

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



## **Dottorato in Immunologia Clinica e Sperimentale ciclo XXXII**

**Coordinatore del corso:** Prof.ssa Maria Cristina Mingari

### **Tesi di dottorato**

*Analisi fenotipica e funzionale dell'infiltrato linfocitario in biopsie di metastasi di melanoma, in pazienti in terapia con farmaci a bersaglio molecolare e/o inibitori dei checkpoint immunologici.*

**Candidato:** Dott. Francesco Spagnolo

**Tutors:** Prof.ssa Gabriella Pietra, Prof.ssa Paola Queirolo

# INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Epidemiologia	3
1.2 Fattori di rischio	5
1.3 Background genetico e patogenesi molecolare	7
1.4 Patogenesi clinica	9
1.5 Caratteristiche cliniche e diagnosi	11
1.6 Stadiazione e fattori prognostici	13
1.7 Terapia medica: farmaci a bersaglio molecolare	14
1.8 Terapia medica: immunoterapia	18
1.9 Effetti biologici dell'immunoterapia	21
2. OBIETTIVI	25
3. MATERIALI E METODI	26
3.1 Reclutamento dei pazienti	26
3.2 Biopsie tumorali	26
3.3.1 Prelievi di sangue periferico	29
3.3.2 Estrazione di DNA e amplificazione mediante PCR.	29
3.3.3 Tipizzazione delle varianti geniche SNV di PD-1 e PD-L1	30
4. RISULTATI	32
4.1 Analisi dell'infiltrato linfocitario	32
4.1.1 Analisi dell'infiltrato linfocitario presente nelle biopsie tumorali	32
4.1.2 Il differente livello di espressione del recettore PD-1 sui linfociti T CD8+ infiltranti le biopsie (CD8 <sup>+</sup> TILs) identifica diverse sottopopolazioni caratterizzate da un differente profilo fenotipico	35
4.1.3 Correlazione tra il livello di espressione di PD-1 nell'infiltrato linfocitario e le capacità effettrici dei linfociti CD8+	40
4.2 Analisi delle varianti geniche a singolo nucleotide di PD-1 e PD-L1	41
4.3 Analisi dei dati clinici	45
5. DISCUSSIONE	47
5.1 Analisi dell'infiltrato linfocitario	47
5.2 Analisi delle varianti geniche a singolo nucleotide di PD-1 e PD-L1	49
BIBLIOGRAFIA	51

# 1. INTRODUZIONE

Fino a pochi anni fa considerata una tra le forme tumorali più aggressive, per la quale le chemioterapie disponibili non fornivano che un minimo beneficio, il melanoma è oggi una patologia con una storia nuova, per la quale esistono farmaci dal meccanismo d'azione complesso ma estremamente efficaci, tanto da relegare la chemioterapia a un ruolo secondario.

Il melanoma in fase avanzata (non resecabile o metastatico) vanta infatti, ad oggi, una delle gestioni cliniche più moderne sul panorama oncologico, con l'introduzione di farmaci a bersaglio molecolare, ma soprattutto degli inibitori dei checkpoint immunologici, ICI.

## 1.1 Epidemiologia

Nel 2018 in Italia sono stati registrati circa 13.000 nuovi casi di melanoma<sup>1</sup>.

Un tempo definito come una neoplasia rara, questo tumore si è totalmente svincolato da questa definizione, con un trend di incidenza in continuo e rapido aumento, sia negli uomini (+ 3,4% per anno) che nelle donne (+2,0% per anno). Caratteristicamente, presenta inoltre un picco fra le popolazioni a fenotipo più chiaro e tra i pazienti più giovani.

Dati IARC – International Agency for Research on Cancer, WHO (<https://gco.iarc.fr/>) – riportano infatti, con riferimento all'Italia, valori di incidenza tali da collocare la diagnosi di melanoma cutaneo (escludendo quindi il melanoma uveale e il melanoma delle mucose) al 9° posto tra tutti i tumori solidi (8° posto tra gli uomini e 7° posto tra le donne), preceduto dal tumore della mammella, del colon-retto, della prostata, del polmone, della vescica, del pancreas, dello stomaco e del fegato (**Figura A**). Considerando la popolazione generale, senza differenziare per sesso o per età, il tasso di incidenza registrato nel 2018 è stato di 20.7 casi ogni 100.000 abitanti (**Tabella 1**).

