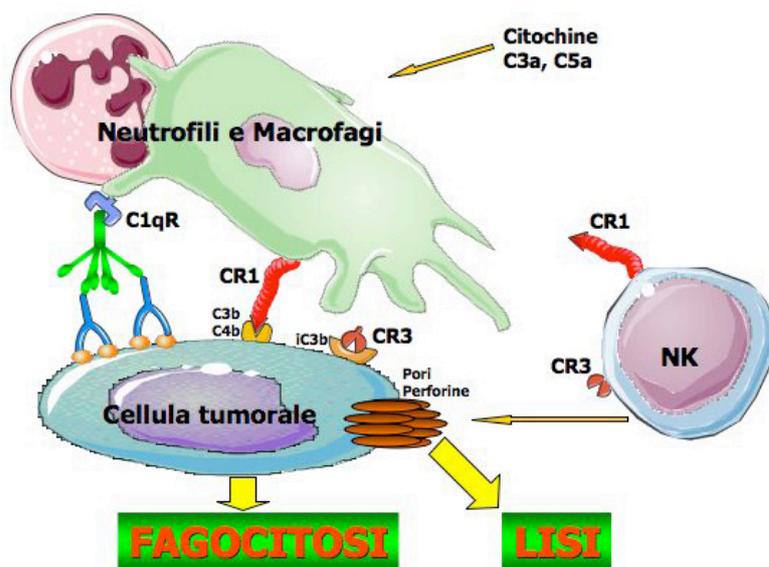


Figura 2.10 Citotossicità cellulare complemento dipendente. Attraverso i recettori CR1 e CR3 le cellule effettrici riconoscono gli anticorpi diretti verso antigeni tumorali e lisano la cellula bersaglio o ne mediano la fagocitosi.

2.5 Terapia cellulare

L'utilizzo di cellule a scopo terapeutico è una dei campi di ricerca più aperti e con le maggiori possibilità di sviluppo. Generalmente lo scopo è quello di introdurre nell'organismo in cui si sta sviluppando una massa tumorale delle cellule del sistema immunitario modificate in laboratorio ed in grado di localizzare ed attaccare le cellule cancerose. In modelli animali è stato dimostrato, infatti, che non si ottengono risultati vaccinando l'organismo con antigeni tumore-associati, probabilmente per la ridotta presentazione dell'antigene con questo metodo. Per superare questo ostacolo attualmente si utilizzano cellule dendritiche, isolate dal sangue del paziente, "pulsate" con l'antigene tumore-associato. I primi esperimenti sono stati effettuati sfruttando l'epitopo creato dall'idiotipo delle Ig presenti sulla superficie delle cellule di linfoma Non-Hodgkin's. I primi risultati, ottenuti assieme all'Università di Stanstford, hanno evidenziato che, dei 23 pazienti che hanno terminato la terapia, 16 non hanno avuto una progressione di malattia nei 43 mesi successivi (65).

Un secondo esempio di terapia cellulare anti-tumorale si basa sull'utilizzo di linfociti T citotossici (CTL), in considerazione del fatto che l'infiltrazione tumorale di queste cellule è un potenziale marker di prognosi favorevole in pazienti con carcinoma ovarico e del colon (66, 67). Il trasferimento di linfociti T autologhi è

una pratica clinica in uso e, oggi, è disponibile una piattaforma di CTL contro diversi target tumorali. Questo approccio è stato utilizzato in particolare nel trattamento di pazienti con melanoma metastatico refrattario e circa il 40% di essi hanno avuto una buona risposta immunitaria (68). Buoni risultati si sono ottenuti *in vitro* (69) utilizzando i CTL infiltranti il tumore, dopo averli isolati da biopsie del paziente e selezionati *ex vivo*, ma i risultati clinici sono divergenti (70-73). L'utilizzo di cellule T ingegnerizzate sembra incrementare gli effetti antitumorali (74) e aumentare la ricostituzione del sistema immune in paziente immunosoppressi, soprattutto perché si è dimostrato che queste cellule rimangono in circolo per anni (75). Inizialmente sono stati utilizzati geni di origine virale che inducono il suicidio cellulare, trattando soprattutto pazienti con patologie oncoematologiche (76). Un limite di questa strategia è che, spesso, i tumori sono poco immunogenici; per ovviare a questo, è stato messo a punto l'utilizzo di CTL in grado di esprimere recettori specifici per cellule tumorali oppure ingegnerizzati ed in grado di esprimere un nuovo recettore chimerico, detto "Tbody". Un trial clinico, che utilizza CTL esprimenti un T body specifico per il FR, ha indicato la sicurezza di questo approccio ma senza grossi risultati; sono in corso studi sull'utilizzo di CTL specifici per il neuroblastoma (77) e per il carcinoma renale (78).

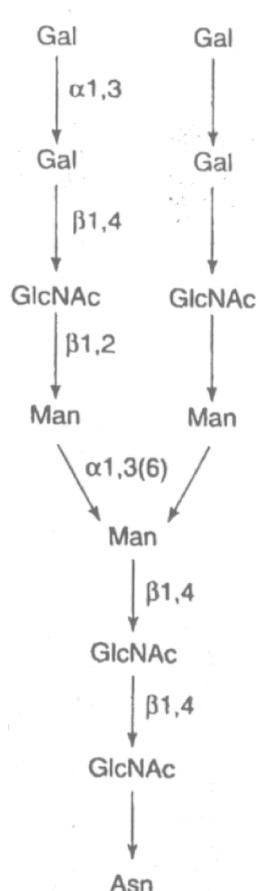
Un altro esempio di terapia cellulare prevede l'utilizzo di cellule staminali come veicolo di farmaci per il trattamento dei tumori. In particolare Studeny ed il suo gruppo ha proposto le cellule staminali mesenchimali come candidato ideale per portare l'agente terapeutico nel microambiente tumorale, in quanto possono andare facilmente a localizzarsi nello stroma tumorale (79). Contemporaneamente anche Moore ed i suoi collaboratori hanno dimostrato che progenitori delle cellule endoteliali, iniettati in circolo, vengono reclutati con elevata specificità nel tumore cerebrale che si sta sviluppando (80).

2.5.1 Cellule endoteliali e targeting vascolare

La creazione di una rete vascolare è un punto essenziale per la crescita di un tumore solido. Gli enzimi, le citochine e i fattori di crescita prodotti modificano in generale il microambiente tumorale favorendo la migrazione, la proliferazione e la sopravvivenza di molti tipi cellulari (81). Molti studi *in vivo* supportano l'idea che cellule possano venir reclutate in risposta a stimoli chemiotattici prodotti dalle cellule tumorali, anche da distretti distanti dal tumore (82-84); in particolare vengono richiamate cellule endoteliali (85, 86), che vanno a costituire parte dei vasi o fibroblasti, che vanno a modificare il microambiente tumorale (87).

Il prof. Amadori ed il suo gruppo ha sfruttato questi meccanismi per mettere a punto una metodica che evidenzia come l'iniezione di cellule endoteliali, o di

fibroblasti, in animali che stanno sviluppando un carcinoma ovarico in peritoneo, porti alla loro localizzazione selettiva nei vasi tumorali (88). Questo meccanismo rappresenta un potenziale strumento terapeutico, in quanto, avendo la possibilità di attaccare solo le cellule endoteliali iniettate dall'esterno (per esempio dopo averle ingegnerizzate *in vitro*), permetterebbe di agire in maniera molto specifica sui vasi tumorali.



2.6 L'epitopo alfa-gal e gli anticorpi naturali anti-alfa-gal

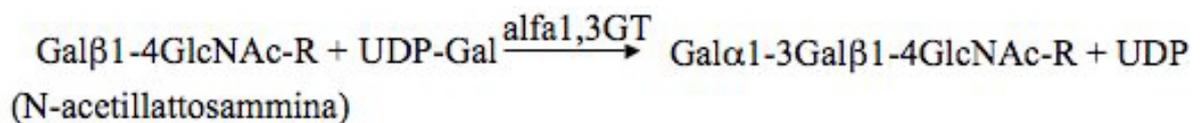
L'epitopo alfa-gal è una struttura dei carboidrati comune nei mammiferi.

Figura 2.1 | Schema dell'epitopo alfa-Gal

E' stato inizialmente caratterizzato sulla superficie dei globuli rossi di coniglio (89, 90) e successivamente ne è stata dimostrata la presenza in glicolipidi e glicoproteine di varia dimensione in eritrociti di coniglio, maiale, mucca, topo ed in

diversi altri mammiferi; al contrario le scimmie del vecchio mondo (Asia e Africa) e l'uomo perdono questo epitopo (Fig. 2.11) ma producono un'elevata quantità di anticorpi specifici contro di esso. Gli anticorpi anti-alfa-gal prodotti rappresentano circa l'1% delle immunoglobuline circolanti nel sangue umano (14-15 galili 2001) e sono il risultato di un continuo stimolo antigenico indotto dai batteri gastrointestinali.

L'alfa1,3galattosiltransferasi (alfa1,3GT) è l'enzima che sintetizza l'epitopo alfa-gal nelle cellule mammarie. Quest'enzima è stato trovato nel trans-Golgi network dove sintetizza gli epitopi alfa-gal usando residui di N-acetilattosamina come zucchero eccettore e UDP-gal come donatore nella seguente reazione:



In accordo con la distribuzione dell'epitopo, l'enzima alfa1,3GT risulta attivo in cellule di mammifero non-primate e in scimmie del nuovo mondo, ma non in scimmie del vecchio mondo e nell'uomo (91).

