

Dottorato di Ricerca in Oncologia, Ematologia e Patologia

Ciclo XXXIII

Settore Concorsuale: 06/D3

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15 – Malattie del Sangue

**Ruolo del Microbiota Intestinale Nella Risposta al
Trattamento con Anticorpi anti Checkpoints
Immunitari in Pazienti Affetti da Linfoma**

Presentata da: **Dott.ssa Beatrice Casadei**

Coordinatore Dottorato
**Prof.ssa
Manuela Ferracin**

Supervisore:
**Prof.
Pier Luigi Zinzani**

Esame finale anno 2021

INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1. IL SIGNALLING DI PROGRAMMED DEATH 1 (PD-1)

- 1.1 Il ruolo fisiologico di PD-1 nella risposta immunitaria
 - 1.1.1 Espressione e caratteristiche strutturali di PD-1 e dei suoi ligandi (PD-Ls)
 - 1.1.2 La via PD-1/PD-Ls nella regolazione dell'attività linfocitaria
- 1.2 Il ruolo di PD-1 nell'evasione della risposta immunitaria antitumorale
 - 1.2.1 Regolazione dell'espressione di PD-Ls sulle cellule neoplastiche
 - 1.2.2 Caratterizzazione dell'interazione tra PD-1 e PD-Ls nel microambiente tumorale

CAPITOLO 2. IL RUOLO DEGLI INIBITORI DEI CHECKPOINTS IMMUNITARI NEL TRATTAMENTO DEL LINFOMA DI HODGKIN E DEL LINFOMA PRIMITIVO DEL MEDIASTINO

- 2.1 Il linfoma primitivo del mediastino (PMBCL)
 - 2.1.1 La via di PD-1/PD-Ls nel PMLBCL
- 2.2 Il linfoma di Hodgkin (LH)
 - 2.2.1 La via di PD-1/PD-Ls nel LH, variante classica
- 2.3 PD1 come bersaglio terapeutico nei linfomi: risultati

CAPITOLO 3. MICROBIOTA INTESTINALE, CARCINOGENESI ED IMMUNOTERAPIA

- 3.1 Panoramica sul microbiota intestinale umano
- 3.2 Interazione tra microbiota e sistema immunitario
- 3.3 Il microbiota intestinale modula la risposta e la tossicità alla chemioterapia
- 3.4 Microbiota intestinale ed inibitori dei checkpoint immunitari

CAPITOLO 4. PROGETTO DI RICERCA

- 4.1 Introduzione
- 4.2 Scopo del lavoro
- 4.3 Materiali e metodi
- 4.4 Risultati

CAPITOLO 5. CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

L'interazione tra il sistema immunitario dell'ospite e la cellula tumorale rappresenta uno degli elementi cardine nello sviluppo del clone neoplastico: la capacità della cellula cancerosa di evadere il controllo immunitario sfruttando meccanismi fisiologici, come i checkpoint immunitari, è alla base di diverse neoplasie, incluse le sindromi linfoproliferative. Lo sviluppo di anticorpi monoclonali (mAb) umanizzati che bloccano selettivamente l'interazione tra il recettore trans-membrana *programmed death-1* (PD-1) ed i propri ligandi *programmed death-ligand 1* e *programmed death-ligand2* (PD-L1 e PD-L2), modulando la risposta T linfocitaria nei confronti delle cellule neoplastiche, rappresenta una delle scoperte terapeutiche più promettenti in ambito onco-ematologico. Nonostante l'importante efficacia antitumorale degli anticorpi anti-checkpoint immunitari (CPI) dimostrata dai differenti studi clinici condotti sia in ambito oncologico che ematologico, una parte dei pazienti, a parità di patologia e di farmaco ricevuto, non risponde alla terapia o sviluppa eventi avversi immuno-relati. La comprensione della variabilità di risposta dimostrata dai pazienti con stessa patologia, sottoposti a stesso trattamento rappresenta pertanto un punto chiave, allo scopo di identificare strategie che possano potenziare l'efficacia terapeutica di tali anticorpi, riducendone gli effetti collaterali. Studi recenti hanno evidenziato il ruolo del microbiota intestinale (MI) nel modellare la risposta immunitaria sistemica e, nel contesto neoplastico, nel mediare e modificare l'attivazione del sistema immunitario ad agenti chemio-immunoterapici. È noto che, il microbiota sia un ecosistema plastico in grado di riorganizzare la propria funzionalità e composizione in maniera adattativa, in risposta a diversi fattori ambientali. La struttura individuale del microbiota intestinale e la sua dinamicità temporale possono, pertanto, influenzare l'outcome delle chemio-immunoterapie onco-ematologiche, modulandone l'efficacia e la tossicità. In questo scenario, ipotizziamo che la caratterizzazione longitudinale (pre, durante e post-terapia) del microbiota intestinale, di pazienti affetti da linfoma, trattati con CPI e la sua correlazione sia con la risposta al trattamento che con lo sviluppo di eventi avversi, possa avere un ruolo nel delineare l'outcome di tali pazienti e nell'identificare nuovi criteri di stratificazione del rischio.

CAPITOLO 1. IL SIGNALLING DI PROGRAMMED DEATH 1 (PD-1)

La scoperta di *Programmed death-1* risale al 1992, quando il gruppo di lavoro del Professor Honjo, dell'università di Kyoto, identificò PD-1 come gene associato all'apoptosi cellulare¹. Solo successivamente, lo stesso gruppo di lavoro, dimostrò che l'espressione di PD-1 non era direttamente associata al meccanismo di apoptosi, bensì ad una più fine regolazione del ciclo cellulare alla base dello sviluppo della fisiologica risposta immunitaria². PD-1 infatti, è una proteina transmembrana che viene espressa dai linfociti B e T in seguito alla loro attivazione, secondaria al riconoscimento dell'antigene da parte dei rispettivi recettori. In particolare, l'espressione di PD-1 causa un'inibizione della risposta immune B e T mediata, modulando la tolleranza sia centrale che periferica. La scoperta, negli anni 2000, che i ligandi di PD-1 (PD-1Ls) sono espressi non solo sulla superficie delle cellule dell'immunità innata, ma anche su cellule neoplastiche e su cellule presentanti l'antigene del microambiente tumorale e che il legame tra PD-1, espresso sui linfociti T, ed i rispettivi ligandi determina una inibizione dell'attività linfocitaria stessa, ha corroborato maggiormente il concetto di *escape* immunologico da parte del clone neoplastico, portando allo sviluppo di anticorpi monoclonali diretti contro PD-1 o PD-1Ls. L'utilizzo di tali anticorpi nel trattamento di varie neoplasie, sia solide che ematologiche, ha comportato sicuramente una rivoluzione terapeutica nell'ambito dell'immunoterapia³.

1.1 IL RUOLO FISIOLOGICO DI PD-1 NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

1.1.1 Espressione e caratteristiche strutturali di PD-1 e dei suoi ligandi (PD-Ls)

PD-1 (*alias* CD279) è una glicoproteina trans-membrana di tipo I, appartenente alla famiglia dei recettori co-stimolatori CD28, codificata dal gene *PDCDI*, localizzato sul cromosoma 2q37.3. Tale recettore è costituito da: 1) un singolo dominio variabile extracellulare, 2) da un dominio glicoproteico transmembrana, che permette l'internalizzazione del segnale, e 3) da una frazione citoplasmatica, responsabile del legame con le proteine di cascata del segnale. Il dominio intracellulare di PD-1 è costituito da due residui tirosinici, siti di fosforilazione, uno prossimale ITIM (*immunereceptor tyrosine-based inhibition motif*) e uno distale ITSM (*immunereceptor tyrosine-based switch motif*), fondamentali per il legame con le fosfatasi SHP-1 e SHP-2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 – 2*), responsabili dell'azione inibitoria di PD-

1^{1,4}. Anche *programmed death ligand 1* (PD-L1, *alias* B7-H1 o CD274) e *programmed death ligand 2* (PD-L2, *alias* B7-DC o CD273), ligandi di PD-1, sono delle glicoproteine trans-membrana, ma appartenenti alla famiglia B7, con un dominio extracellulare formato da una regione comune e una variabile. I due ligandi presentano un'omologia strutturale pari al 40% e sono codificati rispettivamente dai geni *CD274* e *PDCD1LG2*, localizzati entrambi sul cromosoma 9p24.1^{5,6}. L'espressione di PD-1 e dei suoi ligandi caratterizza molte cellule dell'immunità, sia innata che adattativa, nonché cellule tumorali, e sembra essere regolata sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale. In particolare, PD-1 è principalmente espresso sulla superficie di linfociti T attivati, sia CD4+ che CD8+, ma anche a livello delle cellule B, dei monociti, delle cellule natural killer (NK) e di alcune cellule dendritiche (*dendritic cells*, DCs)^{1,4,7}. Al contrario, PD-1 non viene normalmente espresso dai linfociti T naive, nè da quelli a "riposo", infatti, la sua espressione fa seguito ad un'adeguata stimolazione antigenica e all'attivazione del recettore delle cellule T (*T cell receptor*, TCR). Sebbene sia PD-L1 sia PD-L2 leghino lo stesso recettore, inviando un segnale inibitorio alla cellula bersaglio, il loro pattern di espressione cellulare è differente. PD-L1 è costitutivamente espresso sulla superficie di numerose cellule del sistema immunitario, come i linfociti B, T, le DCs, i monociti-macrofagi, le cellule staminali mesenchimali e le mast-cellule; ma è anche espresso in diversi tessuti non ematopoietici come il polmone, l'endotelio vascolare, il fegato, le insule pancreatiche e la placenta. Questa espressione tissutale gioca un ruolo importante nella regolazione della risposta immunitaria a livello periferico⁶⁻⁹. Al contrario, l'espressione di PD-L2 è ristretta alle cellule presentanti l'antigene (*antigen presenting cells*, APCs) attivate, che comprendono le DCs, i monociti e i macrofagi^{5,6}. Nel timo PD-L1 è espresso diffusamente a livello della corteccia, mentre l'espressione di PD-L2 è ristretta alle cellule dello stroma midollare. PD-1 viene espresso sulla superficie dei timociti doppi negativi (CD4- e CD8-) dove gioca un ruolo chiave per la loro normale selezione; PD-1 partecipa inoltre alla selezione del repertorio del TCR, controllandone l'avidità del segnale, dopo il riconoscimento con l'antigene. In particolare, il legame PD-1/PD-L1 ha un ruolo nella selezione positiva del recettore^{10,11}. La differente espressione cellulare fa capire che PD-1 e i suoi ligandi regolano fisiologicamente un'ampia gamma di risposte immunitarie e giocano un ruolo chiave nello sviluppo sia della tolleranza centrale, ma soprattutto di quella periferica^{11,12}. In particolare, l'interazione PD-1/PD-Ls, che s'instaura tra le cellule presentanti l'antigene e i linfociti T, ha lo scopo fondamentale di modulare l'intensità e l'*outcome* di ciascuna risposta immunitaria, prevenendo la self-reattività. Lo studio su

modelli animali ha confermato questa ipotesi: topi privati di PD-1 sviluppano differenti fenotipi autoimmuni (cardiomiopatie, diabete mellito, sindromi lupus-like e nefriti) oltre che un aumentato rischio tumorale¹³⁻¹⁶.

L'espressione di PD-1, come precedentemente accennato, non è caratteristica peculiare solo delle cellule T, ma interessa anche i linfociti B, determinando un'inibizione nella trasmissione intracellulare del segnale, dato dall'attivazione del recettore delle cellule B (*B cell receptor*, BCR). L'attivazione di SHP2, infatti, de-fosforila le proteine chiave della via di PI3K, la proteina di segnale Syc e la fosfolipasi C (PLC), con conseguente ritardo nella crescita cellulare, nella mobilitazione del calcio e nella produzione di anticorpi¹⁷. Infine, è sempre più evidente come PD-1 sia espresso anche a livello di cellule dell'immunità innata, tra cui le cellule del sistema macrofagico, i linfociti NK e le cellule linfoidi innate (ILCs, *innate lymphoid cells*). In particolare, PD-1 è espresso sulle ILCs di tipo 2 residenti in vari tessuti e responsabili dell'omeostasi e della regolazione immunitaria del tessuto stesso (cute, mucosa gastro-intestinale, tessuto adiposo, ecc.). È stato inoltre dimostrato, attraverso modelli tumorali murini, che il microambiente tumorale è popolato sia da cellule NK che da ILCs2 esprimenti il PD-1. È in questo contesto che l'utilizzo di un inibitore del PD-1 può favorire l'attivazione di linfociti dell'immunità innata, aumentando così la risposta antitumorale¹⁸⁻²⁰.

Considerando l'importanza clinico-patologica di queste molecole, vi è un grande interesse in ambito scientifico in merito ai meccanismi di regolazione alla base della loro espressione. Come precedentemente accennato, PD-1 è up-regolato sui linfociti T e B in seguito all'attivazione del segnale mediato dal TCR o dal BCR e la sua espressione è sostenuta da numerose citochine come il fattore di necrosi tumorale (TNF), l'interferone alfa (IFN- α) e alcune interleuchine (IL-2, IL-7, IL-15, IL-21)²¹. Differenti meccanismi di regolazione trascrizionale hanno un ruolo nell'espressione di PD-1: il fattore di trascrizione T-bet, dopo ripetuta stimolazione antigenica, è down-regolato permettendo l'espressione di PD1, mentre il fattore NFATc1 (*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic-1*) promuove direttamente la trascrizione del gene per PD-1, in seguito all'attivazione della cellula T. Le interleuchine 6 e 12 (attraverso la via di segnale STAT3 e STAT4) possono indurre la trascrizione di PD-1 mediante elementi regolatori distali che interagiscono con il promotore di PD-1, mentre IFN- α attraverso la fosforilazione delle proteine STAT1/2 e la loro interazione nucleare con le sequenze di DNA responsive all'interferone (*Interferon sensitive response elements*, ISRE), è responsabile della regolazione dell'espressione di PD-1 a livello macrofagico. FoxO1 è un altro importante

fattore trascrizionale, che promuove l'anergia dei linfociti T citotossici mediante la up-regolazione di PD-1, inoltre il segnale di PD-1 previene la degradazione di FoxO1 definendo un circolo positivo in cui PD-1 attivato promuove la propria trascrizione ed espressione a livello di membrana²². Per quanto riguarda l'espressione dei ligandi di PD-1, poco si conosce riguardo la regolazione di PD-L2 rispetto a quella di PD-L1. Diverse citochine quali IL-2, IL-7 e IL-15 regolano l'espressione di PD-L1 su macrofagi e cellule T. Mentre, IL-4 e il fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF) sembrano avere un ruolo principale nell'espressione di PD-L2^{6,8}. L'analisi del promotore di PD-L1 mostra che l'espressione della proteina dipende da due siti di legame regolati dall'interferone e vari studi dimostrano che, sia PD-L1 sia PD-L2 sono iper-espressi in seguito alla stimolazione da parte di IFN- α , β , γ ²³. Recentemente è stato inoltre dimostrato che l'espressione di PD-1 e dei rispettivi ligandi, in particolare PD-L1, è strettamente regolata anche a livello post-translazionale, attraverso reazioni di glicosilazione, fucosilazione ed ubiquitinazione²⁴⁻²⁶ (Fig. 1). Sebbene il meccanismo biochimico con cui la fucosilazione di PD-1 influisca sulla sua struttura e funzione non sia ancora ben chiaro, linfociti T trattati in vivo con un inibitore del meccanismo di fucosilazione cellulare hanno sviluppato una potente azione tumoricida, secondaria alla ridotta espressione di PD-1²⁵ (Fig 1.A). La glicosilazione di PD-L1 invece risulta essere essenziale non solo per la sua espressione, ma anche per la sua stabilizzazione sulla membrana cellulare e per il legame tra PD-L1 ed il suo recettore²⁶. In questo setting, inibire la glicosilazione di PD-L1 potrebbe essere una strategia vincente per aumentare l'efficacia della terapia con anticorpi inibitori dei checkpoints immunitari (CPI).

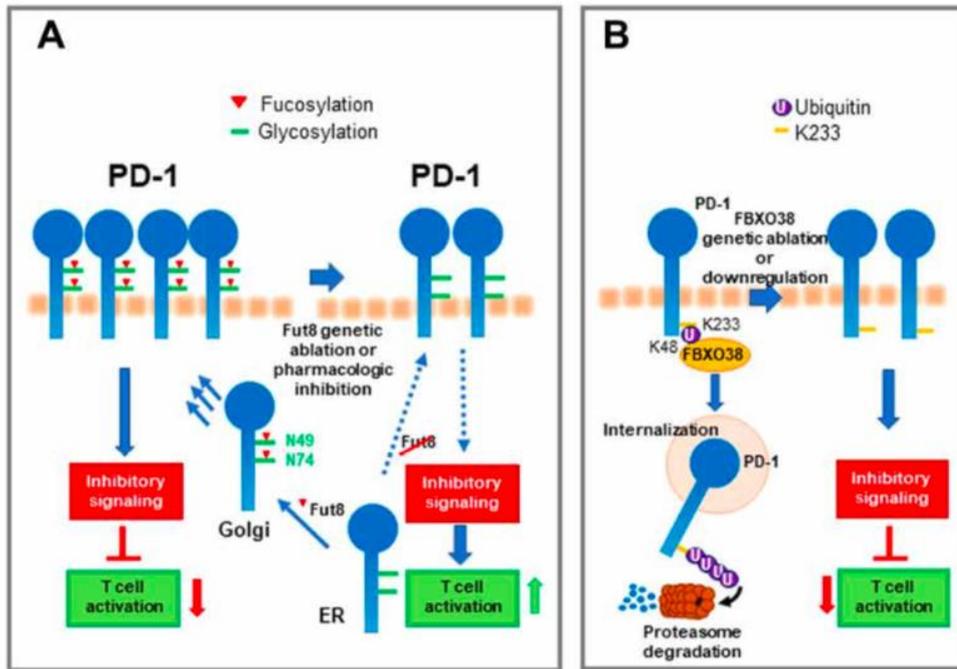


Fig. 1. Modifiche post-traslazionali che regolano l'espressione di PD-1

(N. Patsoukis, et al. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci. Adv.* 6, eabd2712,2020)

1.1.2 La via PD-1/PD-Ls nella regolazione dell'attività linfocitaria

Le cellule T richiedono due segnali per essere attivate ed espletare le loro funzioni effettrici: il primo segnale deriva dall'interazione tra il TCR ed il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), che presenta l'antigene sulla superficie delle cellule APCs; il secondo è un segnale co-stimolatorio mediato dal legame tra il CD80 (*alias* B7-1) o il CD86 (*alias* B7-2) presenti sulla membrana delle APCs ed il CD28 espresso dai linfociti T. Il segnale co-stimolatore può essere mediato anche dal legame tra il co-stimolatore inducibile (ICOS) ed il suo ligando (ICOS-L). In assenza di questo secondo segnale la cellula T perde la sua funzione effettrice, diventando anergica. Questo processo di priming e attivazione dei linfociti T è finemente regolato da recettori, definiti checkpoints immunitari, che promuovono un segnale inibitorio, nei confronti dei linfociti T attivati, sia a livello centrale che periferico. In particolare, la regolazione centrale avviene negli organi linfoidi e si basa sull'interazione tra l'antigene 4 associato ai linfociti T citotossici (CTLA-4) ed il CD80/86 espresso dalle APCs: l'espressione di CTLA-4 sulla superficie dei T naive è up-regolata in seguito ad una forte stimolazione antigenica, la proteina espressa entra in competizione con CD80 e CD86 nel legame con il CD28, instaurando una tolleranza centrale^{27,28}. A livello periferico sono invece coinvolti PD-1, espresso prevalentemente sui linfociti T, ed i PD-Ls espressi su differenti cellule target, comprese le cellule tumorali. In seguito al legame tra il dominio extracellulare di PD-1 e quello dei suoi rispettivi ligandi, PD-1 migra in prossimità del complesso del TCR ed i suoi domini

intracellulari, ITIM e ITSM, vengono attivati tramite fosforilazione. ITSM fosforilato, che sembra essere il dominio maggiormente coinvolto, richiama le tirosin-fosfatasi, SHP-1 (*alias* PTPN6) ed in particolare SHP-2, le quali trasmettono l'input inibitorio, defosforilando le proteine chiave nella trasmissione del segnale intracellulare a valle del TCR. In particolare, tramite l'inibizione della catena CD3 ζ del TCR e di ZAP70 vengono bloccate le vie di segnale mediate da RAS e PKC (*protein chinasi C*), mentre l'inibizione della molecola co-stimolatoria CD28 comporta una riduzione del segnale della via di PI3K (*phosphatidil inositolo 3 chinasi*) /Akt²⁸⁻³⁰. Tali processi inibitori portano la cellula T ad uno stato di cosiddetta “*exhaustion*”, caratterizzato da una dis-regolazione delle normali vie di trasmissione del segnale intracellulare. La condizione di anergia della cellula si traduce in: 1) una minor produzione di citochine pro-infiammatorie quali il TNF α , l'IFN γ , l'IL-2; 2) in un'inibizione della crescita e 3) in una riduzione della funzione effettrice, allo scopo di proteggere i tessuti target da un danno immuno-mediato^{5,6,12} (Fig. 2).

Il segnale di PD-1 gioca un ruolo anche nello sviluppo dei linfociti T regolatori (Treg) da una parte bloccando la via di segnale mediata da Akt-mTOR, implicata nell'inibizione dello sviluppo dei Treg³¹, e dall'altra, modificando il metabolismo dei linfociti T attivati, responsabile non solo della crescita e proliferazione, ma anche della differenziazione linfocitaria.

In condizioni normali, la principale fonte di energia per i linfociti T *naive* deriva dalla fosforilazione ossidativa. In seguito al riconoscimento dell'antigene da parte del TCR, però, si assiste ad un aumento della glicolisi aerobia (effetto Warburg) che ha lo scopo di sostenere l'attivazione del linfocita T effetttore e guidarne la differenziazione verso una cellula T di memoria. Al contrario, l'attivazione della via di segnale di PD-1, indirizza il metabolismo cellulare verso l'utilizzo degli acidi grassi, promuovendone la beta-ossidazione a discapito della glicolisi, glutaminolisi e del metabolismo degli amminoacidi a catena ramificata. In questo setting, l'inibizione della glicolisi aerobia blocca la funzione effettrice dei linfociti T e la loro differenziazione in T-helper 17, promuovendone la differenziazione in senso Treg³² (Fig. 2).