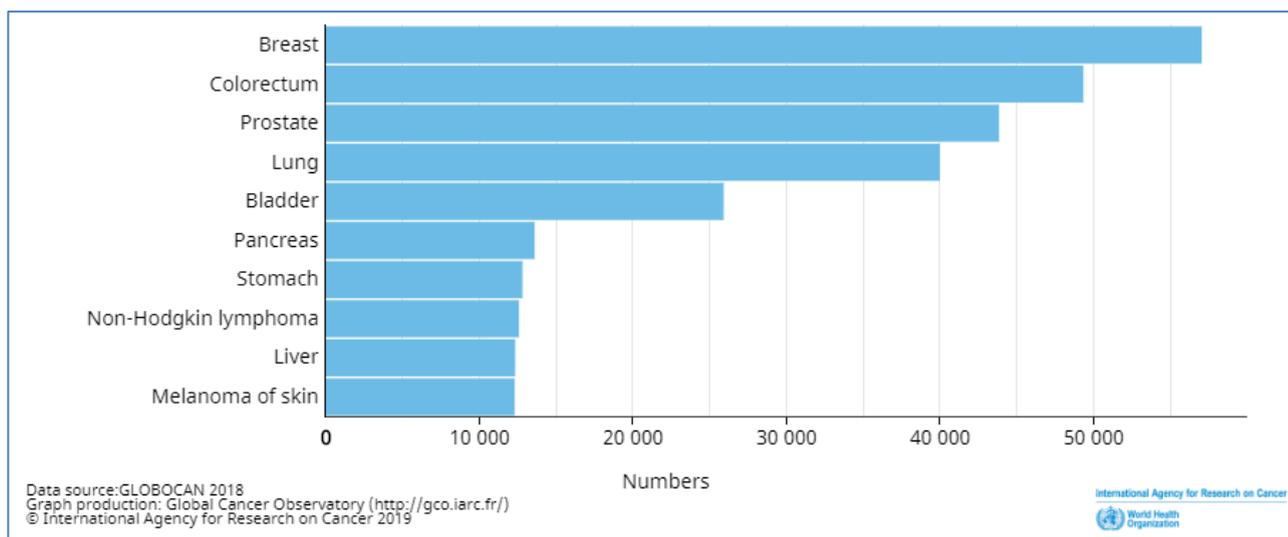
<b>Incidence 0 – 85+ y</b>	<b>Number</b>	<b>Crude rate / 100 000</b>	<b>ASR / 100 000</b>
<b>Both sex (9°)</b>	12 299	20.7	12.4
<b>Male (8°)</b>	6 934	24.0	14.0
<b>Female (7°)</b>	5 365	17.7	11.0

**Tabella 1.** Incidenza del melanoma in Italia (dati relativi al 2018)

Tassi decisamente più alti vengono raggiunti se analizziamo una popolazione più giovane: considerando infatti la fascia d'età compresa tra 0 e 45 anni, il melanoma si colloca come 3° tumore, preceduto esclusivamente dal tumore della mammella e della tiroide (2° posto tra i giovani uomini, dove è preceduto solo dal tumore del testicolo) (**Tabella 2**).

<b>Incidence &lt; 45 y</b>	<b>Number</b>	<b>Crude rate / 100 000</b>	<b>ASR / 100 000</b>
<b>Both sex (3°)</b>	2 630	9.5	6.7
<b>Male (2°)</b>	1 319	9.4	6.5
<b>Female (3°)</b>	1 311	9.7	6.9

**Tabella 2.** Incidenza del melanoma in Italia nei soggetti con meno di 45 anni di età (dati relativi al 2018)



**Figura A.** Numero stimato delle nuove diagnosi in Itali, in entrambi i sessi, considerando tutte le fasce d'età

Relativamente alla mortalità, il melanoma presenta dati stabili nel tempo, con un tasso standardizzato per età di 1.6 decessi ogni 100.000 abitanti. È causa di circa il 73% delle morti legate a tumori cutanei, nel mondo (**Tabella 3**)<sup>2</sup>.