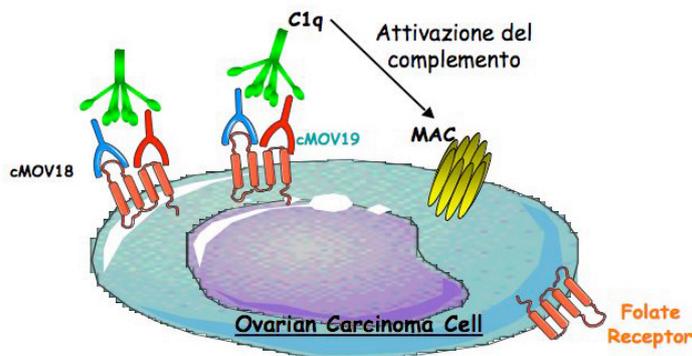
La soppressione del gene, e la conseguente produzione di anticorpi anti-alfa-gal, ha generato una barriera immunologica fra l'uomo, che produce una grossa quantità di anticorpi, e i mammiferi con cellule che esprimono il ligando di questi anticorpi. Di conseguenza, per esempio, visto che la maggior parte delle cellule di maiale esprimono gli epitopi alfa-gal, è prevedibile che il trapianto di organi di maiale nell'uomo porterà al legame di anticorpi anti-alfa-gal sugli epitopi delle cellule dello xenotrapianto e alla loro conseguente distruzione. Infatti, incubando cellule di maiale con siero umano è stata osservata la lisi cellulare indotta dal complemento, come risultato del deposito di IgM specifiche per l'epitopo alfa-gal e della successiva attivazione del complemento. Studi in scimmie hanno ulteriormente indicato che il legame *in vivo* di anticorpi anti-alfa-gal sulle cellule endoteliali dello xenotrapianto da maiale risulta in una lisi cellulare indotta dal complemento, che porta al collasso del letto vascolare e al rigetto iper-acuto dello xenotrapianto (91).

3. Scopo della tesi

Non tutti gli anticorpi antitumorali sviluppati si sono dimostrati in grado di eliminare le cellule cancerose e di sfruttare adeguatamente il sistema complementare (1); altri, pur essendo in grado di attivarlo, non portano alla lisi della cellula bersaglio (2); altri ancora, pur avendo un buon effetto citotossico su cellule tumorali *in vitro*, si sono dimostrati poco efficaci una volta testati *in vivo* (3). Lo scopo del lavoro di questi tre anni è stato quello di mettere a punto nuove strategie che permettessero di sfruttare a pieno le capacità del complemento di eliminare le cellule tumorali.

A. Raggiungere una concentrazione anticorpale sufficiente ad attivare il complemento, anche avendo a disposizione antigeni tumore-associati poco espressi.

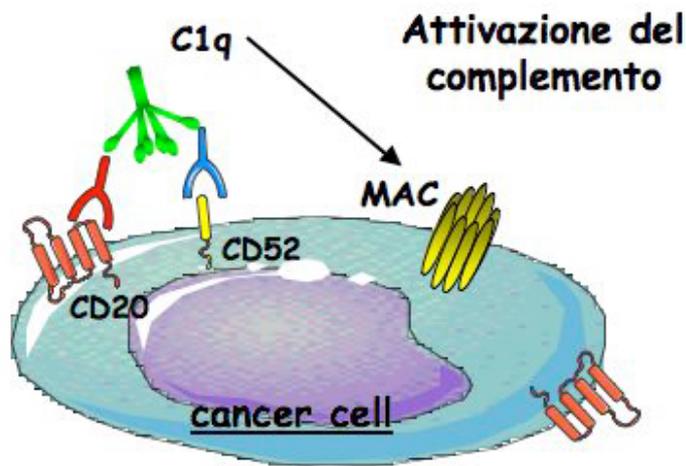
A questo scopo è stato studiato il carcinoma ovarico ed il FR come antigene associato al tumore, contro cui sono stati sviluppati due mAb chimerici che



vedono epitopi diversi di questa molecola: cMOV18 e cMOV19. L'idea è quella di utilizzare più anticorpi contro la stessa molecola per avere una maggiore concentrazione di Fc e migliorare l'attivazione del

complemento, mimando in parte la produzione di anticorpi policlonali che il sistema immunitario induce contro un antigene.

Per diversi antigeni non sono, al momento, a disposizione anticorpi contro epitopi diversi, ma possono essere stati individuati diversi Ag associati alla stessa cellula tumorale. Un esempio è dato dai linfomi e dalle leucemie linfatiche croniche che esprimono CD20 e CD52, contro cui sono stati isolati rispettivamente Rituximab e Campath-1H. Anche sfruttando anticorpi diretti contro antigeni diversi è

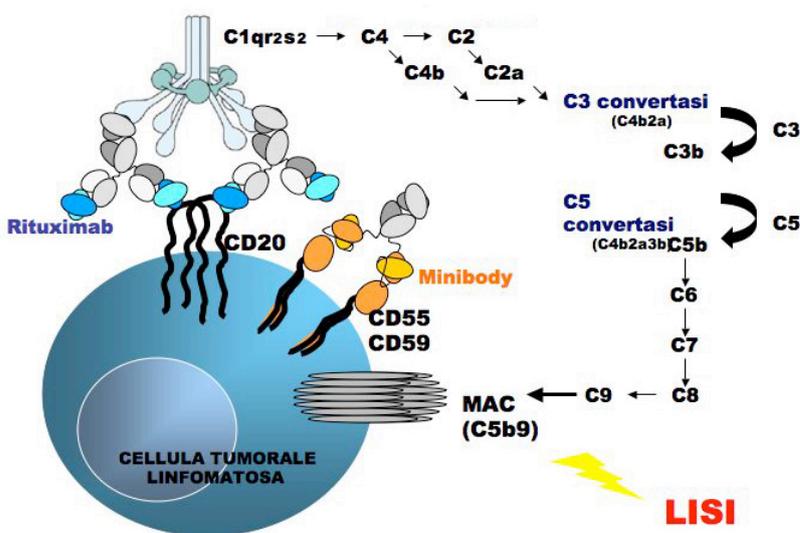


possibile aumentare la concentrazione di anticorpi sulla superficie cellulare e, di conseguenza, migliorare l'attivazione complementare. Attraverso questa strategia si spera di poter eliminare anche la

popolazione di cellule tumorali che ha una ridotta espressione del o degli antigeni tumore-associati o, come nel caso del Campath-1H, ottenere almeno gli stessi effetti del singolo anticorpo ma riducendone la dose ed ottenere così minori effetti collaterali.

B. Isolare e caratterizzare anticorpi ricombinanti umani in grado di neutralizzare l'azione degli inibitori di membrana del complemento.

Le cellule tumorali derivano da cellule del nostro organismo e come tali esprimono sulla loro superficie gli inibitori di membrana del complemento. Ne deriva che l'espressione, e spesso l'iper-espressione, di queste molecole sulle cellule tumorali riduce l'azione degli anticorpi in grado di attivare il complemento e quindi la lisi delle cellule bersaglio. Abbiamo pensato di estendere la terapia



anticorpale anche a queste molecole, isolando e caratterizzando degli anticorpi da librerie fagiche in grado di bloccare l'azione degli inibitori di membrana.

Utilizzando queste molecole, il sistema del

complemento attivato dagli anticorpi antitumorali non troverebbe ostacoli nella

sua azione litica e potrebbe eliminare un maggior numero di cellule tumorali. Ovviamente sarà anche importante mettere a punto una metodica che indirizzi gli anticorpi isolati solo sulle cellule tumorali e non sulle altre cellule dell'organismo, altrimenti sarebbero inutilizzabili in un trattamento *in vivo*.

C. Costruire un vettore in grado di codificare per l'alfa1,3GT allo scopo di lisare cellule endoteliali umane transfettate *in vitro*.

Se gli anticorpi possono diffondere nell'organismo e nelle masse tumorali, non è stata dimostrata la presenza di tutti gli elementi del sistema complementare nel micro-ambiente tumorale. E' possibile quindi che anticorpi, con ottime prospettive dopo gli esperimenti su cellule in coltura, non dimostrino un reale effetto terapeutico negli esperimenti *in vivo* semplicemente perché manca il meccanismo effetore nella sede tumorale. Creare dei danni ai vasi sanguigni intra-tumorali permetterebbe però il passaggio delle proteine complementari dal circolo al micro-ambiente tumorale ed una migliore azione citotossica degli anticorpi antitumorali. A questo scopo costruire un vettore codificante per l' alfa1,3GT permetterebbe di transfettare cellule endoteliali umane; iniettate in circolo dovrebbero raggiungere i vasi tumorali e successivamente venir eliminate attraverso gli anticorpi anti-alfa-gal presenti nel siero umano. Questo porterebbe, oltre ad un primo effetto anti-angiogenetico, anche ad una elevata permeabilità vascolare e alla conseguente uscita dal circolo dei componenti complementari oltre, ovviamente, ad anticorpi e cellule effettrici.