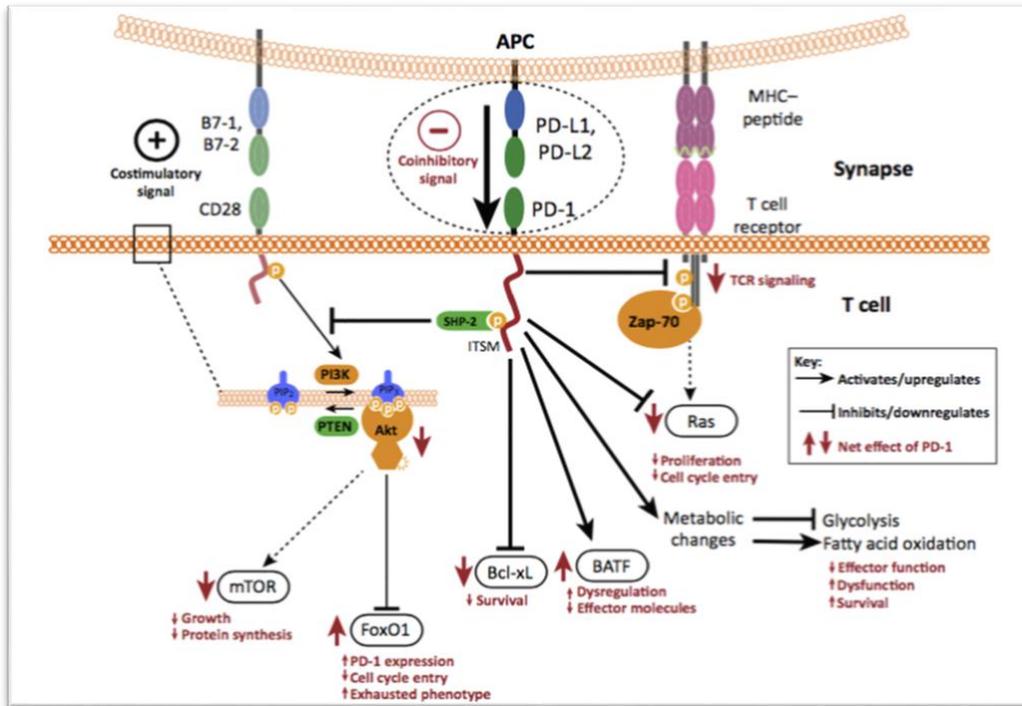


Fig. 2. Via del segnale PD-1/PD-Ls nei linfociti T

1.2 IL RUOLO DI PD-1 NELL'EVASIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA ANTI TUMORALE

La scoperta e la caratterizzazione di PD-1 come recettore T linfocitario ad azione inibitoria è andata di pari passo con la scoperta che i suoi ligandi, PD-L1 e PD-L2, sono espressi non solo dalle cellule dell'immunità innata e da APC del microambiente tumorale, ma anche dalle cellule tumorali stesse. In questo contesto, il legame recettore-ligando favorisce l'instaurarsi di un microambiente immunitario permissivo per la sopravvivenza e proliferazione del clone neoplastico. Tali evidenze hanno rivoluzionato le basi dell'oncologia tradizionale, ponendo il sistema immunitario come bersaglio centrale di nuove strategie terapeutiche. Ne è conseguito lo sviluppo di anticorpi monoclonali (definiti anche CPi) contro il recettore PD-1 (nivolumab e pembrolizumab) o contro i suoi ligandi, in grado di inibire l'interazione PD-1/PD-Ls, favorendo la risposta immunitaria T citotossica nei confronti della cellula tumorale. I CPi attualmente, vengono utilizzati come agenti singoli o in associazione ad altre terapie, nel trattamento di numerose neoplasie sia solide che ematologiche³³.

1.2.1 Regolazione dell'espressione di PD-Ls sulle cellule neoplastiche

La regolazione dell'espressione dei PD-Ls ed in particolare di PD-L1, da parte delle cellule neoplastiche è complessa e tutt'ora oggetto di studio. In primis, essa sembra essere favorita da citochine infiammatorie, presenti nel microambiente tumorale come IFN- γ , IL-4, IL-10, fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e fattore di crescita delle colonie formanti granulociti (G-CSF)^{21,23}. In secondo luogo, la deregolazione delle vie di segnale intracellulare, alla base della proliferazione e sopravvivenza cellulare, così come l'attivazione trascrizionale da parte di oncogeni o mutazioni dei geni codificanti i PD-Ls, possono portare ad una aumentata trascrizione degli stessi. Infine, recenti studi hanno evidenziato come, anche a livello neoplastico, sia fondamentale la regolazione di tali proteine a livello post- trascrizionale.

Come presentemente descritto, l'espressione e la stabilità di PD-L1 sulla membrana cellulare dipende da meccanismi di glicosilazione ed ubiquitinazione; si è visto che la stessa glicosilazione di PD-L1 è essenziale per la sua interazione con PD-1^{26,34} (Fig. 3). In studi in vitro condotti su cellule di tumore mammario triplo negativo, l'inibizione del processo di glicosilazione sembra promuovere l'internalizzazione e la degradazione di PD-L1³⁵. Tale scoperta apre le porte ad interessanti strategie terapeutiche in cui l'utilizzo di inibitori di PD-1 associato all'inibizione della glicosilazione di PD-L1, potrebbe aumentare l'efficacia della terapia con anti-PD1 (Fig. 3.C). Nelle cellule neoplastiche, il segnale mediato dal recettore del TNF determina l'attivazione e la traslocazione nucleare di IKK β (*inhibitor of nuclear factor kB kinase β*), con conseguente trascrizione di CSN5 (COP9 signalosome 5) che, inibendo la ubiquitinazione o direttamente de-ubiquitinando PD-L1, ne favorisce l'espressione cellulare³⁴ (Fig. 3.D). In due studi indipendenti, recentemente pubblicati, la proteina CMTM6 è stata identificata come elemento cruciale in grado di stabilizzare l'espressione di PD-L1 sulla membrana di differenti cellule cancerose, tra cui cellule di melanoma, tumore pancreatico, tiroideo, colico e tumore del polmone non a piccole cellule^{36,37}. In particolare, CMTM6 sembra legare PD-L1 e localizzarsi al suo fianco sulla membrana, prevenendone la degradazione dipendente dal ricircolo lisosomiale^{36,37}. In assenza di CMTM6 le cellule tumorali presentano una ridotta espressione di PD-L1, sia costitutiva che mediata da IFN- γ , in assenza di una riduzione del trascritto. Tale evenienza si riflette in un aumento dell'attività dei linfociti T citotossici, sia in vitro che in vivo, sottolineando come CMTM6 possa diventare un potenziale target terapeutico nel trattamento dei tumori.

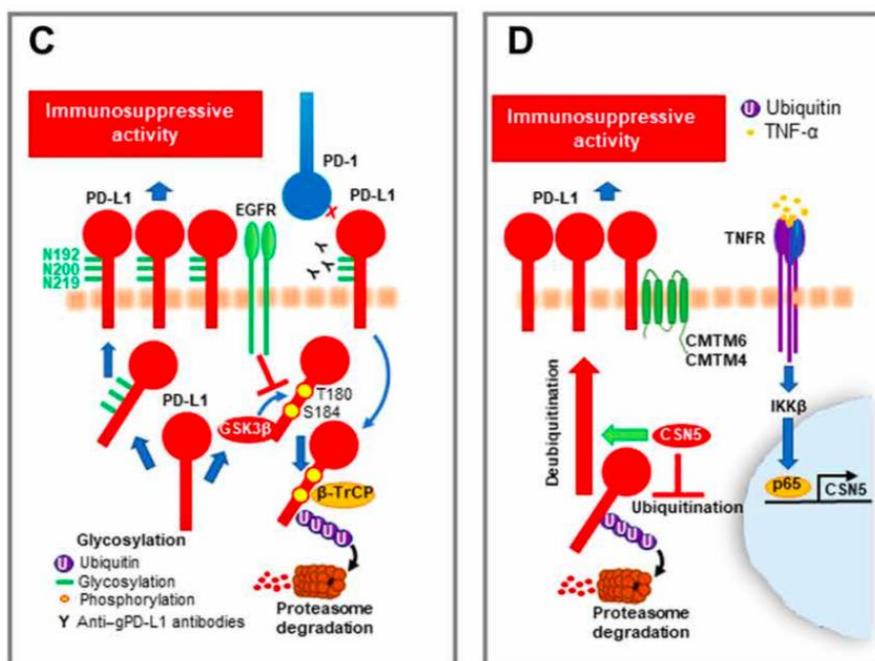


Fig. 3. Modifiche post-traslazionali che regolano l'espressione di PD-L1
(N. Patsoukis, et al. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci. Adv.* 6, eabd2712,2020)

Bisogna inoltre ricordare che esiste una forma solubile di PD-L1 prodotta non solo da DCs ma anche dalle cellule neoplastiche³⁸. PD-L1 solubile sembra mantenere la sua funzione inibitoria, tant'è che elevati livelli, nel siero di pazienti affetti da melanoma, così come da tumore del polmone o pancreatico, correlano con una prognosi più severa e con una ridotta sopravvivenza globale^{39,40}

1.2.2 Caratterizzazione dell'interazione tra PD-1 e PD-Ls nel microambiente tumorale

Classicamente l'interazione tra PD-1 e PD-Ls avviene *in trans* ossia avviene tra il recettore, espresso sui linfociti T, ed il ligando, espresso su cellule APC del microambiente tumorale o su cellule neoplastiche. Il legame recettore-ligando dà il via ad una cascata del segnale inibitoria, mediata prevalentemente dalla fosforilazione di ITSM, che a sua volta recluta SHP-2, che, de-fosforilando le proteine chiave nella trasmissione del segnale intracellulare a valle del TCR, determina l'esaurimento e l'anergia del linfocito T. Questo, in ambito oncologico, si traduce in un *escape* della sorveglianza immunitaria dell'ospite, con conseguente sopravvivenza delle cellule neoplastiche (Fig. 4.A). Recenti studi, però, hanno dimostrato che cellule neoplastiche o APC tumorali possono esprimere contemporaneamente sulla loro membrana, sia PD-1

che PD-L1 e che la loro interazione, definita *in cis*, riduce l'abilità di PD-L1 di legarsi *in trans* al PD-1 espresso dai linfociti T, impedendo il canonico segnale inibitorio. Tale modello potrebbe spiegare il perché, in alcuni casi, la terapia con anticorpi anti PD-1 fallisca: il legame tra anticorpo monoclonale e PD-1 espresso sulla cellula tumorale rende possibile l'interazione tra PD-L1 espresso dalla stessa cellula tumorale ed il PD-1 espresso dai linfociti T del microambiente tumorale, inibendone la funzione citotossica⁴¹ (Fig. 4.B). Il legame *in cis* potrebbe ai nostri occhi risultare svantaggioso per la cellula neoplastica; ma in realtà, alcuni studi condotti su cellule di melanoma, hanno evidenziato come il legame tra PD-1 e PD-L1, espressi sulla medesima cellula tumorale, non comporti un segnale inibitorio, bensì di attivazione di quelle vie di segnale quali PI3k/Akt, mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e MAPk (*mitogen activated protein kinase*) che promuovono la proliferazione e sopravvivenza cellulare⁴².

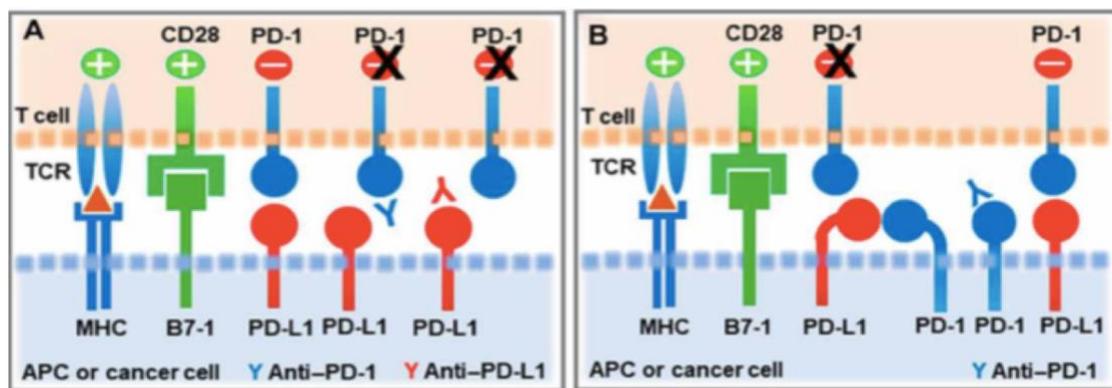


Fig. 4. Interazione tra PD-1 e PD-1L nel microambiente tumorale
(N. Patsoukis, et al. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci. Adv.* 6, eabd2712,2020)

Inoltre, PD-L1 sembra interagire *in cis* con B7-1, espresso dalla medesima cellula APC del microambiente tumorale. Tale legame, se da una parte interrompe l'interazione *in trans* tra PD-1 e PD-L1, dall'altra non sembra influire sull'interazione tra B7-1 ed il CD28, espresso sulla cellula T, preservandone l'effetto di costimolazione. In questo setting, cellule APC, che esprimono un certo numero di proteine B7-1 possono favorire l'attivazione e funzione dei linfociti T nel microambiente tumorale, riducendone l'anergia PD-1 mediata^{43,44}. Queste nuove evidenze riguardanti l'espressione e l'interazione tra PD-1, PD-Ls e B7-1, ed i segnali intracellulari che ne derivano, potrebbero portare a conseguenze in ambito terapeutico, facendo luce su eventuali nuovi target o combinazioni terapeutiche, piuttosto che su meccanismi di resistenza al trattamento con CPI.

CAPITOLO 2. IL RUOLO DEGLI INIBITORI DEI CHECKPOINTS IMMUNITARI NEL TRATTAMENTO DEL LINFOMA DI HODGKIN E DEL LINFOMA PRIMITIVO DEL MEDIASTINO

2.1 IL LINFOMA PRIMITIVO DEL MEDIASTINO

Il Linfoma primitivo del mediastino (*Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma*; PMBCL), è un disordine linfoproliferativo di derivazione dai linfociti B periferici, appartenente alla categoria dei Linfomi non-Hodgkin (LNH), di cui fa parte un gruppo molto eterogeneo di sindromi linfoproliferative, suddivise, in base alle loro caratteristiche biologiche, in forme indolenti ed aggressive. Le forme aggressive, cui afferisce il linfoma primitivo del mediastino, sono caratterizzate da un decorso acuto e possono presentare, fin dall'esordio, sintomi sistemici linfoma-relati^{45,46}. Nel 70% dei casi il PMBCL si presenta con una massa linfonodale *bulky* (definita come massa di diametro superiore a 1/3 del diametro toracico, valutato a livello della quinta vertebra dorsale o, in ogni caso, qualsiasi singola adenopatia con diametro superiore a 10 cm), localizzata nel mediastino anteriore, a crescita rapida e progressiva e ad estensione locale, con possibile infiltrazione di parenchima polmonare, gabbia toracica, pleura e pericardio. Sin dall'esordio la neoformazione mediastinica può determinare sintomi da compressione locale, come tosse secca e dispnea, e segni e sintomi da ostruzione cavale⁴⁷. Circa il 30-50% dei pazienti esordisce, infatti, con la cosiddetta "sindrome mediastinica" o "sindrome della vena cava superiore", causata da compressione cavale e caratterizzata da edema a "mantellina", turgore delle vene giugulari, edema mammario e circolo venoso superficiale. In meno del 20% dei pazienti sono presenti all'esordio sintomi sistemici quali: febbre o febricola, calo ponderale e sudorazioni notturne. Data la precocità dei sintomi compressivi, la malattia, nell'80 % dei casi, è diagnosticata in stadio I/II secondo Ann Arbor, ossia quando è ancora localizzata solo a livello toracico. Infatti, nonostante l'invasività locale, la diffusione a distanza è rara. Comunque, anche siti extranodali possono essere interessati, soprattutto in caso di ricaduta di malattia, con maggiore tendenza all'invasione di reni, surreni, fegato, sistema nervoso centrale e ovaie⁴⁸. L'infiltrazione del midollo osseo è rara, come generalmente accade nei linfomi aggressivi. La diagnosi di linfoma primitivo del mediastino si basa sull'integrazione di dati clinici, morfologici, immunofenotipici, genetici e molecolari, questi ultimi valutati su tessuto fresco ottenuto dalla biopsia della massa adenopatica. Tali dati permettono di distinguere il PMBCL dal linfoma di Hodgkin variante classica (classical Hodgkin Lymphoma, cHL) e dal linfoma

non Hodgkin B diffuso a grandi cellule, con i quali condivide molti aspetti clinic, istologici e patogenetici, e con cui entra pertanto in diagnosi differenziale.

Dal punto di vista morfologico il PMBCL può presentare uno spettro variabile di caratteristiche citologiche e strutturali. Nonostante ciò, nella maggior parte dei casi è possibile apprezzare una fibrosi diffusa, con bande di tessuto collagene, che circondano gruppi di cellule linfomatose di medie-grandi dimensioni, determinando una compartimentalizzazione della crescita neoplastica⁴⁶. Spesso, inoltre, è possibile riscontrare delle componenti timiche caratteristiche come i corpuscoli di Hassall, che condividono con le cellule del PMBCL un fenotipo CD10-, CD21- e CD23+: queste evidenze hanno portato a pensare che, il linfoma primitivo del mediastino, possa originare da una piccola popolazione di linfociti B residenti nel timo⁴⁹. Tale affermazione è sostenuta anche dal riscontro che, sia i linfociti B timici che quelli neoplastici, presentano ipermutazione somatica della regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgH) e mutazioni nella regione 5' non codificante del gene BCL6: entrambe sono cellule B mature che hanno già attraversato il centro germinativo e che poi sono, molto probabilmente, migrate nel timo⁵⁰.

L'analisi immunofenotipica mostra l'espressione, da parte di tutte le cellule linfomatose, di antigeni di superficie della serie B linfocitaria quale CD19, CD20, CD22 e CD79a. Il complesso maggiore d'istocompatibilità di tipo I o di tipo II (MCH I e MCH II) è raramente espresso e sempre a bassi livelli; mentre frequente è l'espressione dell'antigene comune leucocitario (CD45)⁵¹⁻⁵³. Nell'80% dei casi le cellule del PMBCL esprimono l'antigene CD30^{45,54}, proteina di membrana appartenente alla superfamiglia dei recettori per i fattori di necrosi tumorale (*TNF-receptors*), normalmente espressa dai linfociti B e T attivati, in cui gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attivazione della via di NF-κB. Il CD30 è sempre over-espresso nelle cellule tumorali del linfoma di Hodgkin, pertanto, sebbene nel PMBCL l'espressione sia più debole e meno omogenea, essa potrebbe rendere complicata la distinzione tra le due entità istologiche. Bisogna però ricordare che l'antigene di superficie CD15, sempre espresso nel linfoma di Hodgkin, è raramente esposto dalle cellule del PMBCL⁵⁵ che, al contrario del cHL, spesso esprimono fattori di trascrizione dei linfociti B come PAX5, BOB1, Oct-2 e PU.1. Inoltre, le cellule linfomatose del PMBCL sono spesso positive per il fattore di trascrizione IRF4 (75%), per BCL2 (proteina anti-apoptotica espressa nel 55-80% dei casi) e CD23 (70%), mentre l'espressione di BCL6, fattore di trascrizione che regola la maturazione dei linfociti B nel centro germinativo, è molto variabile (45-100%) e quella di CD10 è solitamente assente

(8-32%).

2.1.1 La via di PD-1/PD-Ls nel linfoma primitivo del mediastino

Nel tentativo di caratterizzare i meccanismi molecolari responsabili dell'insorgenza del linfoma primitivo del mediastino, è stata dimostrata una frequenza relativamente bassa dei comuni eventi oncogenici: mutazioni missense di TP53 e riarrangiamenti o mutazioni puntiformi di c-MYC sono state identificate in meno del 20% dei casi, traslocazioni di BCL6 si verificano solo nel 33% dei casi, mentre traslocazioni di BCL2 o mutazioni in RAS non sono mai state documentate⁵⁶. Tuttavia, sono state identificate alcune aberrazioni caratteristiche, che consistono principalmente in amplificazioni geniche, mutazioni puntiformi nelle regioni codificanti, riarrangiamenti o traslocazioni cromosomiche (Tabella 1). L'amplificazione del cromosoma 9p24.1 è co-responsabile, come vedremo, dell'*escape* immunologico mediato dalla via PD-1/PD-Ls. Mentre, è oramai dimostrato che, le principali alterazioni molecolari responsabili del fenotipo maligno del PMBCL fanno capo a due vie del segnale intracellulare, fondamentali per la proliferazione e sopravvivenza cellulare, ossia la via di NF- κ B e quella di JAK-STAT (*Janus Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription*)^{57,58}; la seconda in particolare supporta la formazione di un microambiente immunosoppressivo, che contribuisce e coopera al fenotipo maligno del PMBCL^{58,59}.

Tabella 1 – Alterazioni geniche ricorrenti nel PMLBCL

GENE	PATHWAY/FUNZIONE	FREQUENZA, %
Vantaggio nel numero di copie		
<i>REL</i>	NF- κ B pathway	75
<i>PDL1/PDL2</i>	Esaurimento linfociti T, apoptosi	63
<i>JAK2</i>	IL/JAK-STAT pathway, modificazione istone H3	63
<i>JMJD2C</i>	Demetilazione istone H3	63
Traslocazione/riarrangiamenti cromosomici		
<i>CIITA</i>	Regolazione trascrizionale di HLA-II/presentazione dell'antigene	38
<i>PDL1/PDL2</i>	Esaurimento linfociti T, apoptosi	20
Mutazione sequenza codificante		
<i>SOCS1</i>	IL/JAK-STAT pathway	45
<i>STAT6</i>	IL/JAK-STAT pathway	36
<i>TNFAIP3</i>	NF- κ B pathway	36

<i>MYC</i>	Regolazione trascrizionale	25
<i>TP53</i>	P53 pathway	13

L'amplificazione del braccio corto del cromosoma 9, banda 24.1, riscontrata in un 50-75% dei casi, rappresenta una delle principali alterazioni geniche del PMBCL^{58,60}. Tale regione accoglie numerosi geni implicati nella proliferazione, sopravvivenza cellulare e nel fine meccanismo di regolazione della risposta immunitaria T mediata, in particolare:

- *JAK2*: codifica per la proteina JAK2 appartenente alla famiglia delle tirosin-chinasi non recettoriali Janus chinasi (JAK), ed è la principale regolatrice della via di segnale JAK-STAT.
- *JMJD2C* (*alias KDM4C*): gene contenente il dominio Jumonji 2 (JMJD2). Codifica per una demetilasi specifica che converte i residui di lisina 9 dell'istone H3 trimetilati in forme demetilate, impedendo il legame con la proteina HP1 α (*heterocromatin protein 1 α*) e quindi la formazione dell'eterocromatina^{61,62}. Una caratteristica peculiare delle cellule di PMBCL e HL con amplificazione del cromosoma 9p24.1, consiste nella modificazione dell'istone H3, secondaria all'amplificazione di *JAK2* e *JMJD2C*. *JAK2*, infatti, sia mediante la fosforilazione della tirosina 41 sull'istone H3 sia attraverso la fosforilazione di HP1 α , coopera con *JMJD2C* nell'inibire/inattivare HP1 α , favorendo la formazione di eucromatina⁶². Recentemente *MYC* è stato identificato come uno dei principali geni regolati attraverso tale modificazione⁶¹.
- *CD274* e *PDCD1LG2*⁶⁰: codificano rispettivamente per PD-L1 e PD-L2.