<b>Mortality</b>	<b>Number</b>	<b>Crude rate / 100 000</b>	<b>ASR / 100 000</b>
<b>Both sex (13°)</b>	2 314	3.9	1.6
<b>Male (11°)</b>	1 448	5.0	2.1
<b>Female (11°)</b>	866	2.9	1.1

**Tabella 3.** Mortalità per melanoma in Italia (dati relativi al 2018)

I dati di prevalenza, infine, vedono circa 42.220 pazienti affetti, considerando una fascia di tempo di 5 anni, e 11.243 considerando esclusivamente il 2018 (**Tabella 4 e 5**).

<b>Prevalence 2018</b>	<b>Number</b>	<b>Proportion / 100 000</b>
<b>Both sex (6°)</b>	11 243	19.0
<b>Male (5°)</b>	6 303	21.8
<b>Female (6°)</b>	4 940	16.3

**Tabella 4.** Prevalenza del melanoma in Italia (dati relativi al 2018)

<b>Prevalence 5y</b>	<b>Number</b>	<b>Proportion / 100 000</b>
<b>Both sex (6°)</b>	42 220	71.2
<b>Male (5°)</b>	23 688	81.9
<b>Female (5°)</b>	18 532	61.0

**Tabella 5.** Prevalenza del melanoma in Italia in un periodo di 5 anni

Nonostante questi numeri, sicuramente più bassi rispetto ad altre neoplasie solide, il melanoma resta la principale causa di morte per tumori cutanei: solo una diagnosi precoce, con l'escissione di una malattia in fase iniziale, fornisce la garanzia di una prognosi favorevole.

## **1.2 Fattori di rischio**

I fattori di rischio per lo sviluppo del melanoma cutaneo possono essere distinti in modificabili e non modificabili. I primi sono essenzialmente due: l'esposizione ai raggi UV e l'uso di farmaci.

1. Esposizione ai raggi UV. Già nel 1992 l'esposizione ai raggi UV – esposizione solare, raggi delle saldature ad arco, lettini solari etc. – è stata dichiarata come cancerogena dalla IARC<sup>3</sup>. Relativamente all'esposizione solare, particolare importanza viene data all'esposizione solare intermittente, spesso accompagnata dalle scottature solari<sup>4</sup>. L'abbronzatura artificiale mediante l'uso di lettini solari, attività ancora molto diffusa tra gli adolescenti e i giovani adulti, ha un impatto estremamente significativo: anche un singolo utilizzo induce un aumento del rischio quantificato tra il 16 e il 20%<sup>5</sup>.

2. Farmaci. Alcuni farmaci sono stati associate allo sviluppo di melanoma, in particolare i cosiddetti PUVA, farmaci utilizzati per la cura della psoriasi, eczema e vitiligo<sup>6</sup>. Ancora, alcuni immunosoppressori come la ciclosporina e il temsirolimus sembrano essere associati a un maggiore rischio di sviluppare melanoma; tuttavia, appare difficile in questi casi attribuire il rischio al farmaco in sé o all'effetto immuno soppressivo esercitato.

Tra i fattori di rischio non modificabili annoveriamo invece:

1. Quadro dermatologico. I soggetti polinevici, ma soprattutto i soggetti con nevi displastici presentano un rischio maggiore (da 1.5 a 10 volte) di sviluppare melanomi nel corso della loro vita. Una stratificazione del rischio in questi soggetti si può elaborare in base al numero di nevi displastici<sup>7</sup>.
2. Etnia e fototipo. È stato osservato come soggetti caucasici presentino un rischio aumentato di sviluppare melanoma cutaneo. Particolarmente a rischio sono le popolazioni con fototipo chiaro (0 – capelli rossi, occhi verdi – e 1 – capelli biondi, occhi azzurri): queste popolazione infatti, presentano un rischio del 2.6%, circa 10 volte superiore rispetto ai soggetti di pelle scura come afroamericani (0.1%) e ispanici (0.58%)<sup>8</sup>. Al contrario, melanomi non cutanei (mucosali, uveali) sono più frequenti nella popolazione non caucasica<sup>9</sup>.
3. Età e genere. L'età media di insorgenza del melanoma cutaneo è di circa 57 anni, più bassa rispetto ad altri tumori solidi. Tuttavia, è possibile osservare cinetiche di incidenza differenti in funzione dei generi, con una maggiore incidenza tra le donne, nella popolazione al di sotto dei 50 anni, e una maggiore incidenza tra gli uomini se consideriamo la fascia d'età oltre i 75 anni<sup>9</sup>.
4. Immunosoppressione. I pazienti con un sistema immunitario defedato presentano un rischio aumentato di sviluppare tumori cutanei. Tra questi ricordiamo i pazienti trapiantati, con un aumento del rischio che va dalle 2 alle 4 volte rispetto alla popolazione generale<sup>10</sup>, e i pazienti affetti da HIV, ugualmente noti per avere un'incidenza aumentata di melanoma cutaneo<sup>11</sup>.
5. Predisposizione genetica e sindromi familiari. Si stima che circa il 10-15% dei melanomi sia familiare. In questo gruppo di tumori, le mutazioni genetiche più frequenti sono quelle a livello di CDKN2A e CDK4: in entrambi i casi, l'effetto netto è l'aumento della proliferazione melanocitaria svincolata dal controllo della

senescenza cellulare oncogene-indotta. Il gene CDKN2A è mutato in circa il 40% dei soggetti con melanoma familiare, condizione trasmessa a ereditarietà autosomica dominante. CDKN2A è un locus complesso che codifica per tre differenti oncosoppressori: p15/INK4b, p16/INK4a e p14/ARF. P16/INK4a è una proteina che fisiologicamente aumenta l'attività degli oncosoppressori della famiglia RB, implicati nell'inibizione dell'attività della chinasi ciclina-dipendente 4 (Cyclin-Dependent Kinase 4, CDK4) e della chinasi ciclina-dipendente 6 (Cyclin-Dependent Kinase 6, CDK6). La perdita di questa proteina è chiaramente implicata nello sviluppo del melanoma umano e talvolta è evidente anche nei melanomi sporadici, dove tale evento può avvenire attraverso meccanismi variabili<sup>12</sup>. P14/ARF è anch'essa una proteina che normalmente aumenta l'attività dell'oncosoppressore p53, un inibitore dell'attività dell'oncoproteina MDM2. La mutazione in CDK4 impedisce anch'essa l'inibizione da parte di p16/INK4a.