4. Risultati

4.1 Immunoterapia del carcinoma ovarico sfruttando l'attivazione del sistema del complemento indotta dalla miscela di anticorpi anti-FR, cMov18 e cMov19

Macor P., D. Mezzanzanica, C. Cossetti, P. Alberti, M. Figini, S. Canevari, F. Tedesco. "Complement activation by chimeric anti-Folate Receptor antibodies is an efficient effector system to control ovarian carcinoma" *Cancer Res.* 2006 66(7): 3876-83.

Can res 2006 I

Can res 2006 2

Can res 2006 3

Can res 2006 4

Can res 2006 5

Can res 2006 6

Can res 2006 7

Can res 2006 8

4.2 Immunoterapia del linfoma Non-Hodgkin's e delle leucemie linfatiche croniche sfruttando l'attivazione del sistema del complemento indotta dalla miscela Rituximab e Campath-1H

CD20 e CD52 sono due molecole contro cui sono stati sviluppati Rituximab e Campath-1H, due anticorpi ricombinanti che hanno ricevuto l'approvazione dall'FDA per il trattamento rispettivamente del linfoma Non Hodgkin's e delle leucemie linfatiche croniche. In particolare il CD20 è una molecola espressa soprattutto sulla superficie delle cellule di linfoma, ma è possibile valutare anche una buona concentrazione di CD52 sulla superficie di queste cellule (Fig. 4.21).

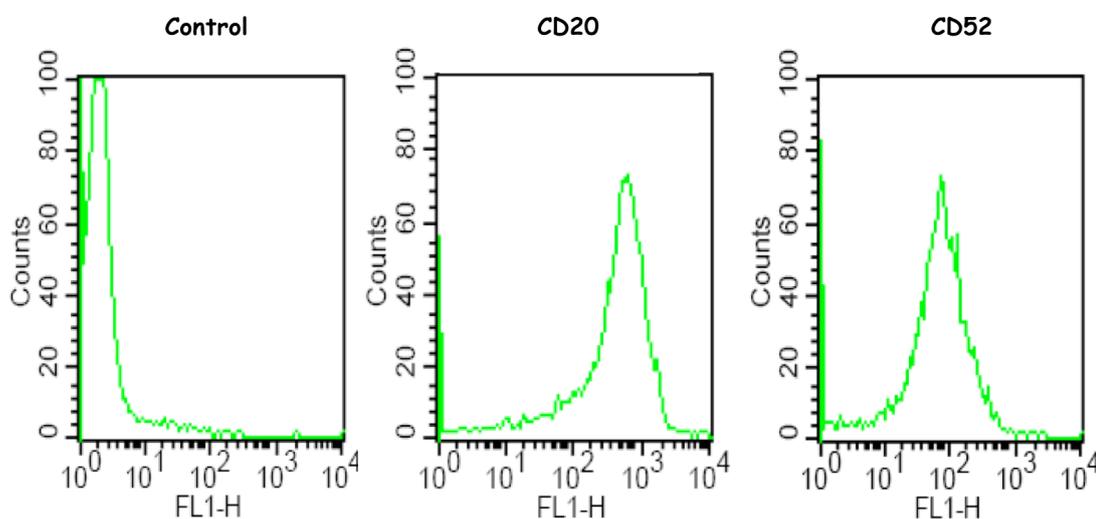


Figura 4.2.1. Espressione di CD20 e CD52 su cellule di linfoma Non-Hodgkin's. Bjab sono state analizzate al FACS per l'espressione di CD20 e CD52 usando Rituximab o Campath1H e anti-Human-FITC come anticorpo secondario. Come controllo le cellule sono state incubate con un anticorpo non correlato e con lo stesso anticorpo secondario.

E' noto dalla letteratura come CD52, proteina GPI-anchored, sia presente sulla membrana cellulare soprattutto in strutture lipidiche ricche in colesterolo, dette "lipid rafts". Al contrario CD20 è una molecola a 4 domini trans-membrana presente su tutta la superficie cellulare; è anche stato dimostrato però che, dopo il legame con Rituximab (ed altri anticorpi, tutti classificati per questa proprietà come di tipo primo), questa molecola tende a concentrarsi all'interno dei "lipid rafts". Questa caratteristica permette a Rituximab e agli altri anticorpi di tipo primo

di essere concentrati in una zona ristretta della superficie cellulare e le porzioni Fc così vicine potranno legare il C1q ed attivare la cascata complementare (lavoro). Ovviamente non tutte le cellule esprimono elevate quantità di CD20 e quindi non tutte vengono lisate dall'azione del complemento. Test di CDC *in vitro* su linee cellulari o cellule isolate da pazienti hanno indicato risultati variabili tra il 15 ed il 40% di lisi delle cellule bersaglio, non sempre dovuto alla presenza degli inibitori di membrana. E' possibile aumentare l'attivazione cellulare su queste cellule sfruttando la contemporanea presenza di CD20 e CD52 all'interno dei "lipid rafts". Analisi al microscopio di doppia marcatura di una linea cellulare trattata con Rituximab-RPE e successivamente con anti-CD52-FITC mostra una co-localizzazione delle due molecole sulla superficie cellulare (Fig. 4.2.2).

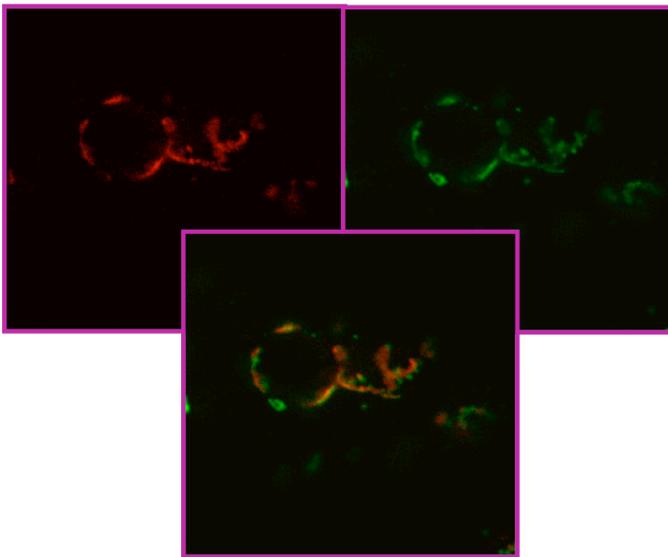


Figura 4.2.2 Co-localizzazione di CD20 e CD52 sulla superficie di cellule di linfoma Non-Hodgkin's. BJAB cells were incubated with Rituximab followed by RPE-conjugated secondary Ab for 60 min at 37°C and then with anti-CD52 followed by FITC-conjugated secondary Ab in the same conditions. BJAB cells were then analysed for red and green fluorescence with confocal fluorescence microscopy.

Test di citotossicità di queste cellule, utilizzate come modello, indicano che incubando BJAB con Rituximab e siero umano come fonte di complemento si ottiene la lisi di circa il 20% delle cellule. Effettuando lo stesso test, ma sostituendo Campath-1H a Rituximab, si osservano valori di CDC che non superano il 5%, essenzialmente dovuto ad una ridotta espressione di CD52 rispetto a CD20, come visto in precedenza. L'associazione dei due anticorpi mostra invece un

effetto sinergico delle molecole nell'attivare la cascata complementare portando la lisi cellulare a valori medi di circa 45% delle BJAB (Fig. 4.2.3).

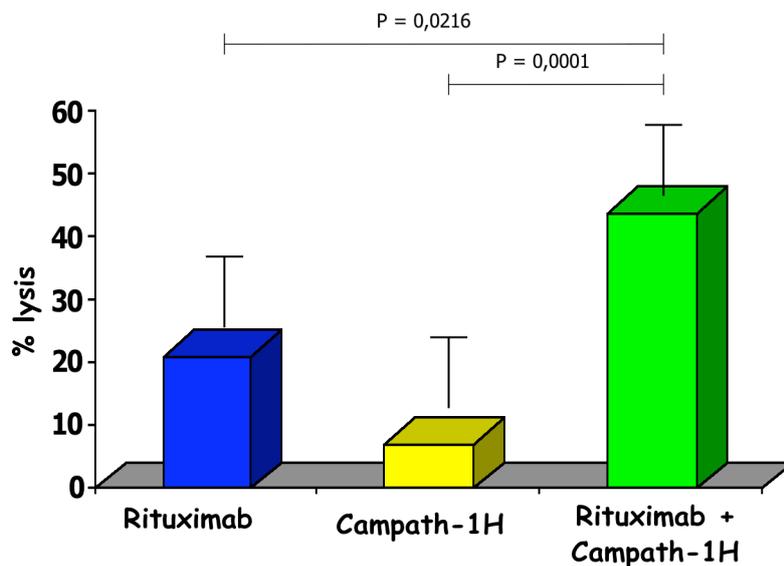


Figura 4.2.3. CDC di cellule di linfoma indotta da Rituximab, Campath-1H e dalla loro associazione. BJAB ($2 \times 10^5/50 \mu\text{l}$) sono state incubate con Rituximab ($5 \mu\text{g/ml}$), Campath1H ($5 \mu\text{g/ml}$) o con la loro associazione per 10min a 37°C prima dell'aggiunta di

NHS (25%) come fonte di complemento. La vitalità delle cellule residue è stata misurata dopo 1h a 37°C usando il saggio MTT e la percentuale di cellule morte è stata calcolata.