La via di segnale JAK-STAT regola la trascrizione dei principali geni coinvolti nella proliferazione, sopravvivenza e apoptosi cellulare: in seguito al legame tra interleuchine o interferone con i specifici recettori espressi sulla membrana cellulare dei linfociti B, si assiste all'auto-fosforilazione della proteina JAK, che a sua volta determina la fosforilazione e dimerizzazione di STAT. STAT dimerizzato trasloca nel nucleo, dove si lega a specifiche sequenze di DNA, regolando la trascrizione di geni target responsabili della proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulare. Studi di *gene expression profiling* (GEP) eseguiti su linee cellulari di PMBCL hanno rivelato una de-regolazione della via di segnale JAK-STAT principalmente secondaria a:

1. Amplificazione del cromosoma 9p24.1 con secondario incremento del numero di copie di *JAK2*, cui corrisponde un aumento del trascritto e della proteina JAK2 fosforilata.^{58,60} JAK2 attivata, a sua volta fosforila il suo principale bersaglio STAT1,

con conseguente up-regolazione della via JAK2-STAT1, responsabile della trascrizione di numerosi geni, tra cui *PDL1* e *PDL2*⁵⁸. È stato dimostrato che la regione 5' a monte del sito di inizio di trascrizione di entrambi i geni include non solo una sequenza regolatrice ISRE, ma anche numerosi siti di legame per la proteina STAT. All'over-espressione di *JAK2* si associa sempre quella di *JMJD2C*, che, attraverso modificazioni epigenetiche, agisce in concerto con JAK2 nell'amplificare la trascrizione di *PDL1* e *PDL2*.

2. De-regolazione dei meccanismi inibenti la via di segnale JAK-STAT: in alcuni casi di PMBCL sono state identificate mutazioni di *PTPN1* (*protein tyrosin phosphatase non-receptor type 1*) e delezioni di *SOCS1* (*suppressor of cytokine signalling type 1*), cui si associa una prolungata emivita di JAK2 e un'augmentata attività della via JAK-STAT⁶³.
3. Si segnala inoltre che l'over-espressione della proteina JAK2 attivata può associarsi all'aumento di STAT6, fattore di trascrizione normalmente attivato da IL-4 e IL-13 mediante JAK2^{56,64}. L'incremento dell'attività di STAT6 può inoltre essere secondario a mutazioni attivanti il gene *STAT6*, riscontrate in un 30% dei casi di PMBCL.

Solo recentemente il ruolo del microambiente e del suo *cross-talking* con le cellule di PMBCL è diventato oggetto di studio e di nuove interessanti scoperte anche sul versante genetico-molecolare. I primi studi di caratterizzazione immunofenotipica hanno evidenziato, nella gran parte dei casi di PMBCL, una ridotta espressione di molecole MHC-II, che si associa a una riduzione, nel microambiente, del numero di linfociti T citotossici (CD8+, TIA1+), ma non di macrofagi⁶⁵. Contemporaneamente il numero di linfociti Treg (CD4+, CD25+, FOXP3+) risulta molto variabile rispetto ad altre forme di linfoma. Sia la mancata espressione di MHC-II che la riduzione dei linfociti T citotossici, è stata correlata a una peggior prognosi e sopravvivenza libera da malattia⁶⁶.

Studi di GEP mostrano una forte correlazione tra l'espressione della proteina che regola in modo positivo la trascrizione del gene per il complesso maggiore d'istocompatibilità di tipo II (MHC2TA) e l'espressione di MHC-II. *CIITA* (16p 13.13), gene che codifica per MHC2TA, è traslocato in circa il 40% dei casi di PMBCL.^{59,66} Sono stati identificati diversi partner di traslocazione che portano alla formazione di nuove proteine di fusione; in tutti questi casi il punto di rottura si trova nella regione codificante dell'introne 1 di *CIITA*, con conseguente perdita di materiale genico in uno dei due alleli, e riduzione dell'espressione di MHC-II. Inoltre, la proteina di fusione può agire in modo dominante

negativo, inibendo completamente la trascrizione del complesso maggiore d'istocompatibilità⁵⁹. Una ridotta espressione di MHC-II limita il *cross-talking* tra la cellula tumorale e i linfociti T citotossici sani, favorendo l'evasione della risposta immunitaria da parte del clone neoplastico. Importante inoltre sottolineare che, i riarrangiamenti non bilanciati di *CIITA* possono essere correlati alla delezione del gene *SOCS1*, localizzato sul cromosoma 16 in prossimità di *CIITA*, con conseguente attivazione costitutiva di JAK2⁶³. Possiamo quindi concludere che, in un certo subset di PMBCL, un vantaggio proliferativo attraverso l'attivazione costitutiva di JAK-STAT sia combinato con un meccanismo di evasione immunitaria attraverso la down-regolazione di MHC-II e l'up-regolazione dei ligandi di PD1, determinando un'anergia dei linfociti T citotossici.

Il fisiologico messaggio inibitorio, mediato dall'attivazione di PD-1, nei linfociti T citotossici può essere sfruttato dalle cellule B neoplastiche per eludere la risposta immunitaria, determinando un esaurimento dei linfociti T: diversi studi hanno dimostrato un'aumentata espressione di PD-L1 e in particolare PD-L2 sulla superficie delle cellule di PMBCL. L'amplificazione del cromosoma 9p24 coinvolge direttamente *CD274* e *PDCD1LG2* determinando un aumento dei livelli del trascritto e un cambiamento nell'espressione di PD-Ls. Indirettamente, inoltre, l'espressione di PD-L1/2 è aumentata sia grazie all'attivazione costitutiva della via JAK2-STAT1 che grazie ad una maggiore apertura cromatinica favorita da JAK2 e JMJD2, anch'essi amplificati^{58,61} (Fig 5). Recentemente, inoltre, è stato dimostrato che, sia *CD274* sia *PDCD1LG2* sono partner di fusione ricorrenti di *CIITA* ed entrambi sono maggiormente espressi sotto il controllo del promotore di *CIITA* in seguito alla traslocazione t(9;16)(p24.1; p13.13), che determina la formazione dei geni di fusione *CIITA-CD274* e *CIITA-PDCD1LG2*, rispettivamente^{67,68}.

Pertanto, come in altre forme tumorali, la patogenesi del PMBCL è presumibilmente un processo a più steps caratterizzato dall'accumularsi di alterazioni genetiche. Il *pathway* di JAK-STAT è esplicativo, dimostrando che, multiple alterazioni in differenti parti della stessa via del segnale cooperano nel determinare un vantaggio in termini di sopravvivenza del clone neoplastico. Dall'altra parte, anche un singolo evento genetico come l'amplificazione del cromosoma 9 può intaccare differenti vie del segnale a livello genomico. Questo processo può essere visto come una via economica che la cellula linfomatosa utilizza per la propria sopravvivenza.

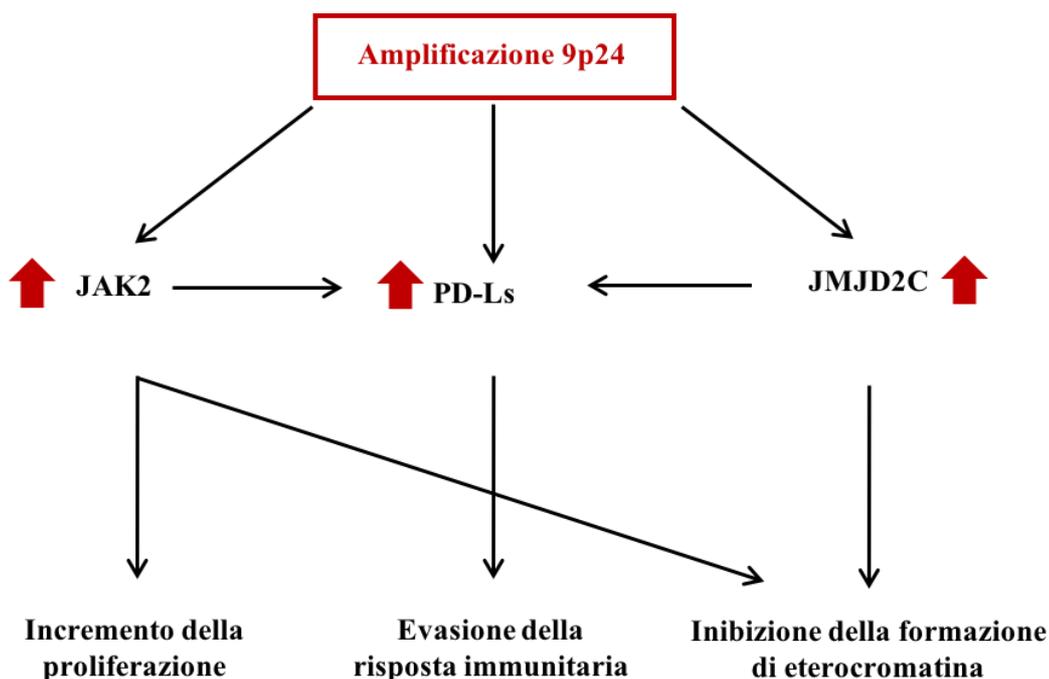


Figura 5. Amplificazione di 9p24.1

In conclusione, il PMBCL è caratterizzato da un profilo citochinico di tipo T helper 2 (Th2), dall'attivazione costitutiva della via di segnale NF- κ B e dal *pathway* JAK2/STAT⁵⁶⁻⁵⁸ e da amplificazioni o traslocazioni cromosomiche che concorrono all'instaurarsi di un microambiente permissivo, caratterizzato da un'anergia dei linfociti T citotossici, prevalentemente mediata dall'attivazione dell'asse PD-1/PD-Ls. L'amplificazione del cromosoma 9p24.1 si associa a un'aumentata espressione di PD-L1 e, soprattutto, di PD-L2 sulla superficie delle cellule linfomatose. Tale iper-espressione di entrambe le molecole è secondaria, da una parte, alla diretta amplificazione dei rispettivi geni *CD274* e *PDCD1LG2* e dall'altra, all'amplificazione di *JAK2* che attraverso l'attivazione di STAT1 regola e stimola la trascrizione ed espressione dei ligandi di PD1, legandosi ai rispettivi promotori^{58,59,60}. Inoltre, JAK2 in concerto con JMJD2C inibisce la proteina HP1 α , rendendo il locus di entrambi i geni maggiormente accessibile al complesso trascrizionale.

Oltre ad un aumento del numero di copie dei geni di PD-L1 e PD-L2 sono stati riportati anche dei riarrangiamenti, che coinvolgono il cromosoma 9p24.1 e il gene *CIITA*, sul cromosoma 16, con conseguente incremento dell'espressione delle rispettive proteine.

Parallelamente le traslocazioni coinvolgenti *CIITA* causano una riduzione dell'espressione della proteina MHC2TA, riducendo i livelli di MHC di classe II sulla superficie cellulare e contribuendo alla formazione di un microambiente inibente la normale risposta immunitaria T mediata^{59,66}. Queste scoperte hanno portato dapprima allo sviluppo di studi clinici volti a valutare l'efficacia terapeutica del blocco di PD-1/PD-Ls nei pazienti affetti da PMBCL e, recentemente, all'approvazione da parte dell'agenzia del farmaco americana (FDA, *Food and Drug Administration*) di pembrolizumab, anticorpo monoclonale anti PD-1, nel trattamento del PMBCL ricaduto/refrattario (R/R) ad almeno due precedenti linee terapeutiche.

2.2 IL LINFOMA DI HODGKIN

Il linfoma di Hodgkin (LH) rappresenta circa l'11% di tutti i linfomi diagnosticati nei paesi Occidentali. È una neoplasia caratteristica dell'età giovanile, con un picco principale di incidenza tra i 20 e i 40 anni, mentre un secondo picco si registra dopo i 50 anni di età. Secondo la *World Health Classification* (WHO), il LH è suddiviso in due entità anatomico-patologiche distinte: da una parte il linfoma di Hodgkin classico (cHL, 95% delle forme totali) a sua volta classificato in quattro sottogruppi, sulla base della morfologia delle cellule neoplastiche, della composizione dell'infiltrato non neoplastico e dell'architettura nodale [variante sclerosi nodulare (70%), variante cellularità mista (20-25%), variante ricca in linfociti (5%) e variante deplezione linfocitaria (<1%)], e dall'altra parte il linfoma di Hodgkin nodulare a predominanza linfocitaria (5% delle forme totali)^{45,46}. Nei pazienti giovani-adulti prevale il cHL a sclerosi nodulare, mentre la forma a cellularità mista rappresenta il sottotipo più frequente nei pazienti anziani. In generale, circa un 30% dei pazienti affetti da LH esordisce con sintomi sistemici B riconducibili alla malattia, quali: febbre serotina, sudorazioni profuse e calo ponderale significativo. Sebbene non annoverato tra i sintomi B, è frequente che il paziente lamenti all'esordio un importante prurito *sine materia*, che spesso precede la diagnosi di LH anche di alcuni mesi. L'incidenza dei sintomi tende ad aumentare con l'avanzare della malattia, ed è correlata alla produzione citochinica da parte del microambiente tumorale (IL-1, IL-5, IL-6). Il paziente può esordire con una o più sedi linfonodali interessate. Nelle forme classiche a sclerosi nodulare vi è generalmente una distribuzione sovra-diaframmatica, spesso in associazione ad interessamento mediastinico *bulky*, aspetto che, clinicamente, può mimare l'esordio di un PMBCL. Come nei linfomi aggressivi, anche nel LH l'interessamento midollare di malattia è raro all'esordio. La diagnosi definitiva è guidata

dall'anamnesi e dall'esame obiettivo, ma non può prescindere dalla biopsia escissionale, che consente da un lato una caratterizzazione istologica, immunofenotipica e molecolare della patologia e del sottotipo, dall'altro una diagnosi differenziale con altre forme linfomatose. Una volta posta la diagnosi, come in tutti i linfomi, è fondamentale la stadiazione, effettuata mediante imaging con TC collo, torace, addome completo e PET con ¹⁸F-fluorodesossiglucosio, indagine oramai principe non solo nel definire lo stadio alla diagnosi, ma anche nel verificare la risposta al trattamento sia al termine dei cicli di terapia che nel corso degli stessi (*interim* PET). Dal punto di vista istologico, il LH è caratterizzato da poche cellule neoplastiche di derivazione B linfocitaria, in uno sfondo cellulare infiammatorio predominante. In particolare, nella forma classica, la cellula neoplastica patognomonica, chiamata cellula di Reed-Sternberg (RS)/cellula di Hodgkin a seconda che sia bi o mononucleata, rappresenta dallo 0,1 al 10% di tutta la massa neoplastica. Essa mostra un fenotipo B difettivo e solo la proteina BSAP (proteina attivatrice specifica delle cellule B) è quasi sempre espressa, mentre i restanti marcatori B come il CD20, CD70, CD45 ed i fattori di trascrizione OCT2 e BOB.1, coinvolti nell'espressione delle immunoglobuline, sono solitamente negativi. Come precedentemente scritto, è invece tipica l'espressione del CD30 e del CD15⁴⁶.

In almeno il 40% del totale dei linfomi di Hodgkin, soprattutto nelle varianti classica a cellularità mista (75%) e nella forma a sclerosi nodulare (30%), viene dimostrata l'integrazione del genoma del virus di Epstein Barr (*EBV*)^{69,70}. Ne consegue l'espressione da parte delle cellule di RS e Hodgkin della proteina latente 1 e 2 (LMP1 e LMP2) e dell'antigene nucleare 1 (EBNA1). In particolare, EBNA1 consente la replicazione dell'episoma virale e favorisce la liberazione di CCL20, chemochina che richiama nel microambiente i linfociti Treg, che a loro volta down-regolano l'azione della risposta immunitaria, favorendo la formazione di un microambiente permissivo⁷¹. LMP1 e LMP2 invece, favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione dei linfociti B in quanto inducono l'espressione sulla loro superficie di CD23 e CD40, aumentano l'espressione di geni anti-apoptotici quali *BCL-2* (*B-cell lymphoma-2*) *MCL-1* (*myeloid cell leukemia-1*) e, infine, mimano l'azione di CD40 che rende costitutivamente attivo NF-kB. Inoltre, LMP-1, tramite la via JAK-STAT e il fattore di trascrizione AP-1 (*activator protein 1*), potenzia l'espressione della proteina PD-L1 sui cloni neoplastici.^{70,71}

2.2.1 La via di PD-1/PD-Ls nel linfoma di Hodgkin, variante classica

La biologia del cHL e quella del LH a predominanza linfocitaria sono tra loro distinte, definendo patologie differenti sia dal punto di vista istopatologico che dal punto di vista terapeutico. In questo trattato ci concentreremo sul cHL, in quanto caratterizzato in modo predominante dall'attivazione del pathway di PD-1.

Come precedentemente accennato, nel cHL il tessuto tumorale è costituito da una complessa rete di cellule neoplastiche e di cellule reattive che comunicano tra loro o per contatto diretto o per via paracrina. Le cellule di RS rappresentano solo una minima frazione dell'intera cellularità, che è costituita prevalentemente da cellule dell'infiammazione tra cui: linfociti Treg, linfociti T infiltranti il tumore organizzati a formare rosette, T helper CD4+, linfociti B, eosinofili, macrofagi, neutrofili, fibroblasti, plasmacellule e mastociti. È sempre più evidente, come questa organizzazione sia fondamentale per permettere lo sviluppo di una tolleranza da parte del sistema immunitario dell'ospite nei confronti dei cloni neoplastici, permettendone la sopravvivenza. In generale, come descritto per il PMBCL, la patogenesi del cHL è un evento a più steps in cui, all'attivazione aberrante di vie del segnale responsabili della proliferazione e sopravvivenza delle cellule neoplastiche, concorre un continuo *cross-talk* tra cellule di RS e microambiente tumorale, che a sua volta sostiene la sopravvivenza delle stesse, tramite l'instaurarsi di una tolleranza immunitaria (Fig. 6).

Anche per il LH, come per il PMBCL, le due vie di segnale maggiormente coinvolte nella patogenesi della malattia, sono le vie di NF- κ B e JAK/STAT. In particolare, l'attivazione di quest'ultima può essere determinata sia da mutazioni attivanti le principali proteine del pathway come STAT6 (32% dei casi), STAT3, JAK1 e 2, ma anche da mutazioni inattivanti gli inibitori di JAK2, come *SOCS1*⁷², piuttosto che da amplificazione di *JAK2* secondaria ad alterazioni della regione cromosomica codificante il gene. È stato dimostrato, tramite metodiche di sequenziamento genico, che in circa l'85% dei casi di cHL, è presente un'alterazione a carico del locus genico 9p24.1, che, come abbiamo già visto, contiene numerosi geni, tra cui quelli che codificano per le proteine PD-L1 e PD-L2, oltre che per JAK2⁵⁸. Il risultato è molteplice: da una parte si osserva un'aumentata espressione sulle cellule neoplastiche dei ligandi di PD1, dall'altra parte le mutazioni attivanti che colpiscono il gene che codifica per la proteina JAK2 sono responsabili di una attivazione costitutiva della via di segnale JAK-STAT che culmina, tra gli altri effetti, in una aumentata trascrizione del gene per PD-L1, il cui promotore 5' include la sequenza

regolatoria ISRE/IRF1 (*interferon (IFN)-stimulated regulatory element/IFN-regulatory factor 1*) e diversi siti di legame di STAT⁵⁸. L'iperattivazione costitutiva di queste vie è determinata anche dall'instaurarsi di loop autocrini e paracrini come la produzione di citochine tipo IL-6, IL-13 ed IL-21 da parte sia dalle cellule di RS, che dal microambiente tumorale. Tali citochine legandosi ai rispettivi recettori presenti sulle cellule neoplastiche, ne sostengono la sopravvivenza attivando la via JAK-STAT. Questo *cross-talking* ribadisce nuovamente il rapporto simbiotico che si crea tra le cellule di Hodgkin/RS ed il microambiente tumorale, rapporto necessario per la proliferazione e sopravvivenza del clone neoplastico. In particolare, le interazioni tra le varie componenti del microambiente e la cellula neoplastica possono essere di vario tipo. In primis, le cellule di RS secernano citochine come CCL22, RANTES e TARC, che richiamano i linfociti T helper CD4+, in particolare Th2, inibendo la risposta immune cellulo-mediata di tipo Th1. Inoltre, le cellule neoplastiche, attraverso il rilascio di MIP3-alfa, IL-7, IL-10 e TGF- β , promuovono il differenziamento dei Treg ed inibiscono l'attività dei linfociti T citotossici CD8+, determinando uno stato di immunotolleranza.⁷³⁻⁷⁵ I neutrofili, gli eosinofili, i linfociti B e T CD4+ stimolano la proliferazione delle cellule di RS attraverso la presentazione, sulla loro superficie, di ligandi per gli antigeni CD30 e CD40 espressi dalle cellule neoplastiche. Infine, anche nel cHL, sia le cellule tumorali, che le APC del microambiente iper-esprimono PD-L1, come conseguenza di uno stimolo citochinico, di un'infezione da EBV, oppure per attivazione costitutiva della via JAK/STAT piuttosto che per alterazioni del cromosoma 9p24.1. PD-L1 lega il suo recettore PD-1 espresso sui linfociti intra-tumorali con conseguente inibizione dell'attività T linfocitaria. In questo modo le cellule di Hodgkin/RS creano attorno a sé una sorta di santuario immunologico, che ne sostiene la proliferazione e la sopravvivenza e che dà adito sempre più all'utilizzo, di anticorpi diretti contro il PD-1 (Fig.6)

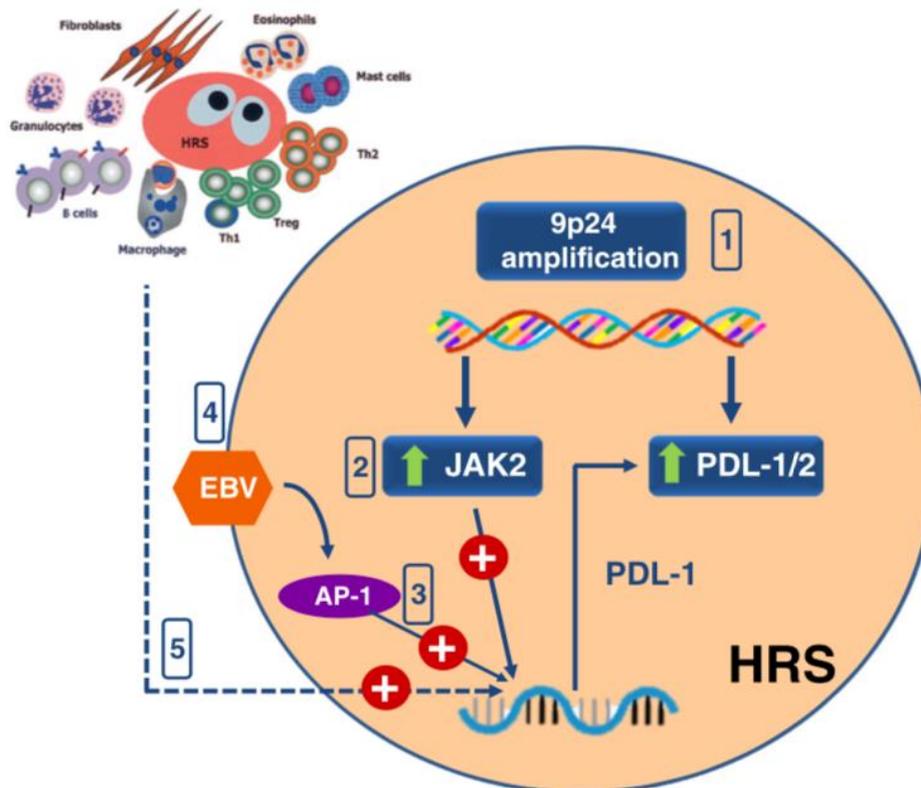


Figura 6. Meccanismi di espressione di PD-Ls sulla cellula di RS

(Ascierto et al. What have we learned from immunotherapy? J. Immunother. Cancer, 4, 1–14; 2016)