### **1.3 Background genetico e patogenesi molecolare**

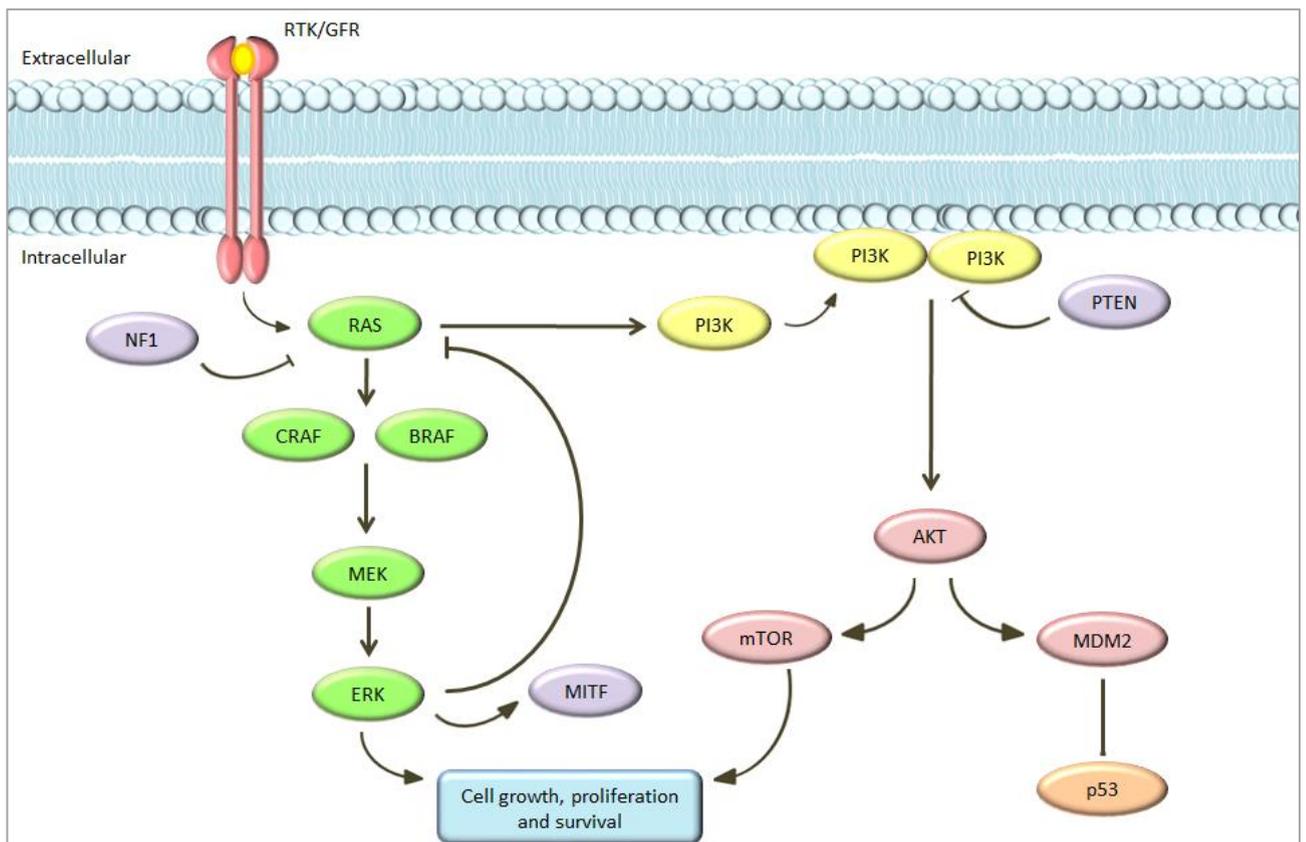
Mutazioni di BRAF sono presenti nel 50% - 70% dei melanomi sporadici, mentre mutazioni di RAS si verificano in un ulteriore 10-15%. Queste mutazioni colpiscono geni codificanti per proteine che giocano un ruolo chiave nella via di segnalazione intracellulare MAPK<sup>13</sup>.

La via MAPK, fisiologicamente, gioca un importantissimo ruolo nel controllo della proliferazione cellulare e della differenziazione cellulare. La via è composta da diverse molecole che interagiscono l'una con l'altra con un meccanismo di on/off che prevede cicli di fosforilazione e defosforilazione e induce l'attivazione di una cascata chinasi con la produzione di segnali intracellulari volti alla crescita, alla differenziazione e alla divisione. Un meccanismo così delicato prevede una regolazione molto fine con un meccanismo di feedback negativo che ne previene l'iperattivazione. Per dare un'idea dell'importanza di questa via, basti pensare che disregolazioni della stessa sono riscontrabili, a vari livelli, in circa un terzo dei tumori<sup>14</sup>.

In condizioni normali, la via MAPK può essere attivata da diversi impulsi extracellulari: l'EGF (epidermal growth factor), l'IGF (insulin-like growth factor) o il TGF (transforming growth factor) che inducono la trasduzione del segnale legandosi a specifici recettori transmembrana localizzati sulla superficie delle cellule.

Questo legame induce l'attivazione di RAS, una proteina appartenente alla famiglia delle GTPasi, che agisce come un interruttore on/off attivando o disattivando tutta la via a valle<sup>15</sup>. La sua attivazione le permette di fosforilare e attivare la chinasi successiva: RAF (una protein-chinasi serina/treonina-specifica con tre isoforme tessuto specifiche: ARAF, BRAF e CRAF)<sup>16</sup>. A sua volta, RAF fosforila e attiva MEK (MEK1 e MEK2) e il processo descritto si ripete in step successivi di fosforilazione con l'attivazione di ERK. ERK in ultimo agisce regolando l'espressione di una serie di geni coinvolti nella proliferazione, differenziazione e sopravvivenza.