Diversa è la situazione analizzando cellule prelevate da pazienti con leucemia linfatica cronica. L'espressione di CD52 è maggiore e sempre più uniforme di quella di CD20 sulla superficie di queste cellule, come evidenziato nella figura 4.2.4, in cui vengono presentati i risultati dell'espressione di queste molecole in cellule purificate da 4 dei diversi pazienti.

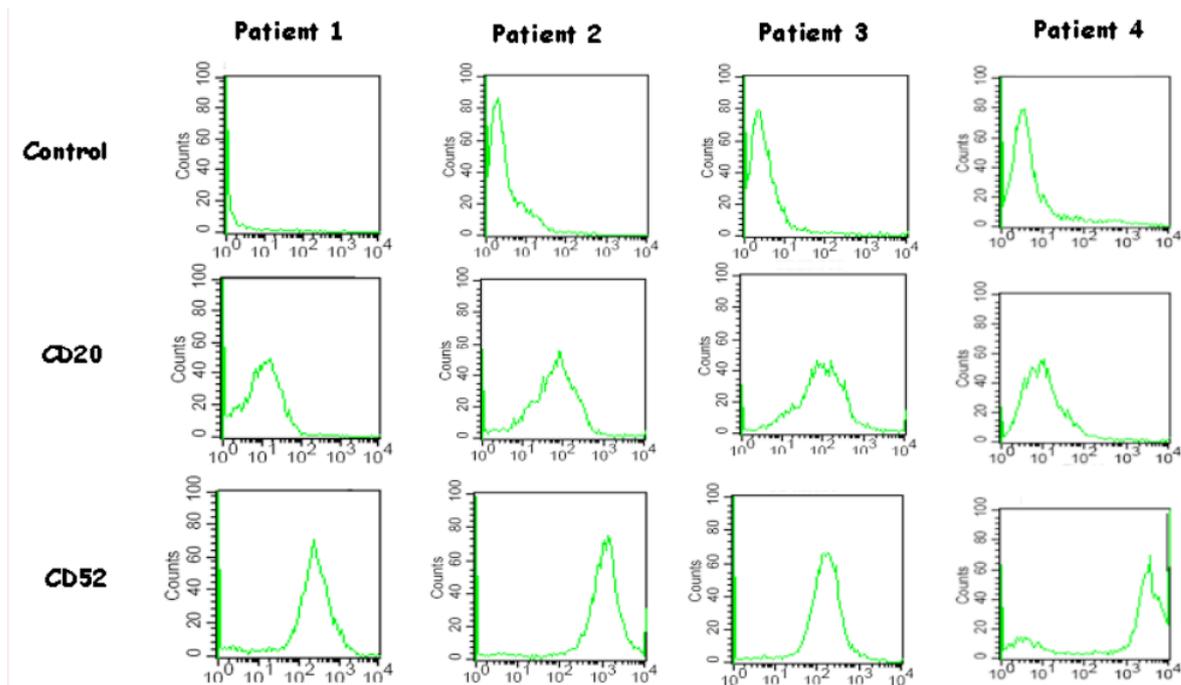


Figura 4.2.4 Espressione di CD20 e CD52 su cellule purificate da pazienti con CLL. Linfo-Monociti purificati da sangue di pazienti con CLL sono stati analizzati al FACS per l'espressione di CD20 e CD52 usando Rituximab o Campath1H e anti-Human-FITC come anticorpo secondario. Come controllo le cellule sono state incubate con un anticorpo non correlato e con lo stesso anticorpo secondario

Anche studiando la citotossicità indotta dall'attivazione del complemento le cellule di CLL sembrano rispondere in maniera diversa dalle cellule di linfoma; Rituximab sembra avere un effetto molto modesto o assolutamente nullo mentre Campath-1H riesce ad eliminare da solo più o meno il 40% delle cellule presenti nel test. Non a caso questa molecola viene utilizzato nel trattamento dei con CLL ed è già stato dimostrato che la sua azione è legata essenzialmente all'attivazione del complemento. Meno chiaro è il motivo per il quale Rituximab non riesca ad avere un'azione su queste cellule, nonostante l'espressione di CD20 non sia inferiore a quella vista nelle cellule di linfoma. L'utilizzo della miscela dei due anticorpi produce quasi sempre un incremento della lisi delle cellule bersaglio e che di solito si aggira attorno al 10%. Caratteristica e soprattutto ancora senza spiegazione è la situazione del paziente 3 che, nei test *in vitro*, ha mostrato una riduzione

dell'azione di Campath-1H dopo l'incubazione delle cellule con Rituximab (Fig 4.2.5).

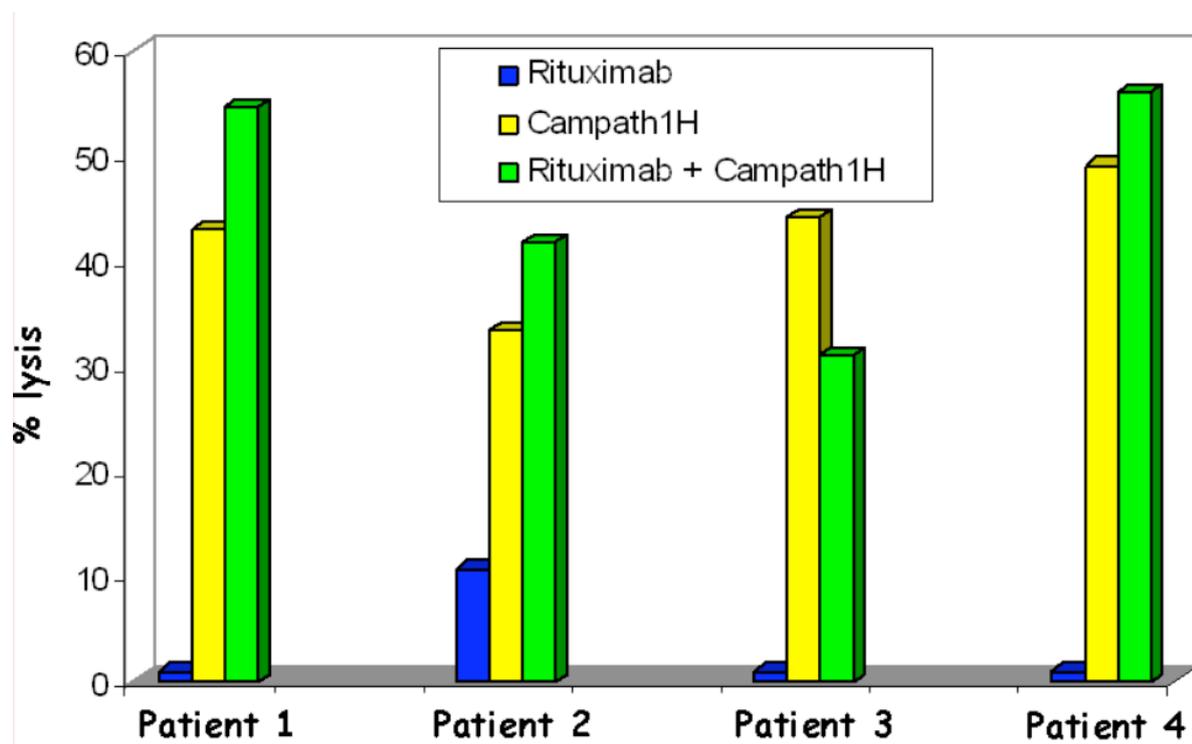


Figura 4.2.5 CDC di cellule da pazienti con CLL indotta da Rituximab, Campath-1H e dalla loro associazione. Cellule purificate da pazienti con CLL ($2 \times 10^5/50\mu\text{l}$) sono state incubate con Rituximab ($5\mu\text{g/ml}$), Campath1H ($5\mu\text{g/ml}$) o con la loro associazione per 10min a 37°C prima dell'aggiunta di NHS (25%) come fonte di complemento. La vitalità delle cellule residue è stata misurata dopo 1h a 37°C usando il saggio MTT e la percentuale di cellule morte è stata calcolata.

4.3 Isolamento MB55 ed MB59, anticorpi bloccanti CD55 e CD59, e caratterizzazione *in vitro* su cellule di linfoma Non-Hodgkin's.

Ziller F., Macor P., Bulla R., Sblattero D., Marzari R. and Tedesco F., "Neutralizing human monoclonal antibodies to Complement Regulatory Proteins CD55 and CD59 for controlling Complement resistance in cancer", *Eur J Immunol.* 2005. 35: 2175-83.

Ziller I

Ziller 2

Ziller 3

Ziller 4

Ziller 5

Ziller 6

Ziller 7

Ziller 8

Ziller 9

4.4 Caratterizzazione di MB55 ed MB59 in un modello *in vivo* di linfoma Non-Hodgkin's.

Macor P., Tripodo C., Zorzet S., Piovan E., Bossi F., Marzari R., Amadori A., Tedesco F. "Human antibodies neutralizing CD55 and CD59 targeted in-vivo to lymphoma cells increase the activity of Rituximab" *Cancer Res.* 2007 67 (21): 10556-63.