2.3 PD-1 COME BERSAGLIO TERAPEUTICO NEI LINFOMI: RISULTATI

Sebbene la maggior parte dei pazienti affetti da PMBCL o da cHL risponda alla terapia di prima linea, vi è circa un 20% di pazienti che presenta una malattia refrattaria, mentre un 20-30% ricade dopo aver ottenuto una prima risposta. La scelta del tipo di terapia da proporre al paziente ricaduto/refrattario (R/R) dipende da molteplici fattori tra cui: tipo di terapia precedente, la risposta ottenuta e la durata della stessa, l'età e la presenza o meno di comorbilità, così come la prospettiva di vita. In generale, il paziente R/R alla prima linea di trattamento, se fit e con un'età pari o inferiore a 70 anni, viene candidato ad una chemioterapia di salvataggio a scopo citoreducente e mobilizzante le cellule staminali emopoietiche.^{76,77} I regimi di poli-chemioterapia di II linea maggiormente utilizzati sono: 1) per quanto riguarda il LH, IGEV (ifosfamide, gemcitabina, vinorelbina) e BEGEV (bendamustina, gemcitabina e vinorelbina) mentre 2) per quanto riguarda il PMBCL si utilizzano regimi contenenti citarabina come il DHAP (desametasone, citarabina, cisplatino) piuttosto che regimi contenenti ifosfamide come IEV (ifosfamide, epirubicina, etoposide) o ICE (ifosfamide, carboplatino, etoposide)^{76,78}. In seguito

all'ottenimento di una risposta, che avviene nel 20-50% dei casi a seconda della patologia, il paziente viene sottoposto a consolidamento mediante chemioterapia ad alte dosi secondo schema B/FEAM (carmustina o fotomustina, etoposide, citarabina e melfalan) e successiva infusione di cellule staminali autologhe (*autologous stem cell transplantation*, ASCT). Nel LH è stato ampiamente dimostrato come l'*outcome* dell'ASCT dipenda dalla risposta alla terapia di salvataggio. In particolare, la persistenza di positività alla PET pre-ASCT rappresenta il più importante fattore predittivo sfavorevole post-trapianto⁷⁹, sia in termini di sopravvivenza libera da eventi (*event free survival*, EFS) che risulta essere del 75% a 5 anni per i pazienti PET negativi rispetto al 25% per i pazienti PET positivi, che in termini di sopravvivenza globale (*overall survival*, OS) rispettivamente del 55% nel paziente PET-positivo e del 90% nel paziente PET negativo⁷⁹. In entrambe le patologie, ma soprattutto nel PMBCL, fino a pochi anni fa, la prognosi dei pazienti che ricadevano dopo ASCT o che erano refrattari alla terapia di salvataggio era generalmente infausta. Attualmente, grazie al progressivo miglioramento delle conoscenze nell'ambito della biologia dei linfomi e allo sviluppo di farmaci target che abbiano come bersaglio non solo la cellula tumorale ma anche il suo microambiente, la prognosi di questi pazienti si è sicuramente modificata.

Nello specifico, il ruolo sempre più chiaro dei checkpoints nell'evasione della risposta immunitaria da parte delle cellule neoplastiche ha portato allo sviluppo di numerosi anticorpi monoclonali diretti contro le proteine coinvolte nella de-regolazione immunitaria, allo scopo di ridurre la tolleranza periferica e abolire l'anergia e l'esaurimento dei linfociti T. CTLA-4 è stato uno dei primi meccanismi inibitori dell'attivazione T linfocitaria contro cui è stato sviluppato un farmaco target, l'ipilimumab. Tale molecola, un anticorpo monoclonale umanizzato IgG1, mediante il blocco di CTLA-4, favorisce il legame CD80-CD28 determinando l'interazione tra il linfocito T e la cellula presentante l'antigene e favorendo pertanto lo sviluppo della reazione immunitaria. Ipilimumab è stato valutato con studi di fase I in diverse patologie neoplastiche (melanoma, carcinoma del polmone, della vescica e della prostata), tra cui in 14 pazienti affetti da Linfoma di Hodgkin (LH) ricaduti o refrattari a trapianto allogenico. L'ORR è stata del 15% con l'ottenimento di due remissioni complete^{80,81}. I dati maggiormente rappresentati in letteratura per quanto riguarda il trattamento dei linfomi, tuttavia, sono legati all'utilizzo di farmaci contro la via di trasmissione di PD-1. Già a livello preclinico e in modelli animali, è stato evidenziato che l'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro il legame PD-1/PD-Ls aumenta la proliferazione e funzione

dei linfociti T, determinando lo sviluppo di una reazione immunitaria antitumorale⁸¹. Gli anticorpi anti PD-1, al momento utilizzati nella pratica clinica o in studi clinici, sono pembrolizumab e nivolumab, entrambi anticorpi monoclonali (mAb) IgG4 che presentano, rispetto agli anticorpi IgG1 e IgG3, una ridotta citotossicità anticorpo mediata (ADCC) e complemento mediata (CDC), allo scopo di prevenire la deplezione dei linfociti T attivati.

Nivolumab

Nivolumab è un anticorpo monoclonale completamente umanizzato, IgG4 diretto contro il dominio extracellulare di PD-1. In studi preclinici, è stato evidenziato come, su una linea cellulare mista di linfociti, l'azione di nivolumab determini il blocco della via di PD-1 con il conseguente aumento della proliferazione cellulare e della produzione di citochine. Anche in modelli animali è stata osservata una progressiva riduzione della massa tumorale a seguito della riattivazione della reazione immunitaria nei confronti della cellula neoplastica. A livello clinico, l'azione antitumorale di nivolumab è stata indagata in numerosi studi su pazienti con tumori solidi^{33,80-83}, in particolare, con carcinoma renale, polmonare e melanoma, con l'ottenimento di un tasso di risposta globale del 20%, a fronte di un buon profilo di tossicità. Per quanto riguarda i pazienti ematologici, un primo studio di fase I è stato condotto su una coorte di pazienti con malattia ematologica ricaduta o refrattaria, con l'obiettivo principale di valutare la sicurezza del farmaco (*CheckMate-039*)⁸³. Gli obiettivi secondari erano l'efficacia di nivolumab e la sua azione sull'espressione di PD-1 e dei suoi ligandi. Nei 23 pazienti affetti da LH ricaduto o refrattario, il tasso di risposta globale (ORR, *overall response rate*) è stato dell'87%, con un 17% di remissioni complete (RC), un 70% di remissioni parziali (RP) e un 13% di pazienti con malattia stabile. Il profilo di tossicità è stato buono, nessun paziente ha sperimentato una tossicità di grado 4 o 5, il 22% ha avuto una tossicità di grado 3 inerente a disturbi gastrointestinali, leuco-piastrinopenia e rialzo degli enzimi pancreatici. In conclusione, lo studio *CheckMate 039* ha mostrato che il trattamento con nivolumab presenta una buona efficacia anche in pazienti con LH pesantemente pretrattato, a fronte di un profilo di tossicità contenuto⁸³. Nel medesimo studio di fase I sono stati arruolati anche due pazienti affetti da PMBCL, entrambi hanno mantenuto una malattia stabile. L'efficacia di nivolumab è stata inoltre confermata in 243 pazienti affetti da LH ricaduto-refrattario (LH R/R) arruolati nel trial multicentrico di fase 2, *CheckMate 205*^{84,85}. In

seguito ad un follow-up mediano di 18 mesi la ORR è stata del 69% (16% di RC e 53% di RP), con una durata media della risposta di 16,6 mesi ed una progressione libera da malattia (PFS, *progression free survival*) media di 14,7 mesi. I pazienti sono stati inoltre suddivisi in tre sottogruppi a seconda della terapia precedentemente eseguita. Nello specifico, l'ORR è stata del 65% nei pazienti brentuximab vedotin (BV)-*naive*, del 68% nei pazienti sottoposti a BV dopo ASCT e infine del 73% nei pazienti sottoposti a BV pre o post ASCT⁸⁵. Tali risultati hanno accelerato l'approvazione da parte di FDA di nivolumab in monoterapia, nel trattamento di pazienti affetti da LH ricaduto o in progressione dopo trapianto di cellule staminali autologhe (ASCT) e dopo trattamento con brentuximab vedotin (BV) post ASCT. Nel 2018, anche l'agenzia italiana del farmaco (AIFA) ha approvato nivolumab, per la medesima indicazione.

Per quanto riguarda il PMBCL, l'utilizzo di nivolumab è stato testato in associazione a BV nello studio di fase 1/2, multicentrico, *CheckMate 436*⁸⁶. In particolare, 30 pazienti affetti da PMBCL ricaduti o refrattari ad ASCT o ad almeno 2 precedenti linee, se non candidabili ad ASCT, hanno ricevuto nivolumab (240 mg, flat dose) in associazione a BV (1.8 mg/Kg) ogni 3 settimane, fino a progressione di malattia o tossicità inaccettabile. Ad un follow-up mediano di 11.1 mesi, il 73% dei pazienti ha ottenuto una risposta, di cui il 37% completa. La durata mediana di risposta, così come la PFS ed OS mediane non sono state raggiunte. L'83% dei pazienti ha sperimentato almeno un evento avverso relato, di qualsiasi grado. Sedici pazienti (53%) hanno avuto una tossicità di grado 3-4, tra cui neutropenia, piastrinopenia e neuropatia periferica. Nessuna di queste tossicità ha determinato la morte del paziente, ma a causa della neuropatia periferica di grado 3, 3 pazienti hanno discontinuato il BV, proseguendo il trattamento con solo nivolumab⁸⁶. In conclusione, lo studio *CheckMate 436* ha dimostrato che l'associazione di nivolumab con BV sembra avere un'azione sinergica, determinando un elevato tasso di risposte globali e complete in pazienti affetti da PMBCL R/R, in assenza di nuovi eventi avversi. In particolare, il profilo di sicurezza della combinazione è risultato essere compatibile con il profilo di sicurezza di ciascuno farmaco, utilizzato singolarmente⁸⁶.

Pembrolizumab

Pembrolizumab è un anticorpo monoclonale completamente umanizzato, IgG4/k, diretto contro PD-1 che, analogamente a nivolumab, impedisce il legame recettoriale con PD-L1 e PD-L2. Inizialmente la sua efficacia è stata valutata sui tumori solidi, in particolare in pazienti affetti da melanoma, carcinoma renale e carcinoma del polmone non a piccole

cellule (NSCLC)⁸⁷. I risultati più promettenti sono stati ottenuti nel melanoma ricaduto, refrattario e metastatico, con un ORR del 38% e un profilo di tossicità contenuto, caratterizzato da rash cutaneo, prurito e diarrea⁸⁷; e nel NSCLC in cui è stata raggiunta una ORR di circa il 20%. Il primo studio con Pembrolizumab condotto in campo ematologico è stato lo studio di fase Ib, multicentrico, KEYNOTE-013 che prevedeva varie coorti di arruolamento riguardo diverse patologie: una coorte per pazienti con sindrome mielodisplastica a rischio intermedio-alto resistenti a terapia con ipometilanti, una coorte per pazienti con LH non responsivi o non eleggibili a terapia con BV o a trapianto autologo, una coorte per pazienti con linfoma primitivo del mediastino ricaduto/refrattario ed infine un'ultima coorte per altre istologie di linfomi non Hodgkin resistenti o inelleggibili a trapianto autologo. L'obiettivo principale dello studio era quello di determinare la sicurezza e la tollerabilità del farmaco in pazienti affetti da neoplasia ematologica pluri-trattata; gli obiettivi secondari erano la valutazione dell'efficacia del trattamento in termini di ORR, PFS e OS⁸⁸. Lo schema di trattamento, inizialmente, prevedeva la somministrazione di pembrolizumab al dosaggio di 10 mg/kg ogni due settimane fino a progressione di malattia o fino ad un massimo di due anni. In un emendamento successivo lo schema è stato modificato in pembrolizumab a dose fissa di 200 mg ogni 3 settimane. Tale modifica deriva da dati di farmacocinetica provenienti dagli studi sulle neoplasie solide, che hanno evidenziato una clearance sistemica del farmaco più lenta rispetto ai dati ottenuti sugli animali, con un maggiore tempo di dimezzamento. Dalle indagini di farmacodinamica è infatti emerso che il farmaco rimane fissato al target PD-1 a livello periferico in modo duraturo, con un tempo superiore ai 21 giorni. Dei 31 pazienti affetti da cHL arruolati nello studio KEYNOTE-013, il 55% aveva ricevuto più di quattro linee di terapia precedenti, mentre il 71% era recidivato in seguito ad ASCT. Il tasso di risposta complessivo è risultato pari al 65%, con un 16% di RC ed un 71% di RP. Il 70% delle risposte ottenute è durato in media 24 settimane, con una PFS del 69% a 24 settimane e del 46% a 52 settimane. Cinque pazienti hanno presentato eventi avversi di grado 3 correlati al farmaco, in assenza di decessi farmaco-relati⁸⁸. Successivamente, lo studio multicentrico di fase II, KEYNOTE-087⁸⁹ condotto su 210 pazienti con LH R/R, ha confermato l'efficacia di pembrolizumab (200 mg ogni 3 settimane) in questo subset. In particolare, il tasso di ORR è stato del 69% con 22.4% di RC. La PFS e l'OS a 9 mesi sono state rispettivamente del 63.4% e del 97.5%. Anche in questo studio, i pazienti sono stati suddivisi in 3 coorti, in base alla terapia precedentemente eseguita: nei pazienti che avevano ricevuto sia ASCT che BV post-

trapianto l'ORR è stata del 73.9% con un 21.7% di RC; il 64.2% dei pazienti non eleggibili a ASCT e che avevano fallito BV hanno ottenuto una risposta, di cui il 24.7% completa, ed infine, nei pazienti sottoposti a ASCT ma non a BV il tasso di risposte complessivo è stato del 70% con 20% di RC⁸⁹. Sulla base di questi risultati, dapprima negli Stati Uniti e successivamente in Europa, pembrolizumab è stato approvato in monoterapia nel trattamento di pazienti affetti da linfoma di Hodgkin classico, che abbiano fallito il trattamento con ASCT e BV o che non siano eleggibili al trapianto e abbiano fallito almeno 3 linee di terapia, tra cui una comprendente brentuximab vedotin. Per quanto riguarda il PMBCL, 21 pazienti con malattia R/R hanno ricevuto pembrolizumab all'interno dello studio di fase 1b, KEYNOTE-013 (coorte 4b)⁹⁰. Undici pazienti sono stati trattati con pembrolizumab al dosaggio di 10 mg/kg ogni 2 settimane, mentre i successivi 11 pazienti sono stati trattati con dose flat di 200 mg ogni 3 settimane. Il trattamento è stato continuato per un massimo di due anni o fino a tossicità inaccettabile. Il 33% dei pazienti ha ricevuto il farmaco dopo aver fallito il ASCT, mentre il 61% dopo aver fallito tre o più linee di terapia, senza però aver ricevuto ASCT, in quanto considerato non candidabile. I risultati ottenuti mostrano una ORR del 48% con 7 pazienti (33%) che hanno ottenuto una RC. Gli eventi avversi che si sono verificati hanno coinvolto il 61% dei pazienti e sono stati per lo più di grado 1 e 2, senza che nessuno di questi abbia portato alla sospensione del farmaco. L'unico evento avverso di grado 3 verificatosi è stato la neutropenia. In termini di sopravvivenza, la PFS mediana è stata di 10.4 mesi mentre l'OS mediana di 31.4 mesi. Nessuno dei 7 pazienti che ha ottenuto una remissione completa ha sperimentato una progressione di malattia, dopo un follow-up mediano di 29.1 mesi⁹⁰. Questi risultati sono stati confermati nello studio di fase 2, KEYNOTE-170, in cui 53 pazienti con PMBCL R/R sono stati trattati con pembrolizumab alla dose flat di 200 mg ogni 3 settimane. L'ORR è stata pari al 45%, con 13% dei pazienti in remissione completa. La mediana di OS non è stata raggiunta, mentre la mediana di PFS è risultata essere di 5.5 mesi. Anche qui, nessuno dei pazienti in RC ha sperimentato una progressione di malattia dopo un follow-up mediano di 12.5 mesi.⁹⁰ Sulla base di questi risultati, nel 2018 FDA ha approvato l'utilizzo di pembrolizumab nel trattamento di pazienti affetti da PMBCL R/R ad almeno due precedenti linee di terapia comprendenti il trapianto di cellule staminali autologhe oppure in pazienti non candidabili a procedura trapiantologica. Tale farmaco, ad oggi, non è approvato in Italia, ove è disponibile solo attraverso procedura *off-label* o richiesta di accesso al fondo 5% AIFA.

In conclusione, l'utilizzo degli inibitori di PD-1 sia nel trattamento del cHL che del PMBCL R/R ha determinato sicuramente una svolta nella prognosi e sopravvivenza di questi pazienti. Tale terapia ha, infatti, permesso di raggiungere RC durature piuttosto che permettere di traghettare il paziente verso procedure trapiantologiche quale il trapianto di cellule staminali da donatore, dando un'ulteriore possibilità per il raggiungimento dell'obiettivo ultimo, ossia la guarigione. Come abbiamo visto, non tutti i pazienti rispondono allo stesso modo, ed ancora molti di essi faticano a raggiungere una risposta. Per questo motivo, ad oggi, sono in corso numerosi studi sia in ambito preclinico che clinico volti a definire i meccanismi di resistenza ai CPI, piuttosto che a definire fattori biologici o clinici predittivi della risposta o a testare associazioni di farmaci potenzialmente sinergiche, da utilizzare anche in linee più precoci rispetto a quelle per cui gli anti-PD1 sono approvati.

CAPITOLO 3. MICROBIOTA INTESTINALE, CARCINOGENESI ED IMMUNOTERAPIA

Il microbiota consiste in un efficiente ecosistema costituito da quell'insieme di microrganismi simbiotici che popolano l'essere umano, senza danneggiarlo. L'interazione tra il microbiota ed il suo ospite è costante e reciproca ed è in grado di influenzare sia lo stato di salute che di malattia dell'uomo^{91,92}. Lo studio del microbiota umano e del suo patrimonio genetico, definito microbioma, è da sempre stato considerato problematico. La complessa struttura in cui sono organizzate le comunità microbiche rende infatti difficile la loro coltura in vitro, mentre il sequenziamento di tutto il microbioma risulta complesso a causa della mole di dati da analizzare e gestire. Nonostante ciò, lo sviluppo di recenti tecniche di *next generation sequencing* (NGS) e di metodi volti ad analizzare il metaboloma (spettrometria di massa) hanno permesso di ottenere notevoli progressi nel caratterizzare non solo la struttura del microbiota umano ma anche la sua funzione ed interazione con l'ospite. A questo scopo sono nati molteplici studi, tra cui i principali sono lo *Human Microbiome Project* (HMP)⁹³ ed il *Metagenomics of the Human Intestinal Tract* (MetaHIT).

3.1 PANORAMICA SUL MICROBIOTA INTESTINALE

Sebbene tutte le cavità dell'organismo umano collegate con l'esterno, così come la

superficie corporea, siano popolate da microrganismi, ad oggi il microbiota maggiormente studiato è quello intestinale. Con il termine di “microbiota intestinale” (MI o GM) si intende tutta la comunità microbica del tratto enterico, costituita prevalentemente da batteri ma anche da virus, parassiti e lieviti, che, normalmente, convivono in uno stato di *eubiosi*, ossia di equilibrio. Separato dall’ambiente esterno dalla barriera gastro-intestinale e continuamente alimentato dalla dieta dell’ospite, il MI ha trovato la nicchia migliore per poter stabilire una stretta associazione con l’ospite, aprendo la strada ad un processo di co-evoluzione unico, in cui l’essere umano ed il microbiota da lui ospitato coesistono, in un mirabile scenario mutualistico. Il microbiota intestinale rappresenta l’ecosistema microbico maggiormente popolato sul nostro pianeta (fino a 10^{12} unità formanti colonie (CFU)/gr fecale)⁹⁴, ed anche quello maggiormente stabile e contemporaneamente diversificato⁹⁵. Una delle prime evidenze emerse dai progetti HMP e metaHIT riguarda, infatti, la grande variabilità nella composizione del microbiota, sia tra soggetti diversi, sia all’interno dello stesso soggetto. Partendo da un set di geni comune alla maggior parte dei soggetti adulti, definito *microbiome core*, il microbioma si differenzia, influenzato da numerosi fattori quali l’età, l’ambiente, lo stile di vita, le abitudini alimentari, l’assunzione di farmaci, la comparsa di malattie, il genotipo e l’eventuale contatto con altri microrganismi^{93,96-100} (Fig 7).

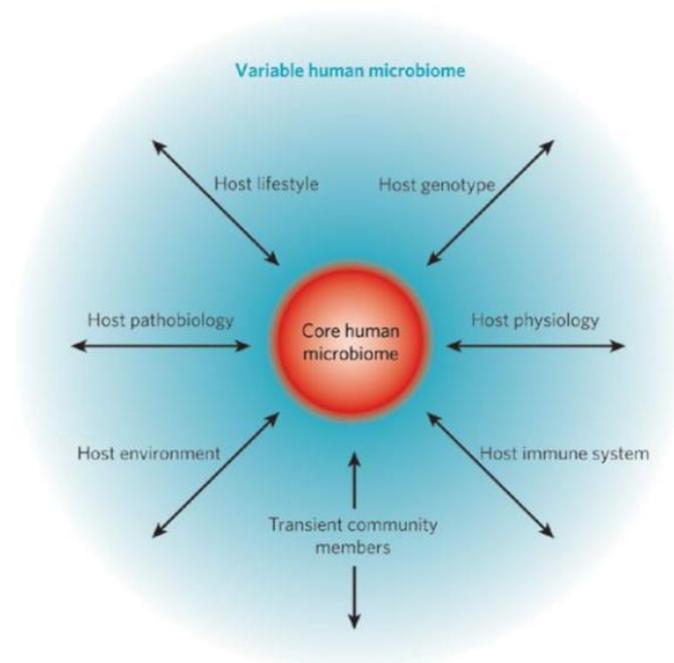


Figura 7. Variabilità del microbiota in risposta a stimoli intrinseci ed estrinseci

(Turnbaugh P. et al, Nature 2007, 449, 804-810)

Sebbene siano state identificate migliaia di specie batteriche differenti che popolano il MI, la maggioranza di esse appartiene a 6 specifiche *phyla* delle centinaia presenti in natura: *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, che insieme rappresentano circa il 90% della comunità microbica, si affiancano ad *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* che rappresentano i *phyla* sub-dominanti. Pertanto, a livello di *phyla* batterici, il MI dell'adulto è stabile (*core microbiome*), ma le specifiche specie e sub-specie e la loro proporzione variano enormemente da soggetto a soggetto, tanto che circa il 70% delle specie batteriche sono soggetto-specifico, portando alla formazione di una sorta di “impronta digitale” microbica, che identifica ciascuno di noi⁹⁵. Nonostante questa variabilità tassonomica interindividuale (chiamata *beta-diversity*), la capacità funzionale del microbiota intestinale del soggetto adulto è relativamente coerente tra le persone sane, con *pathways* coinvolti nei processi di metabolismo di carboidrati ed amminoacidi, fermentazione, fosforilazione ossidativa, piuttosto che di sintesi di vitamine, acidi grassi a catena corta (*short chain fatty acids*, SCFAs) e amminoacidi essenziali (Fig.8).