Ad oggi, sono state caratterizzate circa 300 mutazioni di BRAF, la maggior parte a livello del codone 600, ma anche a livello di altri siti. Quasi tutte queste mutazioni si presentano come mutazioni attivanti in maniera costitutiva la via molecolare, che viene dunque svincolata da elementi esterni che ne inducano la regolazione (**Figura B**).



**Figura B.** Vie molecolari principalmente implicanti nello sviluppo di melanoma cutaneo

Un'altra via molecolare particolarmente importante nella patogenesi del melanoma sporadico è quella di PI-3K/AKT, anch'essa responsabile della crescita e della sopravvivenza cellulare.

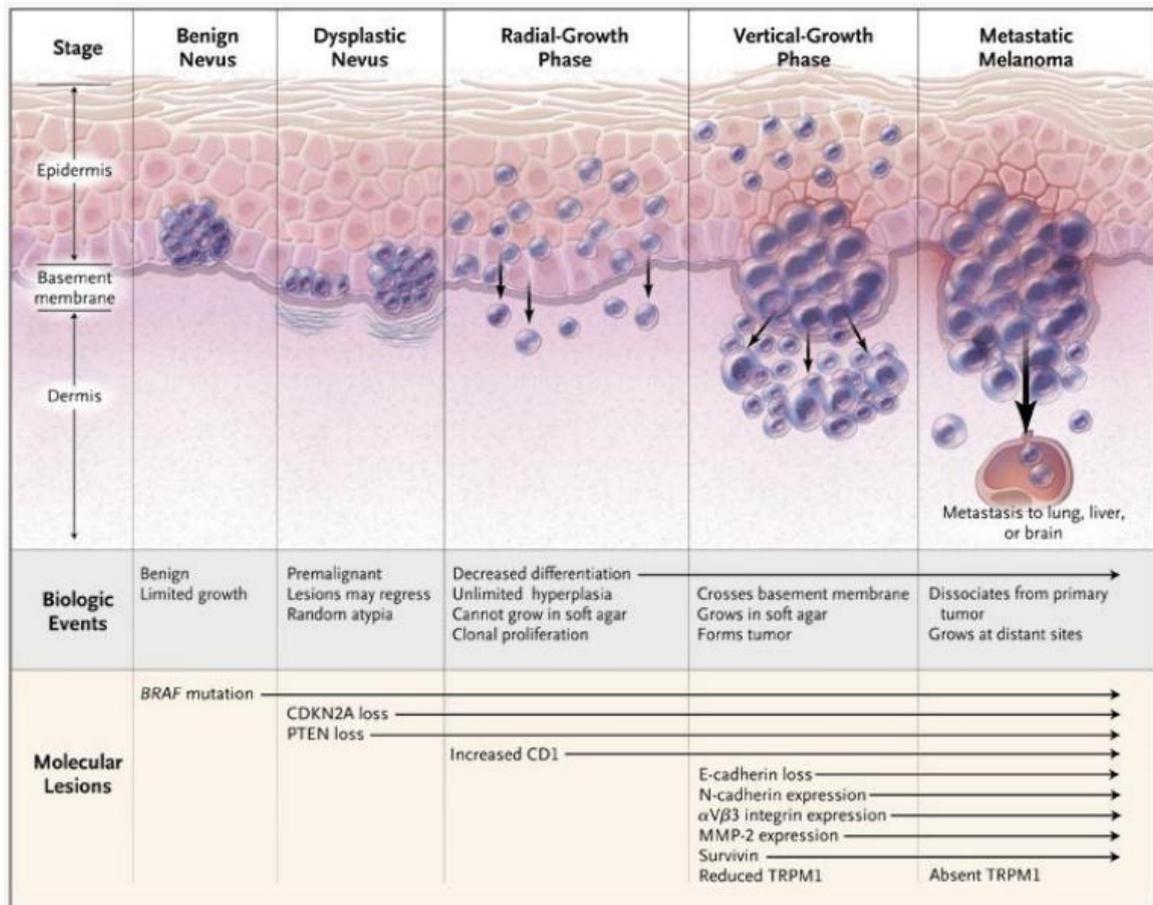
PTEN, un oncosoppressore che agisce regolando negativamente la trasduzione di segnali di PI-3K/AKT è silenziato epigeneticamente in un 20% di melanomi<sup>17</sup>.