Can res 2007 I

Can res 2007 2

Can res 2007 3

Can res 2007 4

Can res 2007 5

Can res 2007 6

Can res 2007 7

Can res 2007 8

4.5 Caratterizzazione di un vettore codificante per alfa 1,3GT

L' alfa 1,3galattosiltransferasi è un enzima non presente nelle cellule umane ma capace, in cellule della maggior parte degli altri mammiferi, di formare un legame alfa-1,3 tra una molecola di galattosio ed un'altra già presente nella glicosilazione delle proteine. Costruire un vettore di espressione contenente la sequenza codificante per questo enzima permette di ottenere delle cellule umane transfettate in laboratorio ed esprimenti l'epitopo alfa-Gal.

A questo scopo abbiamo ottenuto dalla letteratura la sequenza dell'alfa-1,3-galattosiltransferasi murina ed anche di una coppia di primers in grado di amplificare l'intera sequenza di DNA codificante per l'enzima ed in particolare per la variante di splicing di 1185 basi che si amplifica preferenzialmente; questi primers erano stati utilizzati da altri gruppi sempre allo scopo di clonare questo enzima, ma nel nostro caso sono stati aggiunte le sequenza per i siti di restrizione HindIII (al 5') ed EcoRI (al 3'). Da una porzione di fegato e di rene di topo, ottenuto dallo stabulario dell'Università di Trieste, è stato estratto l'RNA totale, che successivamente è stato trasformato in cDNA utilizzando oligo-dT come primers. Il materiale così ottenuto è stato utilizzato come campione in una reazione di PCR in cui sono stati utilizzati i primers per l'alfa 1,3galattosiltransferasi. L'amplificato è stato purificato dalla banda visualizzata dopo elettroforesi ed il frammento di DNA così ottenuto è stato clonato all'interno del vettore di espressione eucariotico pcDNA3, anch'esso precedentemente purificato, sempre utilizzando i siti di restrizione HindIII ed EcoRI. La sequenza dei tre cloni ottenuti ha evidenziato però la presenza di mutazioni, riportate nella tabella 4.5.1.

Clone	N° base	mutazione	A.A.
1.	260	A→G	F → S
2.	117	C →G	L →V
3.	158	Del GA	-

Tabella 4.5.1 Elenco delle mutazioni presenti nei cloni pcDNA3/alfa 1,3GT

Abbiamo comunque continuato nelle prove funzionali dei vettori, andando ad analizzare l'espressione degli epitopi alfa-Gal; il clone 3 è stato utilizzato come controllo negativo, avendo completamente perso la cornice di lettura dopo la delezione di 2 basi.

Nel nostro laboratorio erano già disponibili cellule endoteliali umane isolate da distretti diversi, quali il microcircolo della cute (ADMEC: Adult Dermal Microvascular Endotelial Cells), il cordone ombelicale (HUVEC: Human Umbelical Vein Endotelial Cells), la decidua (DEC: Decidual Endotelial Cells). Le cellule sono state caratterizzate valutando al FACS l'espressione di specifici marker superficiali e la purezza dei preparati e successivamente congelate in azoto liquido.

Le cellule endoteliali primarie, una volta isolate, sono state utilizzate per mettere a punto una metodica per la loro transfezione *in vitro*. Abbiamo usato molecole fornite da diverse ditte, testate seguendo le istruzioni fornite o modificando i rapporti lipofectamine/DNA e i tempi di incubazione. Come controllo positivo di transfezione è stato utilizzato il vettore pEGFP: nelle cellule transfettate viene espressa una proteina, la GFP (Green Fluorescence Protein), che conferisce una fluorescenza verde. Per la transfezione sono state utilizzate Lipofectamine2000 e DMRIE-C (Invitrogen), Fugene (Roche), jetPEI (Polyplus), acquistate dalle diverse ditte o nuove formulazioni di lipofectamine quali TransIT-LTI (Mirus) e Metafectamine pro (Biontex). I risultati ottenuti purtroppo hanno confermato quanto, in parte, già noto in letteratura per la transfezione delle cellule primarie, ovvero una percentuale di cellule transfettate che non supera il 12%. Al momento si sta valutando l'efficacia di metodi di transfezione alternativi che forzano l'ingresso del vettore attraverso campi magnetici o elettrici, valutando oltre all'efficienza di transfezione anche il grado di mortalità delle cellule.

Per valutare la funzionalità della proteina ricombinante prodotta dai tre cloni prodotti non è stato quindi possibile utilizzare le cellule endoteliali come target della transfezione; sono state quindi transfettate cellule di una linea umana di

carcinoma ovarico, IGROVI, la cui transfezione attraverso Lipofectine 2000, era già stata precedentemente standardizzata nel nostro laboratorio e permette di ottenere oltre il 40% delle cellule transfettate (osservate utilizzando la GFP).

Le cellule tumorali transfettate in maniera transiente con i vettori alfa-1,3galattosiltransferasi-pcDNA3 sono state prima di tutto analizzate per valutare se i tre cloni producono una proteina funzionalmente attiva; a questo scopo è stata effettuata un'ELISA sulle cellule, in cui abbiamo utilizzato una lectina (IB4) biotinilata, che si lega specificamente agli epitopi alfa-gal.

Come si vede nella figura 4.5.1, non risulta esserci espressione di epitopi alfa-Gal nelle cellule transfettate con pEGFP e neppure dove è stato utilizzato il vettore del clone n°3, che avevamo utilizzato come controllo negativo. Gli enzimi prodotti dai cloni 1 e 2 risultano invece attivi nonostante le mutazioni presenti, ed il clone 2 è sembrato essere più attivo in tutte le prove effettuate.

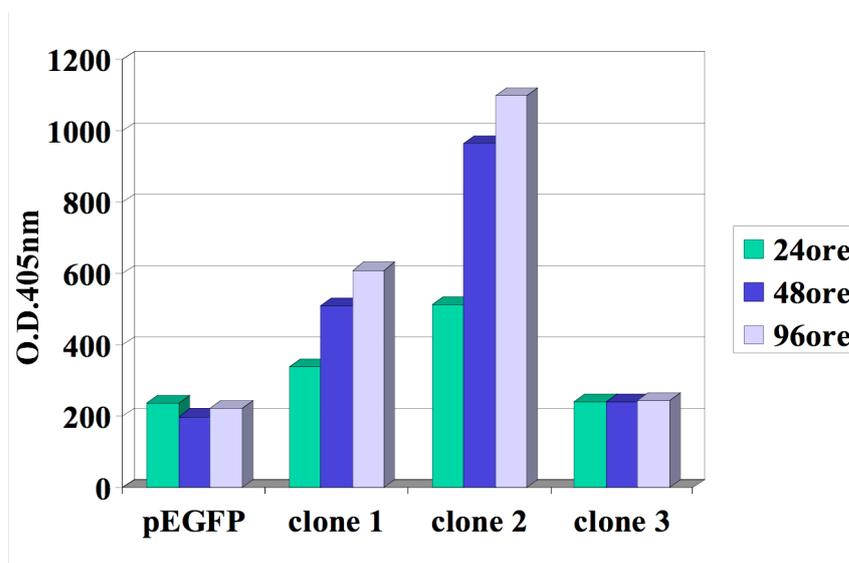


Figura 4.5.1
Valutazione dell'espressione degli epitopi alfa-Gal sulla superficie di IGROV transfettate. IGROVI transfettate con i cloni per l'alfa-1,3GT sono state incubate con IB4-bio, streptavidina fosfatasi e con PNPP. I dati sono stati espressi come media delle densità ottiche valutate a 405nm.

Per migliorare l'espressione dell'alfa-1,3GT è stato successivamente testato il vettore pHygro, già utilizzato anche per la produzione di MB55 ed MB59. La sequenza del clone 2 è stata quindi subclonata all'interno di questo vettore

sfruttando i siti di restrizione BssIII ed HindIII ed uno dei cloni ottenuti, con la stessa sequenza del clone 2, è stato utilizzato per transfettare le cellule IGROVI. L'espressione degli epitopi alfa-Gal è stata ancora una volta analizzata utilizzando la lectina IB4 biotinilata. Confrontando i dati ottenuti transfettando il clone 2 in pcDNA3 o in pHygro si nota un incremento nella quantità dell'enzima prodotto e di conseguenza dell'epitopo sulla superficie delle cellule ottenute con l'ultimo vettore preparato (Fig. 4.5.2).