Oltre alla variabilità interindividuale, il microbiota intestinale si caratterizza anche per una variabilità intra-individuale ossia all'interno dello stesso soggetto, chiamata *alfa-diversity*, espressione di una rapida capacità di adattamento a differenti stimoli. Infatti, in un contesto mutualistico, il microbiota è capace di modificare rapidamente la sua composizione in risposta a variabili estrinseche (fattori legati all'ambiente in cui l'ospite vive, dieta, *lifestyle*) ed intrinseche (età, fattori genetici, malattie infiammatorie)¹⁰¹. L'esempio lampante della plasticità del microbiota intestinale è la sua rapida capacità di adattamento a modifiche sostanziali nella dieta dell'ospite, con un ritorno alla situazione precedente dopo circa 48 ore dalla sospensione di quella specifica dieta¹⁰². Tale capacità di adattamento è stata definita, nel 1973 da Hollinger e collaboratori, come *ecosystem resilience*, ossia la capacità di un sistema di rispondere agli stimoli e reagire ai cambiamenti da essi provocati, riorganizzandosi in modo tale da mantenere pressoché inalterate le sue funzioni¹⁰³. La *resilience* è tempo e spazio dipendente e presenta 4 caratteristiche che la descrivono: la panarchia (l'influenza delle dinamiche del sistema sulla capacità del sistema di recuperare lo stato pre-disturbo), la latitudine (il massimo disturbo che il sistema può sopportare, oltre il quale esso perde la capacità di recupero), la resistenza al cambiamento e la precarietà (la distanza dello stato del sistema dalla soglia oltre la quale esso viene attratto da un “bacino” diverso rispetto a quello in cui si trova). Come precedentemente accennato, la relazione che si instaura tra l'ospite ed il microbiota

è simbiotica: l'ospite offre un habitat ideale per la sopravvivenza dei microorganismi, e a loro volta i microorganismi partecipano alla salute dell'ospite.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ La continua interazione tra ospite e microbiota è fondamentale nel sostenere diverse funzioni dell'organismo umano, in particolare il MI è coinvolto nei processi di digestione e detossificazione di xenobiotici, nella sintesi di vitamine, SCFAs (butirrato, propionato, acetato e lattato) e amminoacidi essenziali, collabora nella formazione di una barriera intestinale solida contro la colonizzazione o l'invasione da parte di patogeni ed inoltre sembra avere un ruolo nello sviluppo, educazione e funzione del sistema immunitario dell'ospite, così come sembra modulare le attività sia endocrine che del sistema nervoso centrale¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ (Fig. 8). Un esempio lampante di questo rapporto simbiotico è rappresentato dall'interazione tra GM e dieta dell'ospite: la configurazione filogenetica del microbiota intestinale è indirizzata ad ottimizzare la sua capacità di metabolizzare i componenti della dieta. Dall'altra parte gli stessi componenti dietetici regolano la composizione del microbiota ed i prodotti del suo metabolismo, impattando sulla salute dell'ospite. La capacità metabolica del GM si interseca e spesso completa quella dell'ospite: il MI infatti possiede un complesso spettro di enzimi in grado, ad esempio, di metabolizzare polisaccaridi complessi¹¹⁰, altrimenti non digeriti dall'uomo, ricavando acidi grassi a catena corta, a loro volta responsabili della formazione di un ecosistema microbico che promuove la salute dell'ospite^{111,112}.

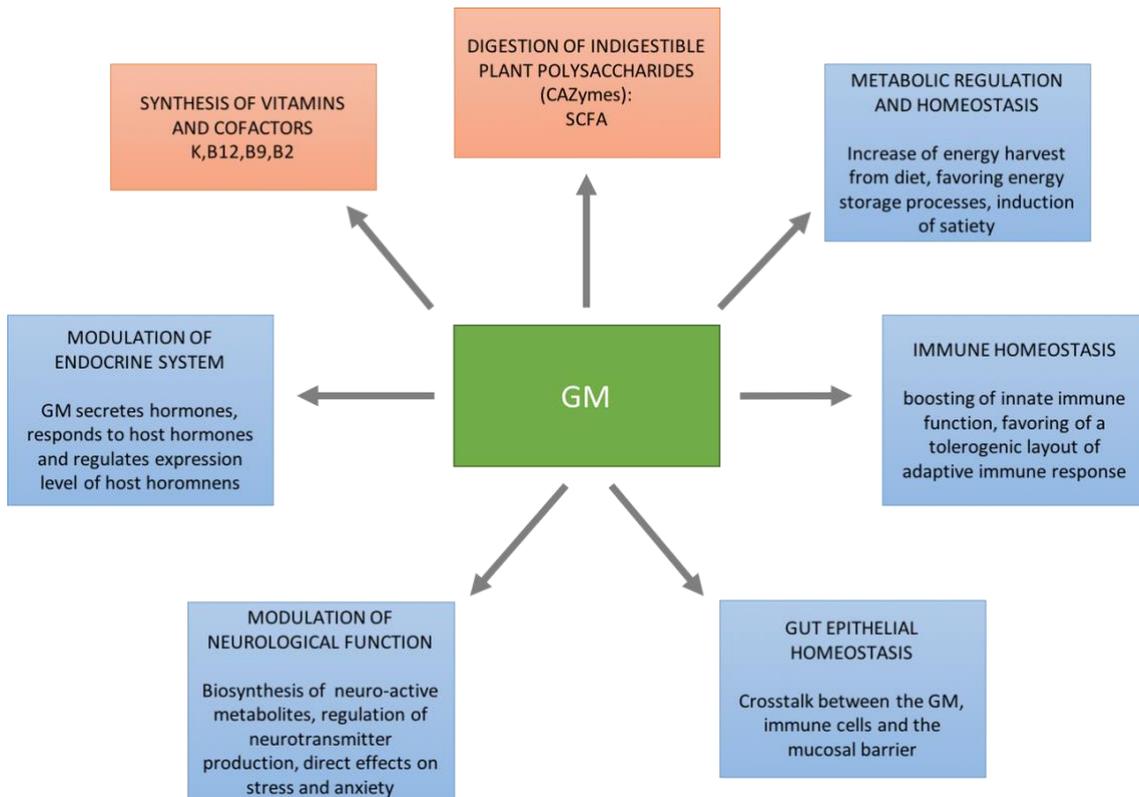


Figura 8. Principali funzioni del microbiota intestinale

La perdita del rapporto mutualistico tra ospite e microbiota, ossia la perdita della *resilience* dell'ecosistema microbiota, può compromettere lo stato di salute dell'ospite, favorendo pertanto l'instaurarsi di una condizione patologica. Come vedremo di seguito, numerosi studi, recentemente pubblicati, dimostrano il ruolo del microbiota intestinale sia nella carcinogenesi che nella risposta alle terapie anti-tumorali, nello specifico alla terapia con inibitori dei check-point immunitari¹¹³⁻¹¹⁵.

3.2 INTERAZIONE TRA MICROBIOTA E RISPOSTA IMMUNITARIA

Il tessuto linfoide associato all'intestino (GALT, *gut associated lymphoid tissue*) è il più grande organo linfoide dell'organismo umano, in grado di influenzare la risposta immune dell'uomo sia localmente che a livello sistemico. Il rapporto tra sistema immune mucosale e microbiota intestinale gioca un ruolo essenziale nella difesa dell'ospite, in particolare questo *cross talk* risulta critico e fondamentale per¹¹⁶:

- l'instaurarsi di una tolleranza da parte del GALT nei confronti dei batteri commensali e degli antigeni introdotti con il cibo (tolleranza orale);

- il riconoscimento da parte del GALT di batteri opportunistici allo scopo di prevenire processi infettivi;
- lo sviluppo della risposta immunitaria sia innata che adattativa.

Questo concetto è sostenuto da diversi studi condotti su animali *germ-free*, che dimostrano che il GM agisce direttamente sia sull'immunità locale, stimolando l'espressione di *toll like receptors* (TLR) e favorendo la differenziazione dei linfociti T intestinali e delle APC; sia a livello sistemico, aumentando la produzione anticorpale e la differenziazione dei linfociti T in senso CD4+ regolatorio. Pertanto, l'assenza del GM determina un severo immunodeficit, con scomparsa dello strato mucoso a livello epiteliale, una alterata secrezione di IgA, una ridotta produzione di linfociti Treg ed una ridotta formazione e funzionalità delle placche di Payer (PP)^{117,118}.

Il GALT è un tessuto complesso, costituito da innumerevoli cellule, sia dell'immunità innata che adattativa, che popolano e formano la mucosa intestinale, la lamina propria, le PP ed i linfonodi mesenterali. La mucosa intestinale è costituita da un unico strato di cellule epiteliali formato dagli enterociti, dai linfociti intraepiteliali, dalle cellule di Paneth, che secernono peptidi antimicrobici, e dalle cellule caliciformi (*globet cell*) che secernono muco, che a loro volta riveste lo strato epiteliale, agendo da barriera fisica nei confronti di patogeni. Sotto lo strato mucoso si trova la lamina propria, uno strato di tessuto connettivo in cui risiedono le PP (aggregati linfoidi costituiti da ampi follicoli di cellule B, una regione interfollicolare di linfociti T e numerosi macrofagi e DCs) ed una miriade di altre cellule immunitarie comprese le APCs, le cellule linfoidi innate, nonché i linfociti T-naive, i linfociti B e le plasmacellule secernenti IgA (Fig. 9).

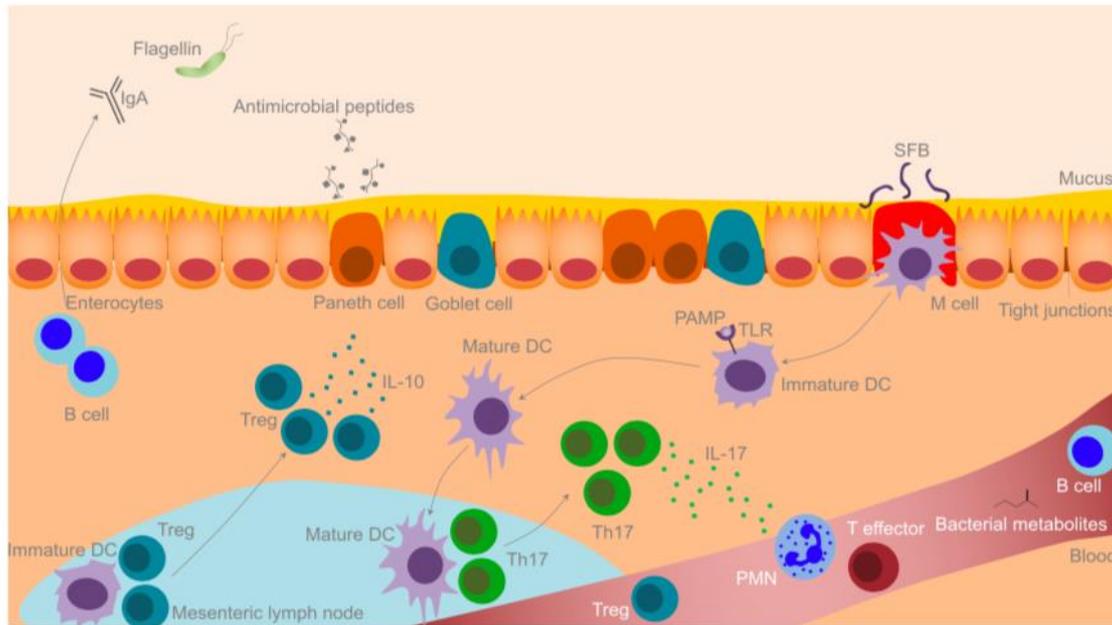


Figura 9. Il tessuto linfoide associato all'intestino

(Gopalakrishnan et al. Cancer cell-2018)

Gli organismi commensali all'interno del lume dell'intestino hanno profonde influenze sul sistema immunitario locale. Allo stesso modo il sistema immunitario può alterare il microbiota intestinale. L'immunità locale si sviluppa in seguito al riconoscimento di pattern molecolari associati ai patogeni (PAMPs), come il lipo-polissaccaride (LPS) e la flagellina, da parte di specifici recettori come i TLRs, espressi sia dalle cellule epiteliali intestinali che dalle cellule dendritiche del GALT. La cellula dendritica, attivata dopo il riconoscimento dei PAMPs, migra verso i linfonodi mesenteriali dove presenta l'antigene ai linfociti T naïve, stimolandone il differenziamento in senso Treg o Th17, a seconda del tipo di antigene riconosciuto. Le DCs possono stimolare direttamente anche la formazione di linfociti T CD8+. A loro volta, i linfociti attivati possono entrare nel circolo ematico oppure ricircolare nella lamina propria. I metaboliti prodotti dal microbiota possono influenzare l'immunità locale e la differenziazione T linfocitaria verso un fenotipo rispetto che l'altro. In particolare, gli SCFAs aumentano la secrezione di IgA da parte delle plasmacellule della lamina propria e stimolano la differenziazione dei linfociti in senso Treg grazie alla loro capacità di inibire l'attività dell'istone deacetilasi, suggerendo pertanto una regolazione epigenetica del differenziamento linfocitario¹¹⁹. Inoltre, alcune specie di batteri commensali, stimolano la formazione di linfociti Tregs attraverso specifici segnali indotti dal legame tra polisaccaride A ed il TLR espresso sulla cellula dendritica.

Dopo la differenziazione nei linfonodi mesenteriali, i linfociti T possono influenzare la risposta immunitaria a diversi livelli:

- a livello intestinale, nell'instaurare la tolleranza orale: i Treg inducono tolleranza nei confronti dei batteri commensali e degli antigeni introdotti con il cibo attraverso una continua risposta antinfiammatoria, sostenuta dalla produzione di IL-10. Come precedentemente descritto questa omeostasi è favorita dal microbiota intestinale stesso.
- nel proteggere contro infezioni da parti di patogeni: I linfociti Th 17, presenti in grande numero nella lamina propria, sono fondamentali nel proteggere l'uomo da infezioni microbiche. In particolare, attraverso la secrezione di IL-17 agiscono a vario livello. IL-17 infatti, stimola le cellule di Paneth a secernere peptidi antimicrobici, stimola la formazione delle *tight junctions*, rendendo l'epitelio meno permeabile e richiama i neutrofili dal circolo ematico, favorendo l'instaurarsi di un ambiente pro-infiammatorio¹²⁰.
- a livello sistemico, "preparando" la risposta immunitaria: il riconoscimento dei peptidi microbici da parte dei TLR espresso sulle DCs intestinali comporta, tra l'altro, il rilascio di citochine che agiscono sia in modo paracrino che endocrino, in siti distanti. Tali citochine, agendo a livello epigenetico o trascrizionale, sembrano avere un ruolo nel preparare il sistema immunitario ad emanare una risposta robusta in presenza di patogeni, piuttosto che mantenere uno stato "non infiammatorio", in assenza di una minaccia esterna¹²¹. Inoltre, i linfociti B e T, una volta riconosciuto l'antigene a livello dei linfonodi mesenteriali, possono circolare nel sangue per facilitare la risposta immunitaria in siti distanti dall'intestino.

Con il termine *disbiosi* si intende un'alterazione nella composizione del microbiota con conseguente perdita della sua bio-diversità. Tale alterazione è spesso associata all'instaurarsi di un loop pro-infiammatorio che favorisce la crescita di patobionti, ossia microorganismi opportunisti, a discapito di ceppi batterici "immuno-modulatori", quali quelli che producono SCFAc (Fig.10). Una struttura microbica che perde il suo equilibrio perde anche quel rapporto mutualistico con il suo ospite che si traduce in una predisposizione alla malattia, in particolare ad infezioni, malattie infiammatorie e neoplasie¹²². A livello intestinale, l'instaurarsi di una disbiosi determina una rottura della barriera mucosale, la traslocazione dei batteri intestinali nei linfonodi mesenteriali e nel

sangue periferico con creazione di una forte risposta infiammatoria sia locale che sistemica che può contribuire alla nascita e progressione di un clone neoplastico.

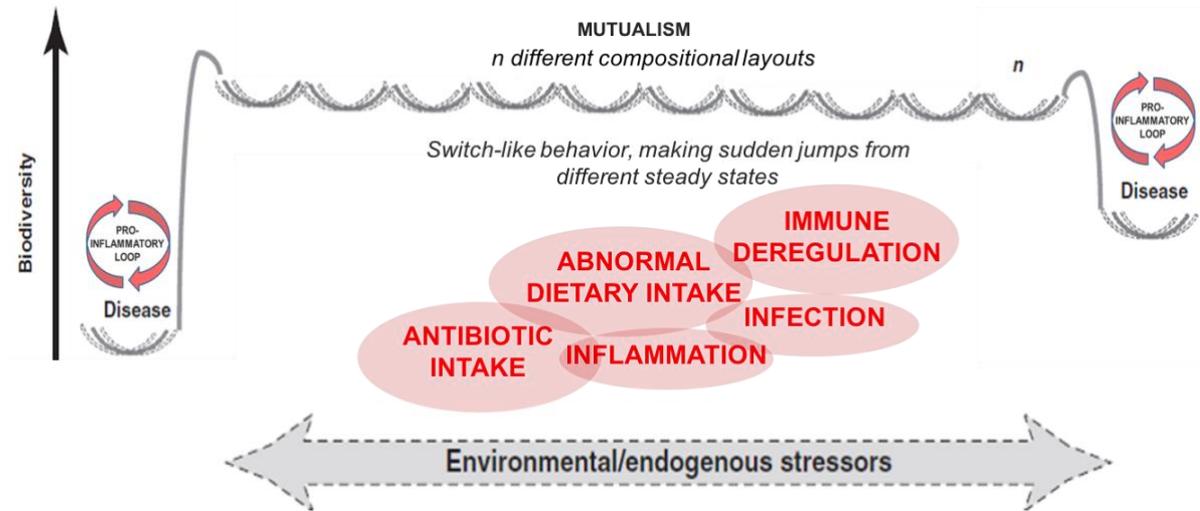


Figura 10. Disbiosi e malattia

3.3 IL MICROBIOTA INTESTINALE MODULA LA RISPOSTA E LA TOSSICITÀ ALLA CHEMIOTERAPIA

In considerazione del ruolo del microbiota intestinale nel modulare l'immunità dell'ospite, è abbastanza intuitivo che esso possa influenzare in modo significativo non solo il metabolismo ma anche la risposta e la tossicità di varie terapie antineoplastiche.

Il microbiota intestinale può influenzare il metabolismo dei farmaci assunti sia per via orale che per via sistemica¹²². Nel primo caso, il tasso di assorbimento e la biodisponibilità del farmaco dipendono dalla sua esposizione a livello intestinale ai batteri commensali, prima di entrare nella circolazione sistemica. I microrganismi possono legarsi ad alcuni xenobiotici, impedendone fisicamente l'assorbimento oppure possono metabolizzare e trasformare alcuni farmaci modificandone la biodisponibilità piuttosto che portando alla formazione di metaboliti inattivi o tossici, che possono avere una azione sia locale, modulando la conformazione del microbiota stesso, che sistemica, potenziando l'efficacia del farmaco o la sua tossicità¹²³. Per quanto riguarda i farmaci a somministrazione parenterale, dopo la loro somministrazione, più del 90% è disponibile in circolo per svolgere la propria azione. Ogni minuto, il 29% del sangue e del farmaco circolante raggiunge il fegato attraverso la circolazione splancnica. Nel fegato il farmaco

viene detossificato e successivamente secreto, per via biliare, nell'intestino dove è esposto al GM. A questo livello il farmaco, precedentemente detossificato, può essere nuovamente metabolizzato nella sua forma attiva dai batteri commensali, comportando una tossicità locale. L'irinotecano, chemioterapico endovenoso usato per il trattamento del cancro del colon, arriva nell'intestino nella sua forma detossificata SN-38-G. In presenza di beta-glucuronidasi, enzima batterico, esso viene nuovamente trasformato nella sua forma attiva, SN-38, causando una significativa tossicità intestinale e diarrea di vario grado. L'uso di specifici inibitori della beta-glucuronidasi sembra ridurre la tossicità intestinale da irinotecano, in alcuni modelli animali¹²⁴.

Oltre all'azione diretta dei microrganismi e degli enzimi microbici sull'assorbimento ed il metabolismo dei farmaci, il microbiota intestinale ed i suoi prodotti influenzano la biotrasformazione degli xenobioti anche indirettamente, attraverso la modulazione dell'espressione genica sia a livello locale che sistemico, ad esempio regolando l'espressione di determinati enzimi a livello epatico¹²⁵.

L'interazione diretta tra batteri commensali e farmaci può modulare l'efficacia della terapia con meccanismi che sono differenti a seconda del farmaco utilizzato e della composizione microbica intestinale, esaltando l'effetto del farmaco piuttosto che limitandone l'azione o favorendone la tossicità. L'azione antitumorale di cisplatino e ciclofosfamide è ridotta in studi condotti su cavie *germ-free*. Nelle cavie private del microbiota intestinale, l'oxaliplatino induce sia una minor espressione dei geni dell'infiammazione rispetto a quello che avviene nella controparte normale sia una minor apoptosi cellulare, a causa di una ridotta capacità del farmaco di indurre un danno al DNA. Il trattamento con *Lactobacillus acidophilus* ristabilisce l'effetto antitumorale del platino, favorendo la liberazione da parte delle cellule mieloidi intratumorali di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che concorrono a danneggiare il DNA e ad indurre la morte cellulare¹²². Pertanto, l'effetto terapeutico di un farmaco sembra secondario anche ad un certo tipo di composizione microbica in grado di esaltarne il meccanismo d'azione sia in modo diretto (portando alla formazione di metaboliti attivi) che indiretto (stimolando una risposta infiammatoria da parte delle cellule dell'immunità innata e adattiva sia localmente che a livello sistemico).

Inoltre, l'interazione diretta tra chemioterapico e batteri intestinali può modificare la composizione microbica, selezionando la crescita di alcuni batteri rispetto che altri ma può anche danneggiare l'integrità della barriera mucosale, con conseguente traslocazione di commensali e patogeni dal lume alla lamina propria. Questo evento può comportare

l'attivazione di una risposta immunitaria dapprima innata e successivamente adattativa con conseguente infiammazione locale e sistemica che può impattare sull'attività antitumorale dei farmaci. In conclusione, l'eterogeneità di risposta ad una certa terapia e la suscettibilità a determinati eventi avversi può essere dovuta, almeno in parte, alla differente composizione e attività del GM tra individui differenti.