Queste due tipologie di alterazioni molecolari sono probabilmente necessarie ma non sufficienti per lo sviluppo del melanoma. I nevi melanocitici infatti, hanno le stesse mutazioni attivanti di NRAS e BRAF che si riscontrano nei melanomi, ma diventano maligni molto raramente. Per ragioni ancora non chiare, i melanomi che insorgono in sedi non fotoesposte presentano molto più frequentemente mutazioni attivanti della tirosin-chinasi del recettore c-KIT<sup>18</sup>.

#### **1.4 Patogenesi clinica**

Il melanoma cutaneo presenta una progressione istologica, molecolare e biologica<sup>19</sup> che sembra essere correlata con la sua capacità di dare metastasi (**Figura C**).

Le tappe della trasformazione neoplastica nel melanoma sono: melanoma primitivo invasivo senza capacità di diffusione metastatica o fase di crescita radiale; melanoma primitivo invasivo o fase di crescita verticale; melanoma metastatico<sup>20</sup>.



**Figura C.** Progressione istologica, biologica e molecolare del melanoma

La fase di crescita radiale descrive la diffusione orizzontale del melanoma all'interno dell'epidermide e del derma superficiale. Dal punto di vista istologico è contraddistinta da cellule con citoplasma chiaro, atipie cellulari, mitosi non frequenti, e mancato interessamento a tutto spessore dell'epidermide; possono inoltre esserci gruppi di cellule neoplastiche al di sotto della membrana basale. Durante questo stadio iniziale le cellule tumorali sembrano prive della capacità di dare localizzazioni a distanza. Le neoplasie in fase di crescita radiale ricadono in diverse classi clinicopatologiche, tra cui la lentigo maligna, che solitamente si presenta come una lesione indolente sul volto di soggetti anziani e può rimanere in fase di crescita radiale per diversi anni.

Dopo un periodo di tempo imprevedibile, il melanoma passa dalla fase radiale alla fase di crescita verticale, durante la quale le cellule tumorali invadono gli strati dermici più profondi come una massa espansiva.

La fase di crescita verticale è uno stadio che denota una malignità superiore del melanoma, ed è spesso preannunciata dal punto di vista clinico, dalla comparsa di un

nodulo ed è correlata con lo sviluppo di un clone di cellule dal potenziale metastatico. Dal punto di vista istologico, sono più evidenti e frequenti le atipie e le mitosi, le cellule hanno acquisito un forte impulso proliferativo, occupano tutto lo spessore dell'epidermide e possono raggiungere finanche il tessuto adiposo sottocutaneo. All'immunoistochimica si riconosce la positività per la vimentina e la proteina S-100. La probabilità di metastasi in tali lesioni correla con la profondità dell'invasione, che per convenzione è la distanza dallo strato granuloso dell'epidermide alle cellule tumorali intradermiche più profonde, questa misura è nota come "spessore di Breslow"<sup>21</sup>, un fattore prognostico cruciale.

### **1.5 Caratteristiche fenotipiche e diagnosi**

Nel 70-80% dei casi il melanoma insorge de novo, ovvero su cute sana, ma può anche insorgere su una lesione pigmentata benigna preesistente, con un tasso annuale di trasformazione di un singolo nevo in melanoma di 1 su 200.000.

Il melanoma cutaneo può presentarsi sotto forme estremamente differenti. Si può manifestare come una lesione melanocitaria di nuova insorgenza con una pigmentazione che si discosta in maniera sospetta da quella di tutte le altre lesioni melanocitarie benigne presenti nell'individuo, oppure come variazione nel colore, nella dimensione o nella forma di una lesione melanocitaria preesistente. Ancora, manifestazioni precoci possono essere il dolore e il prurito a carico della lesione.