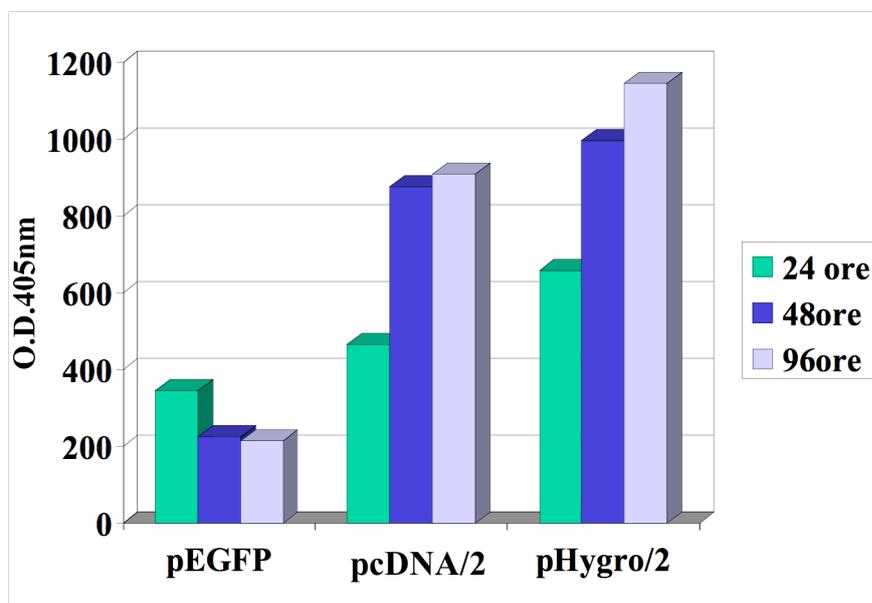


Figura 4.5.2
Valutazione dell'espressione degli epitopi alfa-Gal sulla superficie di IGROVI. IGROVI transfettate con i cloni per l'alfa-1,3GT sono state incubate con IB4-bio, streptavidina fosfatasi e con PNPP. I dati sono stati espressi come media delle densità ottiche valutate a 405nm.

Queste cellule, transfettate in maniera transiente, sono state poi utilizzare per documentare la presenza di immunoglobuline specifiche per l'epitopo alfa-Gal in sieri umani di donatori sani, ottenuti dalla Banca del Sangue dell'Ospedale Maggiore di Trieste. A questo scopo, cellule transfettate con il clone 2 o non transfettate sono state incubate con i sieri umani e successivamente con anticorpi anti-IgM, marcati con la fosfatasi alcalina. Con questa metodica è stato possibile confermare che nel sangue umano circolano anticorpi specifici per l'epitopo alfa-Gal, anche se in maniera variabile nei diversi soggetti e che si legano sulla superficie delle cellule transfettate con alfa1,3GT (Tab. 4.5.2).

	Siero 1	Siero 2	Siero 3	Siero 4	Siero 5	Siero 6
IGROVI	0.390	0.457	0.376	0.413	0.354	0.370
IGROVI/alfa1,3GT	1.451	1.079	1.518	1.953	1.779	1.220

Tabella 4.5.2 Deposito di IgM umane su IGROVI. IGROVI transfettate con il clone 2 per alfa1,3GT sono state incubate con sieri umani (1:10) per 1h a 37°C, con anti-humanIgM marcati con la fosfatasi alcalina e PNPP. I dati sono espressi come la media delle densità ottiche ottenute a 405nm.

La stessa metodica è stata utilizzata anche per valutare se gli anticorpi legati alle cellule transfettate fossero in grado di attivare la cascata complementare. A questo scopo, dopo l'incubazione con il siero numero 4, si sono utilizzati anticorpi anti-C1q, anti-C4 e l'anticorpo aE11 che vede un neo-epitopo del C9 che si forma quando polimerizza all'interno del TCC.

	C1q	C4	TCC
IGROVI	0.296	0.196	0.376
IGROVI/alfa1,3GT	1.451	1.079	0.984

Tabella 4.5.3 Deposito di prodotti di attivazione del complemento su IGROVI. IGROVI transfettate con il clone 2 per alfa1,3GT sono state incubate con siero umano (4) come fonte di complemento per 1h a 37°C, con anticorpi anti-C1q, C4 e C9 polimero (aE11) e successivamente con gli adeguati anticorpi secondari marcati con la fosfatasi alcalina e PNPP. I dati sono espressi come la media delle densità ottiche ottenute a 405nm.

I dati ottenuti e riportati nella tabella 4.5.3 dimostrano come vi sia una specifica attivazione della via classica del complemento sulle cellule transfettate, fino alla formazione del complesso terminale del complemento. Il risultato dell'azione del

complemento dovrebbe essere la morte delle cellule per lisi osmotica; effettuando un saggio MTT sulle cellule trattate con uno dei sieri studiati in precedenza (siero n°4), è stato possibile valutare il numero delle cellule vitali residue e di conseguenza calcolare la percentuale delle morte, preso come 100% il numero dei IGROVI transfettate e non trattate. Il siero ha un effetto minimo sulle cellule non transfettate, lisandone circa l'8%, mentre elimina in media il 38% delle IGROV/alfa1,3GT (Tab 4.5.4).

	No siero+ siero4	
IGROVI	1%	8%
IGROVI/alfa1,3GT	0%	38%

Tabella 4.5.4 CDC di IGROVI. IGROVI transfettate con il clone 2 per alfa1,3GT sono state incubate con siero umano (4) come fonte di complemento per 1h a 37°C. La vitalità delle cellule residue è stata misurata dopo 1h a 37°C usando il saggio MTT e la percentuale di cellule morte è stata calcolata.

5. Discussione e conclusione

Il sistema del complemento si sta ritagliando uno spazio sempre maggiore nella terapia dei tumori, in particolare da quando è stato introdotto in clinica l'uso degli anticorpi monoclonali. Il fatto che sia composto essenzialmente da proteine solubili nei liquidi biologici e che permetta l'eliminazione diretta delle cellule bersaglio ne fanno un meccanismo d'azione ideale ma non ancora sfruttato a pieno. Da qui partono i nostri sforzi per cercare di migliorare un'attivazione complementare specifica sulle cellule tumorali e sviluppare strategie che possano essere applicate in maniera sinergica a tutti gli anticorpi anti-tumorali che sono entrati o entreranno nella pratica clinica.

Le caratteristiche della cascata complementare e della sua attivazione nell'immunoterapia dei tumori sono state recentemente discusse nella review di seguito riportata, che fa il punto su quella che, ad oggi, è la nostra esperienza nello studio di questa parte dell'immunità innata e del suo ruolo nell'immunoterapia dei tumori.

5.1 Ruolo del complemento nell'immunoterapia dei tumori

Macor P. and Tedesco F. "Complement as effector system in cancer immunotherapy" *Immunol Lett.* 2007 111 (1): 6-13.

Imm lett I

Imm lett2

Imm lett3

Imm lett4

Imm lett5

Imm lett6

Imm lett7

Imm lett8

Gli esperimenti nei modelli *in vitro* di carcinoma ovarico, di linfoma e di leucemia linfatica cronica indicano che è possibile migliorare l'attivazione del complemento. Gli sforzi maggiori nell'immunoterapia dei tumori sono sicuramente rivolti a individuare i target che caratterizzano la cellula tumorale, ma, una volta individuati, è sicuramente utile sviluppare uno o più anticorpi che si legano a epitopi diversi di queste molecole; infatti, come evidenziato con cMOVI8 e cMOVI9, due monoclonali chimerici che legano in maniera specifica il FR; l'utilizzo di una miscela di anticorpi garantisce un maggior legame di C1q e quindi una maggior attivazione della via classica del complemento. Anche contro altre molecole si inizia a sviluppare più di un anticorpo contro epitopi diversi. Un esempio è il CD20, a cui si lega Rituximab, ma contro cui si stanno sviluppando diversi anticorpi umani o umanizzati; al momento sono in corso i trial clinici per valutare l'efficacia di queste molecole utilizzate singolarmente, ma sarà sicuramente utile valutare la sinergia di tutte le molecole disponibili.

Più difficile, ovviamente, è individuare almeno due antigeni associati allo stesso tumore, come nel caso di CD20 e CD52 su cellule di linfoma o di leucemia linfatica cronica (che rappresentano più che altro marker di differenziazione di queste cellule), in modo da poter utilizzare almeno un anticorpo contro ogni molecola. Anche in questa maniera abbiamo infatti dimostrato che è possibile migliorare l'azione del complemento ed aumentare il numero di cellule tumorali eliminate. CD20 e CD52 sono sicuramente due molecole con caratteristiche adatte a questo scopo: Ag associati al tumore già caratterizzati e con la peculiarità di concentrarsi all'interno dei "lipid rafts" quando sono legati agli anticorpi. Rituximab e Campath-1H sono i due anticorpi utilizzati in clinica e che si legano a queste molecole. Il primo ha migliorato notevolmente il trattamento dei tumori onco-ematologici, ed in particolare dei linfomi B Non-Hodgkin's, soprattutto senza evidenziare grossi effetti collaterali. Il secondo è indicato nella terapia delle leucemie linfatiche croniche; purtroppo CD52 è un marker pan-linfocitario e quindi la specificità d'azione del Campath-1H non è ideale. Questo comporta, oltre alla lisi delle cellule tumorali, anche quella di altre cellule quali linfociti T,

cellule NK, ecc. e di conseguenza il rilascio delle componenti citoplasmatiche di queste cellule. Questo causa molti effetti collaterali a livello sistemico e non tutti i pazienti riescono a portare a termine il trattamento. Oltre all'incremento delle cellule eliminate, uno dei possibili vantaggi nell'utilizzo della miscela di Rituximab e Campath-1H può essere quello di permettere la riduzione del dosaggio di Campath-1H e, probabilmente, anche i suoi effetti collaterali.