3.4 MICROBIOTA INTESTINALE ED INIBITORI DEI CHECKPOINT IMMUNITARI

Nonostante l'iniziale entusiasmo nei confronti della terapia con CPI nel trattamento di differenti neoplasie, una significativa parte di pazienti non risponde alla terapia o perde rapidamente la risposta. Negli ultimi anni sono stati fatti innumerevoli sforzi nell'identificare potenziali predittori della risposta, piuttosto che strategie per superare eventuali meccanismi di resistenza. In questo contesto, si è aperto un ampio filone di studio sul ruolo del GM nel modulare la risposta a questo tipo di terapie. Le prime pubblicazioni inerenti alla composizione del microbiota e alla sua influenza sulla risposta ad anticorpi anti CTLA-4¹²⁶ e PD-1¹²⁷ risalgono al 2015. In studi *in vivo* su cavie trattate con anti-CTLA-4, si è assistito ad un significativo cambiamento in termini di abbondanza relativa nel microbiota intestinale, con un incremento relativo di *Bacteroidales* e *Burkholderiales* ed una riduzione di *Clostridiales*. L'efficacia della terapia era marcatamente ridotta in topi *germ-free* o trattati con antibiotici. La somministrazione orale di *Bacterioides fragilis* in combinazione con *Bacterioides thetaiotaomicron* o *Burkholderia cepacia*, aumentava l'azione della terapia con anti-CTLA-4 favorendo una risposta T helper 1 e la formazione intra-tumorale di DCs¹²⁶. Contemporaneamente, Sivan e collaboratori, dimostravano l'associazione tra una prevalenza di *Bifidobacterium* species nel GM e la risposta favorevole alla terapia con inibitore di PD-1. In aggiunta, la somministrazione per via orale di probiotici contenenti *bifidobacterium*, ripristinava l'attività anti-tumorale degli inibitori di PD-1 in topi con un microbiota considerato sfavorevole, favorendo la maturazione di DCc con conseguente aumento dell'attività di linfociti T citotossici intra-tumoral¹²⁷. Negli anni successivi sono state pubblicate diverse scoperte riguardo il ruolo del GM nell'influenzare la risposta ai CPI. In primis, in un'ampia coorte di pazienti affetti da NSCLC, tumore renale o carcinoma uroteliale è stato dimostrato che l'utilizzo di antibiotici poco prima, durante o subito dopo una terapia con inibitori dell'asse PD-1/PD-L1 si associa ad una significativa riduzione della PFS ed OS. Tale scoperta suggerisce che l'alterazione della composizione e diversità microbica

indotta dagli antibiotici può potenzialmente inficiare la risposta immune anti-tumorale e pertanto la funzione dei CPI¹¹⁴. Inoltre, lo studio del GM di questi pazienti ha mostrato che i pazienti responsivi al blocco di PD-1 presentano un microbiota costituito da specifici generi (*Akkermanisa e Alistipes*). Lo studio condotto da Gopalakrishnan *et al.* ha rilevato che i pazienti responsivi ai farmaci anti PD-1 hanno un GM altamente diversificato e con un'abbondanza relativa di *Clostridiales*, *Ruminococcaceae* e *Faecalibacterium*^{128,129}. Al contrario, i pazienti *non responder*, hanno una minore diversità nella composizione microbica intestinale caratterizzata da un'abbondanza di *Bacteroidales*. Inoltre, i pazienti con un microbiota favorevole presentano a livello tumorale un incremento nell'espressione di linfociti T citotossici e cellule APC. Un'altra corte di pazienti affetti da melanoma metastatico ha dimostrato una differenza statisticamente significativa nella risposta al trattamento con CPI: i pazienti *responders* presentavano un GM ricco di *Bifidobacterium longum*, *Collinsella aerofaciens*, ed *Enterococcus faecium* in campioni fecali pre-terapia. Anche in questo studio, come in quelli sopra riportati, il trasferimento del campione fecale del paziente *responder* ad un topo *germ-free* ha replicato con successo il fenotipo favorevole, portando ad una riduzione della crescita tumorale rispetto alla cavia che ha ricevuto il campione fecale del paziente *non responder*. Questo effetto è mediato da un aumento dei linfociti T CD8+ e ad una riduzione dei linfociti Treg CD4+ nel microambiente tumorale¹²⁹. Recentemente, inoltre, molti sforzi sono stati spesi nel cercare di caratterizzare quale tipo di microbiota contribuisca alla tossicità indotta dai CPI, sia a livello intestinale che sistemico. In pazienti con melanoma trattati con Ab anti CTLA-4, è stata riportata una differenza sia tassonomica che funzionale tra il microbiota di pazienti liberi da tossicità intestinale (ricco di *Bacteroidetes*) rispetto a quello di pazienti che hanno sperimentato la colite. Tale differenza potrebbe essere secondaria al noto ruolo di questa specie batterica nel favorire la differenziazione in senso Treg¹³⁰. Successivamente due studi hanno dimostrato che pazienti con una maggiore abbondanza di *Faecalibacterium prausnitzii* ed altri *Firmicutes* ed una ridotta abbondanza di *Bacteroidetes* ha un maggior rischio di sviluppare una tossicità intestinale relata a terapia con anti-CTLA-4¹³¹.

Sulla base degli studi sopra riportati, i taxa batterici appartenenti alla famiglia delle *Ruminococcaceae*, facenti parte del phylum *Firmicutes*, sono stati associati sia ad una risposta che ad una tossicità ai CPI. Al contrario taxa batterici dell'ordine dei *Bacteroidales*, del phylum *Bacteroidetes*, sono stati associati ad una minore incidenza di tossicità intestinale, sebbene determinino una mancata risposta ai CPI¹¹⁶. E' importante

specificare che a livelli tassonomici più bassi questa generalizzazione non è stata dimostrata, così come, anche altri taxa al di fuori di firmicutes e bacteroidetes, sono stati associati ad una risposta o meno ai CPI. Risultati discordanti e differenti possono essere relati a diversi fattori, in primis alla non omogeneità tra gli studi nell'utilizzo delle tecniche di analisi dei campioni, così come l'uso di cavie provenienti da differenti venditori può determinare modifiche nei risultati in quanto tali cavie possono presentare un differente microbiota. Inoltre, vi può essere una influenza geografica che si riflette anche nello stile di vita e nella dieta di pazienti arruolati nei rispettivi studi. Nonostante questi potenziali bias, dagli studi ad oggi riportati certamente si deduce che un certo tipo di microbiota sia in grado di modulare la risposta immunitaria intra-tumorale determinando una efficacia terapeutica degli inibitori dei checkpoints immunitari.

CAPITOLO 4. RUOLO DEL MICROBIOTA INTESTINALE NELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON ANTICORPI ANTI CHECKPOINTS IMMUNITARI IN PAZIENTI AFFETTI DA LINFOMA.

4.1 INTRODUZIONE

Il trattamento del paziente affetto da linfoma di Hodgkin oppure da linfoma primitivo del mediastino refrattario o ricaduto in seguito a chemioterapia convenzionale rappresenta tutt'oggi una sfida per l'ematologo, sebbene l'ingresso in scena di farmaci capaci di ripristinare la risposta antitumorale mediata dai linfociti T abbia sicuramente modificato la storia terapeutica di entrambe le patologie. In particolare, sia nivolumab che pembrolizumab permettono a circa il 50-70% dei pazienti di ottenere una risposta, che nel 20-25% dei casi è completa. Nonostante ciò, oltre la metà dei pazienti, a parità di patologia e di farmaco ricevuto, non risponde, perde la risposta o sviluppa eventi avversi immuno-relati. La comprensione della variabilità di risposta in pazienti con stessa patologia, sottoposti a stesso trattamento rappresenta un punto chiave nella ricerca oncologica. Negli ultimi anni, anche in ambito ematologico, è stato fatto un grande sforzo nel cercare di identificare quali potessero essere i fattori predittivi della risposta e le potenziali cause di resistenza alla terapia con anti PD-1, allo scopo di offrire una possibilità di cura ad un numero sempre maggiore di pazienti, considerandone anche la giovane età e la potenziale prospettiva di vita. Studi recenti hanno suggerito che la struttura individuale del microbiota intestinale e la sua dinamica temporale nel corso di

chemio-immunoterapia possono influenzarne l'*outcome*, modulandone l'efficacia e la tossicità. Nonostante l'avanzamento scientifico nello studio del microbiota, il link tra microbiota intestinale e terapie ematologiche è stato scarsamente esplorato e mancano dati su patologie specifiche e su farmaci specifici nell'uomo. In questo scenario, ipotizziamo che la caratterizzazione longitudinale del microbiota intestinale di pazienti affetti da linfoma di derivazione B linfocitaria trattati con CPI e la sua correlazione con la risposta al trattamento e con lo sviluppo di eventi avversi possa avere un ruolo nel delineare l'*outcome* di tali pazienti e nell'identificare nuovi criteri di stratificazione del rischio.

4.2 SCOPO DEL PROGETTO

Obiettivo primario dello studio:

- Caratterizzazione longitudinale del microbiota intestinale di pazienti affetti da linfoma trattati con anticorpi anti-checkpoint inibitori (pre, durante e post terapia).

Obiettivi secondari

- Identificazione della possibile correlazione tra la composizione del microbiota intestinale pre-terapia e la risposta alla terapia stessa.
- Caratterizzazione delle reciproche modifiche tra microbiota e metaboliti del farmaco.
- Stratificazione dei pazienti in base alla composizione del microbiota intestinale per fornire classi di rischio.

4.3 MATERIALI E METODI

L'Istituto di Ematologia "Lorenzo e Ariosto Seràgnoli" rappresenta un centro di riferimento a livello nazionale per la diagnosi e la cura dei pazienti affetti da linfoma. Negli ultimi 5 anni, abbiamo avuto la possibilità di utilizzare nivolumab e pembrolizumab per il trattamento di pazienti affetti da LH o PMBCL R/R sia all'interno di trial clinici internazionali di fase 1 o 2, sia in ambito commerciale secondo i criteri di rimborsabilità AIFA, piuttosto che accedendo a richieste *off-label* o a fondi per malattie orfane. In questo setting, il nostro progetto prevede l'arruolamento di pazienti con età ≥ 18 anni, affetti da LH variante classica o PMBCL istologicamente confermato (revisione istologica centralizzata), candidati a terapia con anticorpi anti-checkpoint inibitori. In particolare, in base all'istologia e alla storia terapeutica, i pazienti sono stati avviati a terapia con

nivolumab, alla dose di 3mg/Kg o di 240 mg ogni due settimane per un massimo di 2 anni o pembrolizumab, alla dose fissa di 200 mg ogni 3 settimane per un massimo di 2 anni. Non sono stati presi in considerazione pazienti che presentavano una seconda concomitante patologia neoplastica e/o una malattia autoimmune attiva. Lo studio si configura di natura esplorativa, non è stato pertanto previsto un calcolo formale della dimensione campionaria. In base all'esperienza clinica, è previsto l'arruolamento di un massimo di 20 pazienti.

Lo studio, tutt'ora in corso, è stato condotto in accordo con tutte le leggi e i regolamenti internazionali applicabili, in base alla dichiarazione di Helsinki del 1964 e successivi emendamenti e con le buone regole di pratica clinica. Lo studio è stato approvato dal comitato etico del centro Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico "Sant'Orsola-Malpighi".

A partire dal Dicembre 2017 fino all'Ottobre 2020, sono stati arruolati consecutivamente 17 pazienti, di cui 12 affetti da cHL e 5 da PMBCL. In ragione della peculiarità clinica del trattamento ricevuto e della patologia di base, i pazienti hanno richiesto visite specialistiche ematologiche dedicate e frequenti, con la ripetizione di esami ematochimici prima di ogni infusione di terapia, allo scopo di registrare la comparsa di eventi avversi (gradati secondo il CTCAE vers4.3), il timing di comparsa e la loro eventuale risoluzione. In caso di tossicità del sistema immunitario ed in particolare di evidenza di tiroiditi e/o coliti si è ritenuta necessaria la collaborazione con i Colleghi Endocrinologi e Gastroenterologi. Ai pazienti arruolati è stato inoltre consegnato, sia nella fase di screening che ad ogni ciclo di trattamento, un diario con questionario validato riguardante le abitudini alimentari avute durante la terapia, i diari sono stati raccolti ad ogni successiva visita ematologica. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione strumentale della risposta al trattamento mediante PET-FDG e/o TAC collo, torace, addome completo c\s mdc, con tempistiche variabili a seconda del farmaco inibitore di PD-1 utilizzato. La valutazione della risposta al trattamento segue i criteri dell'International Working Group (IWG) 2007¹³² e 2014^{133,134}. Si segnala che i pazienti che hanno sospeso il trattamento a causa di una progressione di malattia o per tossicità ematologica (grado 4, secondo il CTCAE v4.0) e/o extra-ematologica (grado ≥ 3 secondo il CTCAE v4.0) sono stati comunque seguiti in follow-up clinico e strumentale, mediante diagnostica per immagini.

Dal punto di vista biologico si è proceduto all'analisi molecolare dei campioni fecali dei primi 12 pazienti arruolati. I campioni fecali sono stati raccolti prima dell'inizio del trattamento, prima di ogni ciclo di terapia e in caso di tossicità gastro intestinale e/o del sistema immunitario di grado ≥ 2 o in caso di tossicità extra-ematologica di grado ≥ 3 , secondo il CTCAE v4.3. L'estrazione del DNA batterico da feci è stata portata a termine usando il kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN) con alcune modifiche precedentemente validate¹³⁵. La concentrazione finale del DNA è stata determinata usando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000. Per quanto riguarda la caratterizzazione filogenetica del microbiota intestinale, l'analisi è stata effettuata mediante amplificazione delle regioni ipervariabili V3 e V4 del gene batterico codificante il 16S rRNA, seguendo il protocollo Illumina per la preparazione delle librerie. La procedura di sequenziamento ottimizzata per la piattaforma Illumina MiSeq è descritta nello studio di *Caporaso et al.*¹³⁶ Le sequenze ottenute sono state analizzate attraverso il software open source Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) come precedentemente descritto^{137,138}. In breve, le sequenze vengono filtrate per qualità, raggruppate sulla base dell'identità al 97% in Operational Taxonomic Units (OTUs) e quindi assegnate tassonomicamente ad un taxon batterico. Il potenziale funzionale del microbiota intestinale è stato studiato mediante sequenziamento shotgun del metagenoma batterico fecale. A tal fine, sono stati seguiti i protocolli di analisi utilizzati in *Rampelli et al*¹³⁹. In breve, le sequenze ottenute su piattaforma Illumina sono filtrate per qualità e contaminazione da DNA genomico umano utilizzando la procedura descritta dallo Human Microbiome Project⁹³. Le sequenze risultanti sono assegnate funzionalmente all'interno del database KEGG¹⁴⁰, utilizzando l'algoritmo di calcolo Metagenome Composition Vector (MetaCV)¹⁴¹. I dati così ottenuti vengono analizzati con il software R per le valutazioni statistiche. Tutti i dati filogenetici e funzionali del microbiota intestinale, i dati delle abitudini alimentari, i dati relativi alla patologia e alla terapia vengono progressivamente inseriti in un database comune, allo scopo di valutare la relazione tra microbiota intestinale, l'incidenza dei vari descrittori e la risposta alla terapia, così come valutare l'incidenza dei vari descrittori sulla struttura e funzionalità del microbiota intestinale dell'individuo. La diversità del microbiota intestinale è stata studiata sviluppando curve di rarefazione di alpha-diversity a partire da diverse metriche, quali: Faith's phylogenetic diversity, Chao1, observed species, and Shannon index metrics. La diversità interindividuale nella composizione del microbiota intestinale (beta-diversity) è stata valutata mediante distanze UniFrac weighted and unweighted, che saranno poi utilizzate come input per l'analisi delle coordinate principali

(PCoA). I grafici di PCoA, heatmap e i bar plot sono stati costruiti utilizzando i pacchetti Made4 and Vegan di R. L'analisi statistica è stata portata a termine utilizzando i pacchetti Vegan e Stats di R. La separazione dei dati in PCoA è stata testata utilizzando un test di permutazione con pseudo F-ratios (funzione Adonis, pacchetto Vegan). Il test di Fisher (exact test) è stato utilizzato per valutare la significatività delle differenze tra i cluster ottenuti mediante analisi di clustering gerarchico. Il Wilcoxon signed-rank test è stato utilizzato per comparare alpha e beta-diversity dell'ecosistema microbico intestinale tra i diversi gruppi di soggetti. Le differenze significative in abbondanza relativa dei gruppi microbici (o gruppi funzionali o metaboliti) del microbiota intestinale tra i diversi gruppi di soggetti sono state valutate mediante Student's t-test o Mann-Whitney U test. I P value sono stati corretti per comparazione multipla utilizzando il metodo di Benjamini-Hochberg. Un valore di *false discovery rate* <0.05 è stato considerato come statisticamente significativo. Le correlazioni tra variabili sono state valutate mediante Kendall correlation test utilizzando la funzione cor.test del pacchetto Stats di R. Le variabili demografiche e cliniche saranno tabulate mediante analisi di tipo descrittivo, quali: punteggio grezzo e range di riferimento per quanto riguarda le variabili di tipo qualitativo; medie e deviazioni standard, valori minimi e massimi per le variabili di tipo quantitativo. Le relazioni tra diversità del microbiota, istologia, indicatori clinici dello stato di malattia e, eventualmente, tossicità saranno valutate mediante correlazione e regressione. Saranno infine tabulati i dati circa la sicurezza in base alla registrazione degli eventi avversi. I dati verranno analizzati utilizzando il pacchetto statistico Stata 11, (StataCorp. 2009. Stata Statistical Software: Release 11. College Station, TX: StataCorp LP).

4.4 RISULTATI

Caratteristiche dei pazienti analizzati

Da dicembre 2017 fino ad ottobre 2020, 17 pazienti, di cui 12 affetti da cHL e 5 da PMBCL, sono stati consecutivamente arruolati in questo studio. Di seguito riporteremo sia le caratteristiche cliniche (Tabella 2) che le analisi biologiche preliminari dei primi 12 pazienti arruolati (9 cHL e 3 PMBCL), con campioni fecali raccolti da Dicembre 2017 fino a Luglio 2020.

L'età mediana dei 12 pazienti analizzati è pari a 28 anni (range 18-71), 8 sono donne. Al momento dell'arruolamento, undici pazienti si presentavano con malattia refrattaria, con una mediana di precedenti linee di terapia pari a 3 (range 2-8). Dei nove pazienti affetti

da cHL, 8 hanno ricevuto nivolumab (3 al dosaggio di 3 mg/kg) mentre 1 solo paziente ha ricevuto pembrolizumab (alla *flat dose* di 200 mg). Tutti e tre i pazienti affetti da PMBCL hanno ricevuto pembrolizumab alla *flat dose* di 200 mg. Al momento dell'analisi dei dati, la mediana di cicli di terapia eseguiti era pari a 14 (range 1-21). Indipendentemente dall'istologia e dal prodotto infuso, 6 pazienti hanno ottenuto una risposta, di cui 5 una remissione completa (3 pazienti affetti da LH e 2 pazienti affetti da PMBCL) ed uno, una remissione parziale (LH). In totale 10 pazienti hanno interrotto precocemente il trattamento. In particolare, 6 hanno sospeso per progressione di malattia o perdita della risposta, mentre due pazienti, affetti da cHL ed in remissione completa, hanno interrotto per eseguire consolidamento mediante trapianto di cellule staminali autologhe. Un paziente ha sospeso il trattamento con nivolumab per tossicità extraematologica di grado 3, comparsa dopo circa 15 cicli di terapia ed infine un ulteriore paziente ha ritirato il consenso dopo 1 ciclo di terapia. Due pazienti sono tutt'ora in trattamento, in risposta completa.

Complessivamente la terapia è stata ben tollerata, come precedentemente descritto, solo un paziente ha sperimentato una tossicità di grado 3 caratterizzata da diarrea secondaria ad ileite, risolta con sospensione della terapia e trattamento con budesonide. Sei pazienti hanno avuto almeno un evento extraematologico di grado ≤ 2 . In particolare, 2 pazienti hanno sviluppato un processo tiroiditico, asintomatico, che non ha determinato una sospensione della terapia con CPI. Dopo un follow-up mediano di 12 mesi, 11 pazienti sono ancora viventi, di cui 6 in remissione completa. Un paziente è deceduto per progressione di malattia.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9	Patient 10	Patient 11	Patient 12
Età/Sesso	31/F	34/F	71/M	44/M	26/F	26/F	26/F	26/F	31/F	18/F	41/M	19/M
Istologia	LH sclerosi nodulare	LH cellularità mista	LH sclerosi nodulare	LH sclerosi nodulare	LH sclerosi nodulare	PMBCL	LH sclerosi nodulare	PMBCL	LH sclerosi nodulare	PMBCL	LH sclerosi nodulare	LH sclerosi nodulare
Stadio pre CPI (Ann Arbor)	II B	II B	III A	IV B bulky	II B	II B bulky	III A	IV A bulky	IV A	II A bulky	IV A	IV A
Precedenti linee di tp (N)	3	8	5	5	3	2	3	3	4	3	3	4
Ultima linea pre CPI	ASCT	Caelyx	Caelyx	ASCT	BV	R-IEV	BV	R-DHAP	BV	RT	BV	BV
Ricaduto o refrattario	Ricaduto	Refrattario	Refrattario	Refrattario	Refrattario	Refrattario	Refrattario	Refrattario	Refrattario	Refrattario	Refrattario	Refrattario
Stadio pre CPI	II A	III A	III A	IV A	II B	II A bulky	II A	IV B bulky	IV A	IV A bulky	III A	IV A
ECOG	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2	0	0
BMI	25,7	22,4	24	24	19,8	23,9	20,3	29,4	35,4	19	27,7	21,7
Type of CPI	Nivolumab (3mg/kg)	Nivolumab (3 mg/kg)	Nivolumab (3 mg/kg)	Nivolumab (flat dose)	Pembrolizumab (flat dose)	Pembrolizumab (flat dose)	Nivolumab (flat dose)	Pembrolizumab (flat dose)	Nivolumab (flat dose)	Pembrolizumab (flat dose)	Nivolumab (flat dose)	Nivolumab (flat dose)
Cycles CPI (N)	13	6	18	17	15	21 (ongoing)	15	1	17	4	7	11 (ongoing)
Best response al CPI	SD	SD	PR	PR	CR	CR	PR	CR	PR	PD	CR	CR
Risposta finale al CPI	SD	PD	PR	PD	CR	CR	PD	CR	PD	PD	CR	CR
AE relato a CPI (tipo e grado)	Diarrea, gr 1	No	ileite, gr 3 Polmonite da farmaci, gr 2 MEA, gr 2	Ipotiroidismo, gr 1	Febbre (IR), gr 2	No	Febbre (IR), gr 1	No	Iperesoinfilia, gr 1	No	No	Ipotiroidismo gr 1

Tabella 2. Caratteristiche dei 12 pazienti analizzati

(Abbreviazioni: AE= adverse event; ASCT= autologous stem cell transplant; BMI= body max index; BV=brentuximab vedotin; CPI=check point inhibitors; CR= complete remission; F=female; ECOG= eastern cooperative oncology group; LH=linfoma di Hodgkin; IR=infusion related; M=male; MEA: anemia emolitica autoimmune. PMBCL: primary mediastinal B cell lymphoma; PR: partial remission; PD: progression disease; R-DHAP=rituximab, dexamethasone, high dose cytarabine, cisplatin; R-IEV=rituximab, ifosfamide, etoposide, gemcytabine; RT=radiotherapy; SD: stable disease)

Risultati preliminari dall'analisi dei campioni fecali

La struttura dell'ecosistema microbico dei campioni baseline dei pazienti arruolati è stata dapprima confrontata con quella di 31 controlli sani, comparabili in termini di età e genere rispetto al nostro campione¹³⁸. In particolare, rispetto ai 12 pazienti arruolati, sei pazienti (p01, p02, p03, p07, p10, p12) avevano raccolto e consegnato il campione biologico pretrattamento. In termini di significatività intra individuale (diversità alpha), per entrambe le metriche utilizzate (Shannon ed inverse Simpson) non sono state rilevate differenze significative (p value >0.05, Wilcoxon test), mentre in termini di diversità beta (diversità interindividuale), l'indice di similarità Bray-Curtis ha messo in evidenza una segregazione significativa tra i due gruppi di studio (p value < 1x10⁻⁴), oltre ad una maggiore dispersione nel gruppo dei pazienti (Fig. 11). In particolare, considerando la composizione tassonomica a livello di genere, l'ecosistema microbico dei nostri 6 pazienti risulta arricchito in *Dialister e Collinsella*, quest'ultima solitamente riscontrata in abbondanza nel microbiota di pazienti con disordini metabolici, mentre non risultano esserci dati di una sua abbondanza relativa in soggetti con sindrome linfoproliferativa.