Il primo approccio del nostro laboratorio all'immunoterapia dei tumori è stata la caratterizzazione degli inibitori di membrana del complemento che limitano l'azione complemento-mediata del Rituximab. Ci siamo interessati in particolar modo di linee cellulari di linfoma ed abbiamo visto come CD46, nonostante sia espresso sulla superficie di queste cellule, non interferisca nella CDC. Diverso il discorso di CD55 e di CD59 che, una volta bloccati con specifici anticorpi monoclonali murini, rendono le cellule tumorali più sensibili all'azione del complemento. Entrambe queste molecole sono legate alla membrana cellulare mediante una coda-GPI, come il CD52; questo porta alla loro concentrazione all'interno dei "lipid rafts" e quindi proprio nella zona in cui si ha l'attivazione del complemento da parte di Rituximab.

Da qui è partita la collaborazione con il laboratorio del prof Marzari per isolare da librerie fagiche anticorpali dei frammenti anticorpali umani che permettessero di bloccare i due inibitori di membrana e che potenzialmente potessero venir utilizzati nell'uomo. Lo screening della libreria fagica anticorpale ha permesso di isolare diversi cloni diretti contro le due molecole e, fortunatamente, due si sono dimostrati in grado di bloccare l'azione di CD55 e CD59. La caratterizzazione *in vitro* ha permesso di evidenziare l'effetto sinergico con Rituximab, non solo nell'attivazione del complemento (non dovuta ad un maggior numero di frammenti Fc sulla superficie cellulare ma al blocco degli inibitori) ma anche nell'indurre ADCC delle cellule tumorali. Al momento non è ancora stata valutata l'azione via CDCC, ma si può ipotizzare, come da noi dimostrato nel carcinoma ovarico e, da altri, in modelli diversi, che un incremento del deposito di

complemento porti anche ad un miglioramento dell'azione di questo meccanismo effettore. Sicuramente però l'effetto sinergico degli anticorpi isolati, denominati MB55 ed MB59, ha permesso di dimostrare, in un modello di linfoma in topi SCID, che anche *in vivo* è importante bloccare gli inibitori di membrana del complemento per permettere alla terapia anticorpale di funzionare al meglio e che è possibile farlo utilizzando gli anticorpi isolati. Per essere utilizzati *in vivo* però MB55 ed MB59 devono essere indirizzati in maniera specifica sulle cellule tumorali. A questo scopo noi abbiamo messo a punto una metodica che utilizza gli anticorpi legati alla biotina, e l'avidina come ponte tra le molecole. Iniezioni successive permettono inizialmente al Rituximab-bio di legare le cellule tumorali, successivamente all'avidina di localizzarsi sul Rituximab-bio (e quindi sulle cellule tumorali) e poi ai minibody-bio di raggiungerli, sfruttando sempre l'elevatissima affinità tra biotina ed avidina ed il fatto che ogni avidina ha 4 siti di legame per la biotina. MB55 ed MB59, come tutti gli anticorpi isolati da libreria fagica, non hanno un'elevata affinità per CD55 e CD59 e quindi è molto più probabile che il legame biotina-avidina li concentri sulle cellule tumorali piuttosto che rimangano in circolo o si leghino in maniera aspecifica su altre cellule, quali per esempio i globuli rossi. Questa metodica sembra funzionare molto bene sia *in vitro* che *in vivo* ma non è sicuro che si possa trasferire all'uomo; questa viene sì utilizzata in trattamenti acuti, per esempio in sede operatoria per trasportare un elevato carico di chemio- o radio-terapici sulle cellule residue, ma un trattamento ripetuto, come quello richiesto dall'immunoterapia passiva, porta sicuramente allo sviluppo di una risposta immunitaria contro l'avidina. Diversi gruppi stanno isolando molecole naturali o producendo avidine ricombinanti molto meno immunogeniche, ma il loro utilizzo è ovviamente ancora da valutare. Per ovviare a questo problema in questo momento stiamo sviluppando un anticorpo bispecifico che porti da un lato la specificità del Rituximab e dall'altra la capacità dei minibody isolati di bloccare CD55 o CD59.

Il problema principale nell'immunoterapia dei tumori rimane quello del targeting. L'utilizzo di cellule endoteliali sembra evidenziare come queste possano localizzarsi in maniera specifica sui vasi tumorali che si stanno sviluppando e, di per sè, rappresenta quindi un buon meccanismo di targeting. Attaccare queste cellule, una volta che si sono stabilizzate nel microambiente tumorale, è inoltre una maniera per agire in modo specifico sui vasi tumorali, inducendo oltre ad un effetto anti-angiogenetico, anche un aumento della permeabilità vascolare, che porta alla fuoriuscita degli anticorpi e dei meccanismi effettori circolanti. Sono state studiate diverse strategie per attaccare le cellule endoteliali da iniettare; un esempio è la possibilità di transfettarle *in vitro* con un vettore codificante per il CD20, iniettarle *in vivo* in un animale che sta sviluppando un tumore e lisarle sfruttando il Rituximab e l'azione del complemento. Purtroppo le cellule endoteliali sono estremamente protette dall'attivazione complementare e quindi l'effetto di Rituximab non è stato sufficiente.

Il danno vascolare indotto da un'iper-attivazione complementare è il principale problema che si ha nel rigetto degli xenotrapianti ed è essenzialmente dovuto agli epitopi alfa-Gal presenti sulla superficie delle cellule animali ed agli anticorpi che l'uomo ha sviluppato contro questo bersaglio. Abbiamo quindi voluto sviluppare un vettore che porta l'informazione per l'enzima che, nel topo, produce questo epitopo, utilizzarlo per transfettare cellule endoteliali umane e dimostrare, per il momento *in vitro* che questa metodica è in grado di lisare queste cellule. Il problema principale evidenziato nel corso degli esperimenti è la metodica per transfettare colture primarie di cellule endoteliali, indipendentemente dal fatto che queste siano isolate dal cordone ombelicale o da altri distretti. Per validare l'azione dei vettori prodotti ci siamo quindi spostati sulla transfezione di altre cellule umane, come le IGROVI, che comunque crescono in adesione e sono facilmente maneggiabili. Esperimenti effettuati sfruttando il vettore per la GFP indicano che circa il 40% delle cellule vengono transfettate; i dati di CDC indicano circa il 38% delle cellule transfettate vengono lisate dal siero umano (fonte di anticorpi anti alfa-Gal e di complemento) ed mostrano come, praticamente tutte le cellule che

esprimono l'epitopo vengono eliminate. Gli esperimenti sono in corso per confermare i dati anche sulle cellule endoteliali umane, in particolare quelle purificate dalla cute e (che potrebbero essere il target utilizzato in una terapia cellulare "autologa"). Si sta inoltre lavorando per subclonare la sequenza che codifica per l'enzima alfa-1,3GT in un vettore con promotore inducibile, necessario per far esprimere gli epitopi alfa-Gal solo dopo che le cellule endoteliali hanno raggiunto i vasi tumorali.

L'esperienza fatta in questi anni, la collaborazione con altri gruppi di ricerca e/o vicini alla clinica, hanno evidenziato come ci siano i mezzi per sfruttare adeguatamente l'immunoterapia dei tumori ed in particolare il sistema del complemento come meccanismo effettore e di amplificazione della risposta immunologica. Il bersaglio principale al momento lo si può individuare nella malattia residua agli attuali standard terapeutici e non nelle masse tumorali, la cui eliminazione rimane a carico della chirurgia. Purtroppo però non sono ancora stati individuati degli antigeni associati a molti tipi di tumore e molto lavoro richiede anche la caratterizzazione della presenza di tutti i componenti complementari e dei diversi meccanismi effettori nel microambiente in cui si sviluppa il tumore o in cui si localizzano le sue metastasi.

6. Bibliografia

1. Goldsby RA, Kindt TJ, and Osborne BA *Kuby Immunologia*, 2000.
2. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-34.
3. Boyd J Molecular genetics of hereditary ovarian cancer. *In: Huntingt (ed.), Oncology*, 1998.
4. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
5. Welsh PL and King MC BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 705-13.
6. Connell P, Kao J, and Milano M Tumori dell'ovaio. *In: CIC (ed.), Oncologia Medica*, 2006.
7. Kirby TO, Huh W, and Alvarez R Immunotherapy of ovarian cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2002; 2: 409-17.
8. Sharma S and Odunsi K Targeted therapy for epithelial ovarian cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2005; 9: 501-13.
9. Sabbatini P and Odunsi K Immunologic approaches to ovarian cancer treatment. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2884-93.
10. Roitt I *Immunologia*. 1996.
11. Elgert KD *Immunologia: comprendere il sistema immunitario*, 2002.
12. Trikha M, Yan L, and Nakada MT Monoclonal antibodies as therapeutics in oncology. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 609-14.
13. Cotran R, Kumar V, and Collins T *Pathologic basis of disease*, Sesta edizione edition: Saunders Company, 1999.
14. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000; 95: 3900-8.
15. Press OW, Leonard JP, Coiffier B, Levy R, and Timmerman J Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2001; 221-40.
16. Robak T Alemtuzumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *BioDrugs* 2005; 19: 9-22.
17. Basaran A and Tuncer ZS SLE and CA-125. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 444-5; author reply 6.
18. Wilkinson RW, Ross EL, Lee-MacAry AE, et al. A transgenic mouse model for tumour immunotherapy: induction of an anti-idiotypic response to human MUC1. *Br J Cancer* 2000; 83: 1202-8.
19. Reginald H. Garrett CMG *Biochimica con aspetti molecolari della biologia cellulare*. *In: Z. Editore (ed.), 1998*.
20. Miotti S, Bagnoli M, Ottone F, et al. Simultaneous activity of two different mechanisms of folate transport in ovarian carcinoma cell lines. *J Cell Biochem* 1997; 65: 479-91.
21. Coney LR, Tomassetti A, Carayannopoulos L, et al. Cloning of a tumor-associated antigen: MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein. *Cancer Res* 1991; 51: 6125-32.
22. Neglia F, Orengo AM, Cilli M, et al. DNA vaccination against the ovarian carcinoma-associated antigen folate receptor alpha (FRalpha) induces cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice. *Cancer Gene Ther* 1999; 6: 349-57.