All'abbondanza di *Dialister* e *Collinsella* si associa una diminuzione di *Bacteroides* e *Faecalibacterium*, rispetto ai controlli sani. La diminuzione di *Faecalibacterium*, produttore di acidi grassi a catena corta, fondamentali per il “benessere” dell'ospite, potrebbe essere relata ad un adattamento del microbiota a stimoli precedenti, quali l'assunzione di antibiotici piuttosto che l'esecuzione di chemio-immunoterapia. Dobbiamo infatti considerare che tutti i pazienti arruolati sono precedentemente trattati e che la maggior parte di essere risultano refrattari al precedentemente trattamento con un tempo mediano di inizio della terapia con CPi pari a 60 giorni (range 8-179).

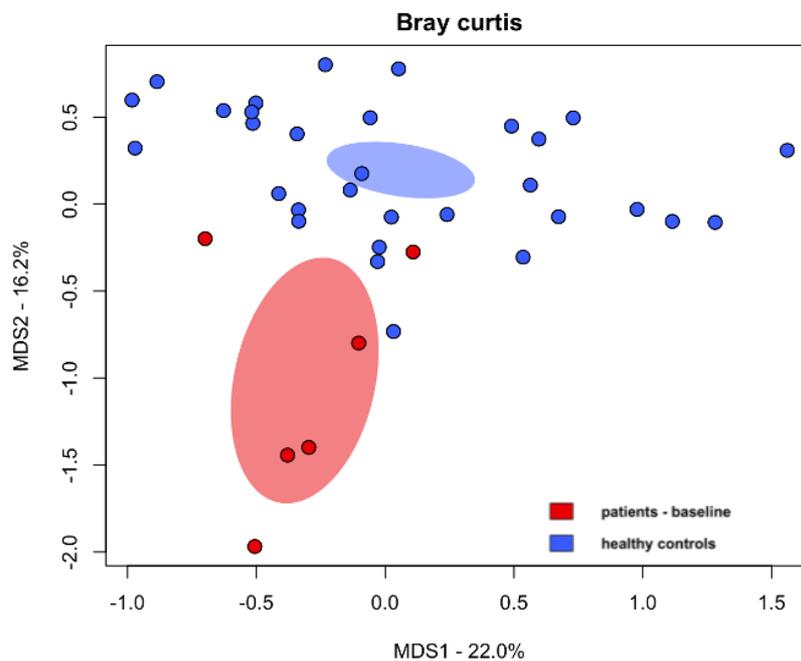
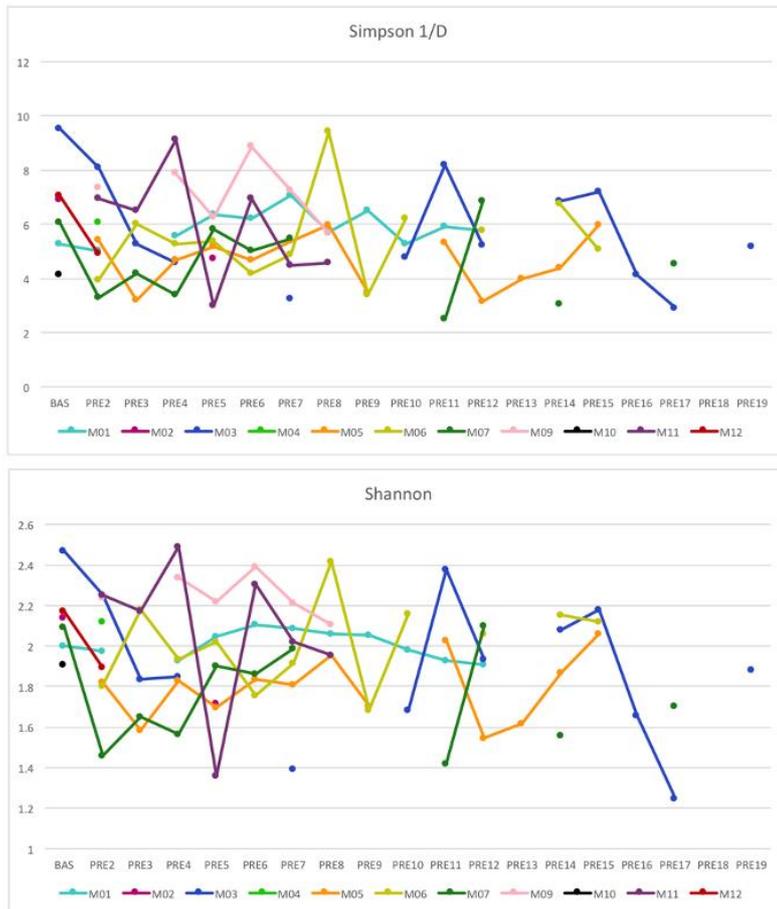


Figura 11. Beta diversità tra gruppo controllo e gruppo pazienti

Per quanto riguarda le analisi dell'intero data set, dobbiamo specificare che il campionamento di alcuni pazienti non è stato completo a causa della mancanza di materiale fecale ad alcuni time points, specialmente finali. Al momento, pertanto, è stato possibile tracciare una adeguata traiettoria del microbioma di 7 pazienti (p01, p03, p05, p06, p07, p09, p11) su 12.

Andando ad analizzare l'alfa diversità all'interno dell'intero dataset, si nota, già a partire dal secondo ciclo di trattamento, un trend di diminuzione della biodiversità dell'ecosistema microbico, con una riduzione statisticamente significativa nel corso del tempo se si vanno a valutare le traiettorie dei singoli pazienti (p value <0.04) (Fig.12).

Pertanto, sembra che in corso di terapia con CPI, si venga a creare una condizione di disbiosi che, come abbiamo precedentemente visto, generalmente si associa o meglio può favorire l'instaurarsi di una condizione patologica.



Kruskal-Wallis test
 ~ timep: p value = 0.8
 ~ pts: p value = **0.04**

Kruskal-Wallis test
 ~ timep: p value = 0.5
 ~ pts: p value = **0.003**

Figura 12. Alfa diversità dell'intero data set: riduzione della biodiversità dell'ecosistema in corso di trattamento.

L'analisi della diversità beta sull'intero dataset, effettuata sulla base della distanza tra i campioni, calcolata con la metrica filogenetica UniFrac Weighted (analisi quantitativa) ed Unweighted (analisi qualitativa), evidenzia una netta segregazione della struttura del microbiota intestinale in funzione del paziente (p value = 0.001, adonis) (Fig.13). Al contrario non è stata osservata una separazione significativa dei campioni in funzione dei time points (p > 0.8).

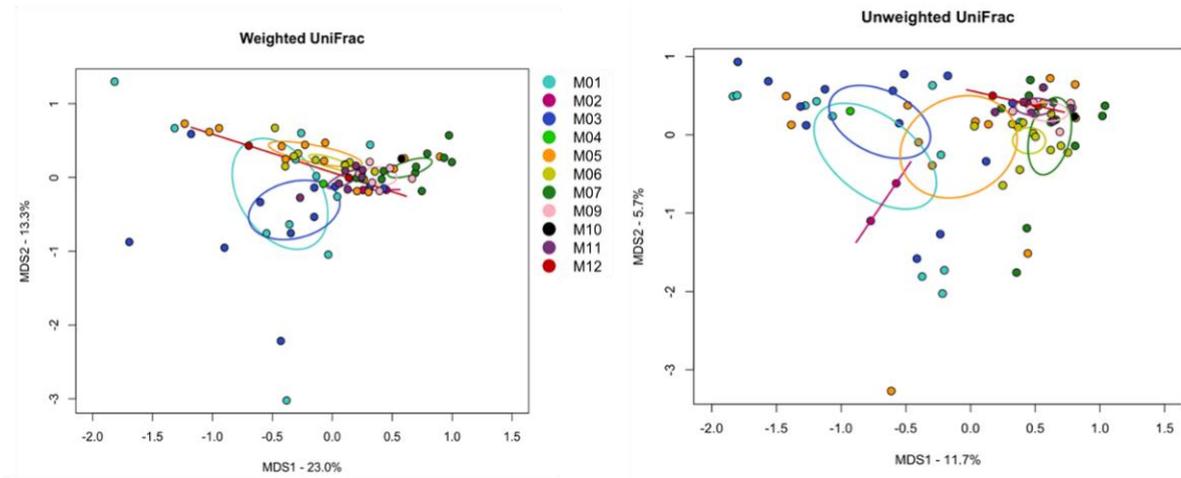


Figura 14. Diversità beta dell'intero data set: separazione significativa del microbiota in funzione del paziente.

Infine, è stata effettuata un'analisi dei campioni a livello tassonomico, allo scopo di rispondere al primo obiettivo dello studio. Partendo dall'analisi dei phyla, non sono state rilevate differenze significative nella composizione del microbiota dei vari pazienti, in corrispondenza dei diversi time points. Si osserva tuttavia un lieve incremento nell'abbondanza relativa di *Proteobacteria* ed una riduzione di *Actinobacteria*, in corrispondenza degli ultimi time points. Anche a livello di famiglia, non sono state rilevate differenze significative nella composizione del microbiota dei pazienti in corrispondenza dei diversi time points. Si osserva tuttavia un trend di incremento nell'abbondanza relativa di *Rickenellaceae* (p value = 0.06), oltre ad un aumento di *Staphylococcaceae* in corrispondenza degli ultimi time points. Infine, a livello di genere, non sono state rilevate differenze significative nella composizione del microbiota dei pazienti in corrispondenza dei diversi time points. Si osserva tuttavia un trend di incremento nell'abbondanza relativa di *Granulicatella* (p value = 0.09), oltre ad un aumento di *Staphylococcus* in corrispondenza degli ultimi time points. Si segnala, però che, nel corso del trattamento si osserva un parziale ripristino della condizione di disbiosi osservata al baseline. Infatti, anche se in assenza di significatività (p value > 0.1), nel corso del trattamento si nota una riduzione dell'abbondanza relativa di *Collinsella* ed un lieve aumento di *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Dorea* e *Ruminococcus*, produttori di SCFAs.

In conclusione, in questa prima analisi seppur parziale effettuata su 12 pazienti, abbiamo riscontrato una disbiosi nei campioni basali dei pazienti rispetto alla popolazione sana di controllo. In particolare, abbiamo evidenziato un incremento in termini di abbondanza

relativa di *Collinsella* (solitamente riscontrata in abbondanza nel microbiota di pazienti affetti da disordini metabolici e ad oggi non descritta in pazienti con sindromi linfoproliferative) e una riduzione di microrganismi “buoni” produttori di acidi grassi a catena corta (i.e. *Ruminoccus*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Dorea*, *Roseburia*). Inoltre, l’analisi del microbiota dell’intero dataset ha mostrato una importante variabilità individuale in termini di struttura e composizione del sistema microbico a cui si associa, già a partire dal II ciclo di trattamento con check-point inhibitors, una diminuzione statisticamente significativa della biodiversità, per ogni singolo paziente.

CAPITOLO 5. DISCUSSIONE

Da questa prima analisi, nonostante la eterogeneità della popolazione oltre che il piccolo numero, possiamo intanto affermare che tutti i pazienti, indipendentemente dall’età, dal sesso o dall’istologia, presentano un microbiota “alterato” rispetto alla popolazione sana di controllo. Sicuramente, le chemio-immunoterapie precedenti e la loro tossicità mucosale, così come le terapie antibiotiche piuttosto che l’utilizzo di gastroprotettori ha favorito l’instaurarsi di un quadro di disbiosi basale caratterizzato dall’aumento relativo di *Collinsella* (solitamente associato a disordini metabolici e non a patologia oncologica) a cui si associa una riduzione di organismi produttori di acidi grassi a catena corta, elementi indispensabili anche per un adeguato funzionamento e mantenimento del sistema immunitario, sia innato che adattativo. Il secondo aspetto che emerge è l’estrema variabilità individuale nella composizione e struttura del microbiota, sebbene in tutti i pazienti si osservi una riduzione della biodiversità in corso di trattamento, evento che concorre ad un peggioramento della disbiosi.

I prossimi passi di questo progetto saranno volti non solo a terminare l’arruolamento dei 20 pazienti stimati, caratterizzandone longitudinalmente il microbiota, ma anche di correlare i risultati trovati sia con aspetti clinici legati alla terapia (risposta e tossicità alla terapia) che fisiologici legati alla dieta (dati ricavati dai questionari consegnati al paziente ad ogni visita). Sarebbe inoltre interessante comparare il microbiota dei pazienti al termine del trattamento piuttosto che al follow-up con controlli sani, per confermarne o meno la ridotta biodiversità.

BIBLIOGRAFIA

1. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* (1992) doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
2. Agata, Y. *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* (1996) doi:10.1093/intimm/8.5.765.
3. Topalian, S. L. *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* (2012) doi:10.1056/nejmoa1200690.
4. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J. Immunol.* (2004) doi:10.4049/jimmunol.173.2.945.
5. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* (2000) doi:10.1084/jem.192.7.1027.
6. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* (2001) doi:10.1038/85330.
7. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology* (2008) doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
8. Yamazaki, T. *et al.* Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J. Immunol.* (2002) doi:10.4049/jimmunol.169.10.5538.
9. Keir, M. E. *et al.* Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* (2006) doi:10.1084/jem.20051776.
10. Liang, S. C. *et al.* Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J. Immunol.* (2003) doi:10.1002/eji.200324228.
11. Nishimura, H. *et al.* Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int. Immunol.* (1996) doi:10.1093/intimm/8.5.773.
12. Matsumura Y, Omiya R, P. J. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and a miantenance of pheripheral T-cell tolerance. *Blood* 116, 1291–1298 (2010).

13. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* (1999) doi:10.1016/S1074-7613(00)80089-8.
14. Nishimura, H. *et al.* Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* (80-.). (2001) doi:10.1126/science.291.5502.319.
15. Wang, J. *et al.* Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) doi:10.1073/pnas.0505497102.
16. Wang, J. *et al.* PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *Int. Immunol.* (2010) doi:10.1093/intimm/dxq026.
17. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T. & Honjo, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2001) doi:10.1073/pnas.231486598.
18. Pesce, S. *et al.* Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2017) doi:10.1016/j.jaci.2016.04.025.
19. Oldenhove, G. *et al.* PD-1 Is Involved in the Dysregulation of Type 2 Innate Lymphoid Cells in a Murine Model of Obesity. *Cell Rep.* (2018) doi:10.1016/j.celrep.2018.10.091.
20. Moral, J. A. *et al.* ILC2s amplify PD-1 blockade by activating tissue-specific cancer immunity. *Nature* (2020) doi:10.1038/s41586-020-2015-4.
21. Kinter, A. L. *et al.* The Common γ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. *J. Immunol.* (2008) doi:10.4049/jimmunol.181.10.6738.
22. Chinai, J. M. *et al.* New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends in Pharmacological Sciences* (2015) doi:10.1016/j.tips.2015.06.005.
23. Lee, S. J. *et al.* Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN- γ -induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett.* (2006) doi:10.1016/j.febslet.2005.12.093.
24. Meng, X. *et al.* FBXO38 mediates PD-1 ubiquitination and regulates anti-tumour immunity of T cells. *Nature* (2018) doi:10.1038/s41586-018-0756-0.
25. Okada, M. *et al.* Blockage of Core Fucosylation Reduces Cell-Surface Expression of PD-1 and Promotes Anti-tumor Immune Responses of T Cells. *Cell Rep.* (2017)

- doi:10.1016/j.celrep.2017.07.027.
26. Li, C. W. *et al.* Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat. Commun.* (2016) doi:10.1038/ncomms12632.
 27. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology* (2013) doi:10.1038/nri3405.
 28. Parry, R. V. *et al.* CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* (2005) doi:10.1128/mcb.25.21.9543-9553.2005.
 29. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* (2012) doi:10.1084/jem.20112741.
 30. Patsoukis, N. *et al.* Selective effects of PD-1 on Akt and ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci. Signal.* (2012) doi:10.1126/scisignal.2002796.
 31. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* (2009) doi:10.1084/jem.20090847.
 32. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* (2015) doi:10.1038/ncomms7692.
 33. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* (2015) doi:10.1016/j.ccell.2015.03.001.
 34. Lim, S. O. *et al.* Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell* (2016) doi:10.1016/j.ccell.2016.10.010.
 35. Li, C. W. *et al.* Eradication of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Targeting Glycosylated PD-L1. *Cancer Cell* (2018) doi:10.1016/j.ccell.2018.01.009.
 36. Burr, M. L. *et al.* CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-Tumour immunity. *Nature* (2017) doi:10.1038/nature23643.
 37. Mezzadra, R. *et al.* Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators. *Nature* (2017) doi:10.1038/nature23669.
 38. Takeuchi, M. *et al.* Soluble PD-L1 with PD-1-binding capacity exists in the plasma of patients with non-small cell lung cancer. *Immunol. Lett.* (2018) doi:10.1016/j.imlet.2018.01.007.

39. Kruger, S. *et al.* Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology* (2017) doi:10.1080/2162402X.2017.1310358.
40. Okuma, Y. *et al.* High plasma levels of soluble programmed cell death ligand 1 are prognostic for reduced survival in advanced lung cancer. *Lung Cancer* (2017) doi:10.1016/j.lungcan.2016.11.023.
41. Zhao, Y. *et al.* Antigen-Presenting Cell-Intrinsic PD-1 Neutralizes PD-L1 in cis to Attenuate PD-1 Signaling in T Cells. *Cell Rep.* (2018) doi:10.1016/j.celrep.2018.06.054.
42. Kleffel, S. *et al.* Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell* (2015) doi:10.1016/j.cell.2015.08.052.
43. Chaudhri, A. *et al.* PD-L1 Binds to B7-1 only in cis on the same cell surface. *Cancer Immunol. Res.* (2018) doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0316.
44. Sugiura, D. *et al.* Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science* (80-.). (2019) doi:10.1126/science.aav7062.
45. Amriah Buang. WHO Classification 2016. *Blood* (2016).
46. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. in *CRC Desk Reference for Hematology* (2007). doi:10.1201/9781420005127.ax1.
47. Armitage, J. O. & Weisenburger, D. D. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: Clinical features of the major histologic subtypes. *J. Clin. Oncol.* (1998) doi:10.1200/JCO.1998.16.8.2780.
48. Bishop, P. C. *et al.* CNS involvement in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* (1999) doi:10.1200/jco.1999.17.8.2479.
49. Hofmann, W. J., Momburg, F. & Möller, P. Thymic medullary cells expressing B lymphocyte antigens. *Hum. Pathol.* (1988) doi:10.1016/S0046-8177(88)80282-X.
50. Isaacson, P. G., Norton, A. J. & Addis, B. J. THE HUMAN THYMUS CONTAINS A NOVEL POPULATION OF B LYMPHOCYTES. *Lancet* (1987) doi:10.1016/S0140-6736(87)92622-5.
51. Pileri, S. A. *et al.* Primary mediastinal B-cell lymphoma: High frequency of BCL-6 mutations and consistent expression of the transcription factors OCT-2, BOB.1, and PU.1 in the absence of immunoglobulins. *Am. J. Pathol.* (2003) doi:10.1016/S0002-9440(10)63815-1.
52. Kanavaros, P. *et al.* Discordant expression of immunoglobulin and its associated

- molecule mb- 1/CD79a is frequently found in mediastinal large B cell lymphomas. *Am. J. Pathol.* (1995).
53. Loddenkemper, C. *et al.* Differential E μ enhancer activity and expression of BOB.I/OBF.I, Oct2, PU.I, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J. Pathol.* (2004) doi:10.1002/path.1485.
 54. Higgins, J. P. & Warnke, R. A. CD30 expression is common in mediastinal large B-cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* (1999) doi:10.1093/ajcp/112.2.241.
 55. Möller, P., Herrmann, B., Moldenhauer, G. & Momburg, F. Defective expression of MHC class I antigens is frequent in B-cell lymphomas of high-grade malignancy. *Int. J. Cancer* (1987) doi:10.1002/ijc.2910400107.
 56. Savage, K. J. *et al.* The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* (2003) doi:10.1182/blood-2003-06-1841.
 57. Feuerhake, F. *et al.* NF κ B activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* (2005) doi:10.1182/blood-2004-12-4901.
 58. Green, M. R. *et al.* Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* (2010) doi:10.1182/blood-2010-05-282780.
 59. Steidl, C. *et al.* MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* (2011) doi:10.1038/nature09754.
 60. Rosenwald, A. *et al.* Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med.* (2003) doi:10.1084/jem.20031074.
 61. Rui, L. *et al.* Cooperative Epigenetic Modulation by Cancer Amplicon Genes. *Cancer Cell* (2010) doi:10.1016/j.ccr.2010.11.013.
 62. Dawson, M. A. *et al.* JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 α from chromatin. *Nature* (2009) doi:10.1038/nature08448.
 63. Melzner, I. *et al.* Biallelic mutation SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood* (2005) doi:10.1182/blood-2004-09-3701.
 64. Guiter, C. *et al.* Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell

- lymphoma. *Blood* (2004) doi:10.1182/blood-2003-10-3545.
65. Farinha, P. *et al.* HLA-DR Protein Expression Correlates with Non-Neoplastic T-Cell Infiltration and Predicts Survival in Patients with Primary Mediastinal Large B Cell Lymphoma (PMBCL) Treated with CHOP Chemotherapy. *Blood* (2009) doi:10.1182/blood.v114.22.133.133.
 66. Roberts, R. A. *et al.* Loss of major histocompatibility class II gene and protein expression in primary mediastinal large B-cell lymphoma is highly coordinated and related to poor patient survival. *Blood* (2006) doi:10.1182/blood-2005-11-4742.
 67. Green, M. R., Yoon, H. & Boss, J. M. Epigenetic Regulation during B Cell Differentiation Controls CIITA Promoter Accessibility. *J. Immunol.* (2006) doi:10.4049/jimmunol.177.6.3865.
 68. Twa, D. D. W. *et al.* Genomic rearrangements involving programmed death ligands are recurrent in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* (2014) doi:10.1182/blood-2013-10-535443.
 69. Küppers, R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nature Reviews Cancer* (2009) doi:10.1038/nrc2542.
 70. Diepstra, A. *et al.* Association with HLA class I in Epstein-Barr-virus-positive and with HLA class III in Epstein-Barr-virus-negative Hodgkin's lymphoma. *Lancet* (2005) doi:10.1016/S0140-6736(05)66780-3.
 71. Kapatai, G. & Murray, P. Contribution of the Epstein-Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Pathology* (2007) doi:10.1136/jcp.2007.050146.
 72. Liau, N. P. D. *et al.* The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat. Commun.* (2018) doi:10.1038/s41467-018-04013-1.
 73. Aldinucci, D., Gloghini, A., Pinto, A., De Filippi, R. & Carbone, A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *Journal of Pathology* (2010) doi:10.1002/path.2711.
 74. Schmitz, R., Stanelle, J., Hansmann, M. L. & Küppers, R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (2009) doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092209.
 75. Ohshima, K. *et al.* Infiltration of Th1 and Th2 lymphocytes around Hodgkin and Reed-Sternberg (H&RS) cells in Hodgkin disease: Relation with expression of CXC and CC chemokines on H&RS cells. *Int. J. Cancer* (2002)

- doi:10.1002/ijc.10218.
76. Santoro, A. *et al.* Ifosfamide, gemcitabine, and vinorelbine: A new induction regimen for refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* (2007) doi:10.3324/haematol.10661.
 77. Nikolaenko, L., Chen, R. & Herrera, A. F. Current strategies for salvage treatment for relapsed classical Hodgkin lymphoma. *Ther. Adv. Hematol.* (2017) doi:10.1177/2040620717728000.
 78. Zinzani, P. L. *et al.* Ifosfamide, epirubicin and etoposide (IEV) regimen as salvage and mobilizing therapy for relapsed/refractory lymphoma patients. *Haematologica* (2002).
 79. Moskowitz, C. H. *et al.* Normalization of pre-ASCT, FDG-PET imaging with second-line, non-cross-resistant, chemotherapy programs improves event-free survival in patients with Hodgkin lymphoma. *Blood* (2012) doi:10.1182/blood-2011-10-388058.
 80. Ribas, A. *et al.* Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J. Clin. Oncol.* (2005) doi:10.1200/JCO.2005.01.109.
 81. Hirano, F. *et al.* Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* (2005).
 82. Brahmer, J. R. *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol.* (2010) doi:10.1200/JCO.2009.26.7609.
 83. Ansell, S. M. *et al.* PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* (2015) doi:10.1056/nejmoa1411087.
 84. Younes, A. *et al.* Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol.* (2016) doi:10.1016/S1470-2045(16)30167-X.
 85. Armand, P. *et al.* Nivolumab for relapsed/refractory classic hodgkin lymphoma after failure of autologous hematopoietic cell transplantation: Extended follow-up of the multicohort single-arm phase II checkmate 205 trial. *J. Clin. Oncol.* (2018) doi:10.1200/JCO.2017.76.0793.
 86. Zinzani, P. L. *et al.* Nivolumab combined with brentuximab vedotin for

- relapsed/refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma: Efficacy and safety from the phase II checkmate 436 study. *J. Clin. Oncol.* (2019) doi:10.1200/JCO.19.01492.
87. Hamid, O. *et al.* Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti–PD-1) in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* (2013) doi:10.1056/nejmoa1305133.
 88. Armand, P. *et al.* Programmed death-1 blockade with pembrolizumab in patients with classical hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure. in *Journal of Clinical Oncology* (2016). doi:10.1200/JCO.2016.67.3467.
 89. Chen, R. *et al.* Phase II study of the efficacy and safety of pembrolizumab for relapsed/refractory classic Hodgkin Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* (2017) doi:10.1200/JCO.2016.72.1316.
 90. Armand, P. *et al.* Pembrolizumab in relapsed or refractory primary mediastinal large b-cell lymphoma. in *Journal of Clinical Oncology* (2019). doi:10.1200/JCO.19.01389.
 91. Cho, I. & Blaser, M. J. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* (2012) doi:10.1038/nrg3182.
 92. Susan V. Lynch, O. P. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 375, 2369–79 (2016).
 93. Turnbaugh, P. J. *et al.* The Human Microbiome Project. *Nature* 449, 804–810 (2007).
 94. Walter, J. & Ley, R. The human gut microbiome: Ecology and recent evolutionary changes. *Annual Review of Microbiology* (2011) doi:10.1146/annurev-micro-090110-102830.
 95. Siegfried Schloissnig, Manimozhiyan Arumugam, Shinichi Sunagawa, Makedonka Mitreva, Julien Tap, Ana Zhu, Alison Waller, Daniel R. Mende, Jens Roat Kultima, John Martin, Karthik Kota, Shamil R. Sunyaev, G. M. W. & P. B. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. 45–50 (2013).
 96. Buddington, R. K. & Sangild, P. T. Companion animals symposium: Development of the mammalian gastrointestinal tract, the resident microbiota, and the role of diet in early life. *Journal of Animal Science* (2011) doi:10.2527/jas.2010-3705.
 97. Benson, A. K. *et al.* Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2010) doi:10.1073/pnas.1007028107.
 98. Goodrich, J. K. *et al.* Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789–

- 799 (2014).
99. Candela, M., Biagi, E., Maccaferri, S., Turrone, S. & Brigidi, P. Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends Microbiol.* 20, 385–391 (2012).
 100. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome The Human Microbiome Project Consortium*. *Nature* (2012).
 101. Rothschild, D. *et al.* Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* (2018) doi:10.1038/nature25973.
 102. Singh, R. K. *et al.* Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine* (2017) doi:10.1186/s12967-017-1175-y.
 103. Holling, C. S. Resilience and stability of ecological systems. in *The Future of Nature: Documents of Global Change* (2013). doi:10.1146/annurev.es.04.110173.000245.
 104. Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L. & Gordon, J. I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* (2011) doi:10.1038/nature10213.
 105. Mcdermott, A. J. & Huffnagle, G. B. The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* (2014) doi:10.1111/imm.12231.
 106. Topping, D. L. & Clifton, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews* (2001) doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1031.
 107. Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N. & Núñez, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology* (2013) doi:10.1038/ni.2608.
 108. Cox, L. M. *et al.* Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* (2014) doi:10.1016/j.cell.2014.05.052.
 109. Belkaid, Y. & Hand, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* (2014) doi:10.1016/j.cell.2014.03.011.
 110. Kaoutari, A. El, Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D. & Henrissat, B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 497–504 (2013).

111. Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* 165, 1332–1345 (2016).
112. Turrone, Silvia, Brigidi Patrizia, Cavalli Andrea, C. M. Microbiota Host Transgenomic Metabolism, Bioactive Molecules from the Inside.pdf. *J. Med. Chem.* 61, 47–61 (2018).
113. Mager, L. F. *et al.* Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science* (80-.). 369, 1481–1489 (2020).
114. Routy, B. *et al.* Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* (80-.). 359, 91–97 (2018).
115. Nomura, M. *et al.* Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With Clinical Response to Treatment With Nivolumab or Pembrolizumab in Patients With Solid Cancer Tumors. *JAMA Netw. open* 3, e202895 (2020).
116. Gopalakrishnan, V., Helmink, B. A., Spencer, C. N., Reuben, A. & Wargo, J. A. The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell* 33, 570–580 (2018).
117. Johansson, M. E. V. *et al.* Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell Host Microbe* 18, 582–592 (2015).
118. Spiljar, M., Merkler, D. & Trajkovski, M. The immune system bridges the gut microbiota with systemic energy homeostasis: Focus on TLRs, mucosal barrier, and SCFAs. *Front. Immunol.* 8, 1–10 (2017).
119. Rooks, M. G. & Garrett, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology* (2016) doi:10.1038/nri.2016.42.
120. Weaver, C. T., Elson, C. O., Fouser, L. A. & Kolls, J. K. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (2013) doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130318.
121. Abt, M. C. *et al.* Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity* 37, 158–170 (2012).
122. Roy, S. & Trinchieri, G. Microbiota: A key orchestrator of cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 271–285 (2017).
123. Spanogiannopoulos, P., Bess, E. N., Carmody, R. N. & Turnbaugh, P. J. The microbial pharmacists within us: A metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 273–287 (2016).

124. Wallace, B. D. *et al.* Structure and Inhibition of Microbiome β -Glucuronidases Essential to the Alleviation of Cancer Drug Toxicity. *Chem. Biol.* (2015) doi:10.1016/j.chembiol.2015.08.005.
125. Björkholm, B. *et al.* Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver. *PLoS One* (2009) doi:10.1371/journal.pone.0006958.
126. Vétizou, M. *et al.* Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* (80-.). 350, 1079–1084 (2015).
127. Sivan, A. *et al.* Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* (80-.). 350, 1084–1089 (2015).
128. Gopalakrishnan, V. *et al.* Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* (80-.). (2018) doi:10.1126/science.aan4236.
129. Matson, V. *et al.* The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* (80-.). (2018) doi:10.1126/science.aao3290.
130. Dubin, K. *et al.* Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat. Commun.* (2016) doi:10.1038/ncomms10391.
131. Chaput, N. *et al.* Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann. Oncol.* (2017) doi:10.1093/annonc/mdx108.
132. Cheson, B. D. *et al.* Revised response criteria for malignant lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* (2007) doi:10.1200/JCO.2006.09.2403.
133. Cheson, B. D. *et al.* Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of hodgkin and non-hodgkin lymphoma: The lugano classification. *Journal of Clinical Oncology* (2014) doi:10.1200/JCO.2013.54.8800.
134. Cheson, B. D. *et al.* Refinement of the Lugano Classification lymphoma response criteria in the era of immunomodulatory therapy. *Blood* (2016) doi:10.1182/blood-2016-05-718528.
135. Biagi, E. *et al.* Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* (2010) doi:10.1371/journal.pone.0010667.
136. Caporaso, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624 (2012).

137. Candela, M. *et al.* Modulation of gut microbiota dysbioses in type 2 diabetic patients by macrobiotic Ma-Pi 2 diet. *Br. J. Nutr.* (2016) doi:10.1017/S0007114516001045.
138. Schnorr, S. L. *et al.* Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat. Commun.* 5, 1–12 (2014).
139. Rampelli, S. *et al.* Metagenome Sequencing of the Hadza Hunter-Gatherer Gut Microbiota. *Curr. Biol.* 25, 1682–1693 (2015).
140. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes—KEGG. *Yeast* (2000) doi:10.1002/(sici)1097-0061(200004)17:1<48::aid-yea2>3.0.co;2-h.
141. Liu, J. *et al.* Composition-based classification of short metagenomic sequences elucidates the landscapes of taxonomic and functional enrichment of microorganisms. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–10 (2013).

PUBBLICAZIONI ESEGUITE NEL CORSO DEL DOTTORATO

1. Casadei B, Argnani L, Morigi A, Lolli G, Broccoli A, Pellegrini C, Nanni L, Stefoni V, Coppola PE, Carella M, Cavo M, Zinzani PL. Treatment and outcomes of primary mediastinal B-cell lymphoma: a three-decades monocentric experience with 151 patients. *Ann Hematol.* 2020 Dec 10. doi: 10.1007/s00277-020-04364-0.
2. Morigi A, Casadei B, Argnani L, Stefoni V, Sergio E, Cavo M, Zinzani PL. Successful stem cell harvest and autologous transplantation in a patient with cold agglutinin syndrome and aggressive lymphoma *Leuk Lymphoma.* 2020 Dec 4;1-3. doi: 10.1080/10428194.2020.1855342.
3. Casadei B, Argnani L, Morigi A, Lolli G, Broccoli A, Pellegrini C, Nanni L, Stefoni V, Coppola PE, Carella M, Cavo M, Zinzani PL. Effectiveness of chemotherapy after anti-PD-1 blockade failure for relapsed and refractory Hodgkin lymphoma *Cancer Med.* 2020 Nov;9(21):7830-7836. doi: 10.1002/cam4.3262. Epub 2020 Sep 2.
4. Casadei B, Argnani L, Morigi A, Lolli G, Broccoli A, Pellegrini C, Nanni L, Stefoni V, Coppola PE, Carella M, Cavo M, Zinzani PL. Potential survival benefit for patients receiving autologous hematopoietic stem cell transplantation after checkpoint inhibitors for relapsed/refractory Hodgkin lymphoma: a real-life experience. *Hematol Oncol.* 2020 Sep 9. doi: 10.1002/hon.2803. *Online ahead of print.*
5. Casadei B, et al. Effectiveness of chemotherapy after anti-PD-1 blockade failure for relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Cancer Medicine, in press.* DOI:10.1002/cam4.3262
6. Pileri, A., Guglielmo, A., Patrizi, A., Casadei, B., Bertuzzi, C., Zinzani, P. L., Agostinelli, C. Erythroderma with brentuximab vedotin (skin side effects in mycosis fungoides). *J Dtsch Dermatol Ges.* 2020 Jul 27. doi: 10.1111/ddg.14197.
7. Lolli G, Casadei B, Argnani L, Nanni L, Cavo M, Zinzani P.L. Impressive Continuous Complete Response after Mogamulizumab in a Heavily Pretreated Sézary Syndrome Patient. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2020 Jul 1;12(1): e2020040. doi: 10.4084/MJHID.2020.040.
8. Gentilini, M., Casadei, B., Broccoli, A., Argnani, L., Cavo, M., & Zinzani, P. L. (2020). Elderly Non-GCB Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patient Responding to Lenalidomide after Epicardial Relapse: A Case Report. *Acta Haematologica, 1–4.* Jul 2020, doi:10.1159/000505716
9. Scotto L, Khinhan C, Casadei B, Mangone M, Douglass E, Murty V, Marchi E, Ma H, George C, Montanari F, Califano A, O'Connor O.A. Generation of pralatrexate resistant

- T-cell lymphoma lines reveals two patterns of acquired drug resistance that is overcome with epigenetic modifiers. *Genes Chromosomes Cancer*. 2020 Jul 2. doi: 10.1002/gcc.22884
10. Morigi, A., Argnani, L., Lolli, G., Broccoli, A., Pellegrini, C., Nanni, L., Casadei B, Zinzani, P. L. Bendamustine-rituximab regimen in untreated indolent marginal zone lymphoma: experience on 65 patients. *Hematol Oncol*. 2020 Jun 28. doi: 10.1002/hon.2773.
 11. Marangon M, Casadei B, Broccoli A, Argnani L, Cavo M, Zinzani PL. Management of central nervous system relapse in a young patient affected by primary mediastinal B-cell lymphoma: A case report. *Clinical case report*, Apr 2020; doi: 10.1002/cc3.2706
 12. Lolli G, Argnani L, Broccoli A, Marangon M, Pellegrini C, Morigi A, Casadei B, Nanni L, Stefoni V, Carella M, Cavo M, Zinzani PL. Y-ibritumomab tiuxetan in patients with extra-nodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) —The Zeno Study. *BR J Hematol*, 2020 Jan; doi: 10.1111/bjh.16404.
 13. Casadei B, Broccoli A, Stefoni V, Pellegrini C, Marangon M, Morigi A, Nanni L, Lolli G, Carella M, Argnani L, Cavo M, Zinzani PL. PD-1 blockade as bridge to allogeneic stem cell transplantation in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma patients: a retrospective single center case series. *Haematologica*. 2019 Nov;104(11): e521-e522. doi: 10.3324/haematol.2019.215962.
 14. Broccoli A, Forti Parri SN, Pellegrini C, Casadei B, Bonfanti B, Bertolaccini L, Agostinelli C, Boaron M, Fanti S, Nanni C, Argnani L, Zinzani PL. Histological findings in patients with suspected mediastinal lymphoma relapse according to positive positron emission tomography scan during follow-up: a large retrospective analysis in 96 patients. *Leuk Lymphoma*. 2019 Sep;60(9):2247-2254. doi: 10.1080/10428194.2019.1581931.
 15. Broccoli A, Casadei B, Chiappella A, Visco C, Tani M, Cascavilla N, Conconi A, Balzarotti M, Cox MC, Marino D, Goldaniga MC, Marasca R, Tecchio C, Patti C, Musuraca G, Devizzi L, Monaco F, Romano A, Fama A, Zancanella M, Paolini R, Rigacci L, Castellino C, Gaudio F, Argnani L, Zinzani PL. Lenalidomide in Pretreated Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: An Italian Observational Multicenter Retrospective Study in Daily Clinical Practice. *Oncologist*. 2019 Sep;24(9):1246-1252. doi: 10.1634/theoncologist.2018-0603. Epub 2019 Apr.
 16. Morigi A, Casadei B, Argnani L, Cavo M, Zinzani PL. Spontaneous remission of follicular lymphoma. *Hematol Oncol*. 2019 Dec. 37(5):626-627. doi: 10.1002/hon.2653.
 17. Nanni L, Morigi A, Casadei B, Broccoli A, Stefoni V, Argnani L, Cavo M, Zinzani PL. A case report of the long treatment experience of a Sézary syndrome responder patient:

- 16 years through all the systemic and innovative therapies. *Hematol Oncol* 2019 Jan 13. Doi: 10.1002/hon.257.
18. Pileri A, Starace M, Alessandrini A, Casadei B, Zinzani PL, Piraccini BM. New therapies and old side effects in mycosis fungoides treatment: brentuximab vedotin-induced alopecia. *BR J Dermatol*. 2018 Dec 18. Doi:10.1111/bjd. 17533.
 19. Ciavarella S, Vegliante MC, Fabbri M, De Summa S, Melle F, Motta G, De Iulii V, Opinto G, Enjuanes A, Rega S, Gulino A, Agostinelli C, Scattone A, Tommasi S, Mangia A, Mele F, Simone G, Zito AF, Ingravallo G, Vitolo U, Chiappella A, Tarella C, Gianni AM, Rambaldi A, Zinzani PL, Casadei B, Derenzini E, Loseto G, Pileri A, Tabanelli V, Fiori S, Rivas-Delgado A, López-Guillermo A, Venesio T, Sapino A, Campo E, Tripodo C, Guarini A, Pileri SA. Dissection of DLBCL Microenvironment Provides Gene Expression-Based Predictor of survival applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Ann Oncol*. 2018 Oct 11. doi: 10.1093/annonc/mdy450.
 20. Pellegrini C, Casadei C, Cellini C, Argnani L, Cavo M, Zinzani PL. Sequential Double Bridging to Transplant with Diversified Anti- PD1 Monoclonal Antibodies Retreatment in Relapsed Hodgkin Lymphoma: A Case Report. *Case Report J Cancer Sci Ther/Vol.10.6 149(2018) DOI: 10.4172/1948-5956.1000534*.
 21. Marangon M, Tonialini L, Morigi A, Stefoni V, Broccoli A, Pellegrini C, Casadei B, Argnani L, Cavo M, Zinzani PL. The Berlin-Frankfurt-Munster protocol for the upfront treatment of aggressive lymphomas: The Bologna experience. *Am J Hematol*. 2018 Jun 8, doi:10.1002/ajh.25152.
 22. Broccoli A, Casadei B, Morigi A, Sottotetti F et al; Italian real life experience with ibrutinib: results of a large observational study on 77 relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Oncotarget*. 2018; 9(34):23443-23450.
 23. Casadei B, Pellegrini C, Tonialini L, Argnani L, Zinzani PL. Interesting activity of pegylated liposomal doxorubicin in primary refractory and multirelapsed Hodgkin lymphoma patients: bridge to transplant. *Hematol Oncol*. 2018 Jan 24. doi: 10.1002/hon.2492.
 24. Malaspina F, Pellegrini C, Casadei B, Argnani L, Zinzani PL. Impressive Response to Pixantrone after Allogenic Transplant in a Multiple Relapsed Diffuse Large B cell Lymphoma. *Acta Haematol*. 2017 Apr 21;137(4):191-194. doi: 10.1159/000465511
 25. Broccoli A, Casadei B, Stefoni V, Pellegrini C, Quirini F, Tonialini L, Morigi A, Marangon M, Argnani L, Zinzani PL. The treatment of primary mediastinal large B-cell lymphoma: a two decades monocentric experience with 98 patients. *BMC Cancer*. 2017 Apr 17;17(1):276. doi: 10.1186/s12885-017-3269-6.

ABSTRACT PRESENTATI A SEMINARI/CONGRESSI NELL'ULTIMO ANNO DI
DOTTORATO

1. The treatment of hairy cell leukemia with a focus on long lasting responders to cladribine: a thirty year experience from the institute of Hematology of Bologna. A. Broccoli, C. Terragna, V. Stefoni, C. Pellegrini, B. Casadei, M. Marangon, A. Morigi, L. Nanni, G. Lolli, M. Carella, L. Argnani, M. Cavo, PL Zinzani. ASH 61th Annual Meeting & Exposition Orlando – Paper No 4005 (poster presentation)
2. Safety and efficacy of Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplant after Programmed Cell Death 1 (PD-1)/ Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) blockade for classical Hodgkin lymphoma: Analysis of a large international Cohort. R.W. Merryman, C.C. Stella, L. Castagna, P. L. Zinzani, P. Armand, P. Corradini, A. Guidetti, B. Casadei, M. Monty et al. ASH 61th Annual Meeting & Exposition Orlando – paper N 0775 (oral presentation)
3. Treatment Of Relapsed/Refractory Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma Patients With Check- Point Inhibitors: The Experience Of Istituto Seragnoli. B. Casadei, C. Pellegrini, V. Stefoni, G. Lolli, M. Carella, A. Broccoli, L. Nanni, M. Marangon, A. Morigi, N. Fabbri, G. Gabrielli, L. Argnani, M. Cavo, P.L. Zinzani. 47° Meeting of the Italian Society of Hematology, 7-9 ottobre 2019, Rome, Italy (oral presentation).
4. Bendamustine And Rituximab As Treatment For Patients With Marginal Zone Non Hodgkin Lymphoma: A Real Life Experience. V. Stefoni, B. Casadei, C. Pellegrini, G. Lolli, M. Carella, A. Broccoli, L. Nanni, M. Marangon, A. Morigi, N. Fabbri, G. Gabrielli, L. Argnani, M. Cavo, P.L. Zinzani. 47° Meeting of the Italian Society of Hematology, 7-9 ottobre 2019, Rome, Italy (oral presentation).
5. Effectiveness Of Chemotherapy After Anti-Pd-1 Blockade Failure For Relapsed And Refractory Hodgkin Lymphoma And Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma: A Retrospective Analysis. G. Lolli, B. Casadei, C. Pellegrini, V. Stefoni, M. Carella, A. Broccoli, L. Nanni, M. Marangon, A. Morigi, N. Fabbri, G. Gabrielli, L. Argnani, M. Cavo, P.L. Zinzani. 47° Meeting of the Italian Society of Hematology, 7-9 ottobre 2019, Rome, Italy (poster presentation).