23. Toffoli G, Cernigoi C, Russo A, et al. Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int J Cancer* 1997; 74: 193-8.
24. Toffoli G, Russo A, Gallo A, et al. Expression of folate binding protein as a prognostic factor for response to platinum-containing chemotherapy and survival in human ovarian cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 121-6.
25. Coney LR, Mezzanzanica D, Sanborn D, et al. Chimeric murine-human antibodies directed against folate binding receptor are efficient mediators of ovarian carcinoma cell killing. *Cancer Res* 1994; 54: 2448-55.
26. Spiridon CI, Ghetie MA, Uhr J, et al. Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1720-30.
27. Marvin DA, Hale RD, Nave C, and Helmer-Citterich M Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages Ff (fd, fl, M13), Ifl and IKe. *J Mol Biol* 1994; 235: 260-86.
28. Gailus V and Rasched I The adsorption protein of bacteriophage fd and its neighbour minor coat protein build a structural entity. *Eur J Biochem* 1994; 222: 927-31.
29. Sblattero D and Bradbury A Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 75-80.
30. Azzazy HM and Highsmith WE, Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 2002; 35: 425-45.
31. Hudson PJ Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 548-57.
32. Brekke OH and Sandlie I Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 52-62.
33. von Mehren M, Adams GP, and Weiner LM Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annu Rev Med* 2003; 54: 343-69.
34. Funaro A, Horenstein AL, Santoro P, et al. Monoclonal antibodyies and therapy of human cancer. *Biothechnol Adv* 2000; 18: 385-401.
35. Lu Y and Low PS Immunotherapy of folate receptor-expressing tumors: review of recent advances and future prospects. *J Control Release* 2003; 91: 17-29.
36. Reff ME, Hariharan K, and Braslawsky G Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Control* 2002; 9: 152-66.
37. Muller-Eberhard H (ed.) *Complement: chemistry and pathways*, p. 21-53: Raven Press LTD, NY, 1998.
38. Volanakis JE and Frank MM *The human complement system in healyh and disease*: Mercel Dekker, 1998.
39. Morgan BP and Walport MJ *Complement deficiency and disease*. *Immunol Today* 1991; 12: 301-6.
40. Rother K, Till GO, and Hansh GM *The complement system*: Springer, 1997.
41. Langeggen H, Pausa M, Johnson E, Casarsa C, and Tedesco F The endothelium is an extrahepatic site of synthesis of the seventh component of the complement system. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 69-76.
42. Tedesco F, Bulla R, and Fischetti F Terminal Complement Complex: Regulation of Formation and Phatophysiological Function. *In: J. Szebeni (ed.), The Complement System: Novel rules in health and disease*, pp. 97-127, 2004.
43. Garred P, Hetland G, Mollnes TE, and Stoervold G Synthesis of C3, C5, C6, C7, C8, and C9 by human fibroblasts. *Scand J Immunol* 1990; 32: 555-60.
44. Langeggen H, Berge KE, Macor P, et al. Detection of mRNA for the terminal complement components C5, C6, C8 and C9 in human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Apmis* 2001; 109: 73-8.

45. Kitano E and Kitamura H Synthesis of the third component of complement (C3) by human gastric cancer-derived cell lines. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 273-8.
46. Barnum SR, Ishii Y, Agrawal A, and Volanakis JE Production and interferon-gamma-mediated regulation of complement component C2 and factors B and D by the astrogloma cell line U105-MG. *Biochem J* 1992; 287 (Pt 2): 595-601.
47. Abbas AK, Lichtman AH, and Pober J *Cellular and Molecular Immunology*: Saunders, 2002.
48. Wong NK, Kojima M, Dobo J, Ambrus G, and Sim RB Activities of the MBL-associated serine proteases (MASPs) and their regulation by natural inhibitors. *Mol Immunol* 1999; 36: 853-61.
49. Nicholson-Weller A and Halperin JA Membrane signaling by complement C5b-9, the membrane attack complex. *Immunol Res* 1993; 12: 244-57.
50. Verhoef J The phagocytic process and role of complement in host defence. *J Chemother* 1991; 3: 93-7.
51. Hugli TE *Biochemistry and biology of anaphylatoxins*. Complement 1987; 111-27.
52. Kohl J Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol* 2001; 38: 175-87.
53. Hurley JV Incubation of serum with tissue extracts as a cause of chemotaxis of granulocytes. *Nature* 1963; 198: 1212-3.
54. Fernandez HN, Henson PM, Otani A, and Hugli TE Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J Immunol* 1978; 120: 109-15.
55. Ember JA, Jagels MA, and Hugli TE Characterization of complement anaphylatoxin and their biological response. *In: J. E. Volanakis and M. M. Frank (eds.), The human complement system in health and disease*, pp. 167-202: Mercel Dekker, 1998.
56. Dobrina A, Pausa M, Fischetti F, et al. Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. *Blood* 2002; 99: 185-92.
57. Tedesco F, Pausa M, Nardon E, et al. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med* 1997; 185: 1619-27.
58. Meri S and Jarva H Complement regulation. *Vox Sang* 1998; 74 Suppl 2: 291-302.
59. Miwa T and Song WC Membrane complement regulatory protein: insight from animal studies and relevance to human diseases. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 445-59.
60. Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, and Atkinson JP control of complement system. *Adv Immunol* 1996; 61: 201.
61. Medof ME, Lublin DM, Holers VM, et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding the complete sequence of decay-accelerating factor of human complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 2007-11.
62. Ballard LL, Bora NS, Yu GH, and Atkinson JP Biochemical characterization of membrane cofactor protein of the complement system. *J Immunol* 1988; 141: 3923-9.
63. Meri S, Morgan BP, Wing M, et al. Human protectin (CD59), an 18-20-kD homologous complement restriction factor, does not restrict perforin-mediated lysis. *J Exp Med* 1990; 172: 367-70.
64. Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD, and Gorter A Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol* 2004; 25: 158-64.
65. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 2002; 99: 1517-26.
66. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 203-13.

67. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-4.
68. Yee C, Thompson JA, Byrd D, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16168-73.
69. Alexander RB and Rosenberg SA Long-term survival of adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocytes in mice. *J Immunol* 1990; 145: 1615-20.
70. Kono K, Takahashi A, Ichihara F, et al. Prognostic significance of adoptive immunotherapy with tumor-associated lymphocytes in patients with advanced gastric cancer: a randomized trial. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1767-71.
71. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1159-66.
72. Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM, et al. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2521-9.
73. Dreno B, Nguyen JM, Khammari A, et al. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 539-46.
74. Ho WY, Blattman JN, Dossett ML, Yee C, and Greenberg PD Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction. *Cancer Cell* 2003; 3: 431-7.
75. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270: 475-80.
76. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997; 276: 1719-24.
77. Park JR, Digiusto DL, Slovak M, et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther* 2007; 15: 825-33.
78. Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* 2006; 24: e20-2.
79. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1593-603.
80. Moore XL, Lu J, Sun L, et al. Endothelial progenitor cells' "homing" specificity to brain tumors. *Gene Ther* 2004; 11: 811-8.
81. Liotta LA and Kohn EC The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-9.
82. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7: 1194-201.
83. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109: 337-46.
84. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-7.
85. Ojefo JO, Su N, Ryan US, et al. Towards endothelial-cell-directed cancer immunotherapy: in vitro expression of human recombinant cytokine genes by human and mouse primary endothelial cells. *Cytokines Mol Ther* 1996; 2: 89-101.

86. Lal B, Indurti RR, Couraud PO, Goldstein GW, and Laterra J Endothelial cell implantation and survival within experimental gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9695-9.
87. Wernert N The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* 1997; 430: 433-43.
88. Roni V, Habeler W, Parenti A, et al. Recruitment of human umbilical vein endothelial cells and human primary fibroblasts into experimental tumors growing in SCID mice. *Exp Cell Res* 2003; 287: 28-38.
89. Stellner K, Saito H, and Hakomori SI Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. Aminosugar linkages of ceramide pentasaccharides of rabbit erythrocytes and of Forssman antigen. *Arch Biochem Biophys* 1973; 155: 464-72.
90. Eto T, Ichikawa Y, Nishimura K, Ando S, and Yamakawa T Chemistry of lipid of the posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. XVI. Occurrence of ceramide pentasaccharide in the membrane of erythrocytes and reticulocytes of rabbit. *J Biochem* 1968; 64: 205-13.
91. Galili U The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie* 2001; 83: 557-63.