La diagnosi di melanoma può dunque essere difficoltosa ed è condizionata direttamente dall'esperienza del clinico, con sensibilità oscillante tra il 50 e l'85%<sup>22</sup>. Indicatori clinici imprescindibili, risultano quindi l'ABCDE e il segno del "brutto anatroccolo". Il sistema ABCDE (**Figura D**) prevede l'identificazione di 5 elementi fondamentali, quali:

- asimmetria della lesione, definita come la presenza di due metà non sovrapponibili in termini di forma, dimensioni o disposizione del pigmento;
- bordi irregolari, che spesso si presentano frastagliati, sfumati, a carta geografica etc.;
- colore variegato, con aree ipercromiche e ipocromiche, aree rossastre, rosa o blu;
- dimensioni > 6 mm;
- evoluzione nel tempo, con crescita evidente, che può essere più o meno rapida.



**Figura D.** Illustrazione delle regole ABCD: a sinistra dall'alto in basso: melanomi che mostrano (A) asimmetria, (B) un bordo irregolare cencioso o dentellato, (C) colorazione nelle diverse tonalità di marrone, nero o marrone chiaro e (D) diametro che ha cambiato

Il segno del “brutto anatroccolo” si riferisce alla presenza di una lesione che, pur non rispettando i criteri dell’ABCDE, si manifesta con un pattern morfologico eccentrico rispetto a quello di tutte le restanti lesioni melanocitarie benigne del soggetto<sup>23</sup>. Capitolo a sé fa il melanoma nodulare, che si manifesta caratteristicamente come un nodulo, pigmentato o non pigmentato, a crescita estremamente rapida, fermo sui piani sottostanti e di consistenza tipicamente aumentata. Le caratteristiche di questa particolare forma di melanoma sono ben sintetizzate dall’acronimo EGF: Elevated, Growth, Firm<sup>24</sup>.

Oltre all'esame clinico, sempre maggiore importanza stanno acquisendo altri strumenti diagnostici quali la dermoscopia e la microscopia confocale.

La dermoscopia o dermatoscopia digitale può offrire un valido aiuto diagnostico, con un incremento in termini di accuratezza diagnostica<sup>25</sup>.

La microscopia confocale, definita anche come biopsia ottica virtuale, può avere un ruolo chiave nella clinica soprattutto per la diagnostica di lesioni particolarmente difficili da diagnosticare sia a livello clinico che dermoscopico<sup>26</sup>.

## **1.6 Stadiazione e fattori prognostici**

Grazie all'analisi dei dati di oltre 46.000 pazienti, l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha pubblicato recentemente l'VIII edizione del manuale di stadiazione per il cancro. Con essa, vengono modificati alcuni importanti aspetti relativi alla classificazione e alla stadiazione del melanoma<sup>27</sup>. Un fattore prognostico chiave nella stadiazione AJCC è la presenza o assenza di ulcerazione nella neoplasia, che ha dimostrato di avere un valore prognostico indipendentemente dallo stadio clinico.

In aggiunta, esiste un modello di valutazione prognostica basato sulle seguenti variabili<sup>28</sup>:

- profondità di invasione della neoplasia (spessore di Breslow), al cui aumento è facilmente osservabile, come è stato già detto, un peggioramento della prognosi;
- numero di mitosi, criterio oggi escluso dall'ultima classificazione AJCC, non senza alcune perplessità. Mitoi scarsi o assenti sono generalmente correlate con una prognosi più favorevole;
- regressione del tumore, presumibilmente dovuta alla risposta immunitaria dell'ospite, il cui significato va interpretato in funzione della sua estensione;
- presenza, grado e caratteristiche dell'infiltrazione linfocitaria della neoplasia (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TIL), la cui presenza, densità e distribuzione interna alla lesione tumorale correlano con una prognosi più favorevole;
- genere, con una prognosi lievemente migliore per le donne.

Dal momento che la maggior parte dei melanomi metastatizzano a livello dei linfonodi regionali, ulteriori informazioni prognostiche possono essere ottenute eseguendo una biopsia del linfonodo sentinella. Il coinvolgimento microscopico di un linfonodo

sentinella, anche da parte di un piccolo numero di cellule di melanoma (micrometastasi), conferisce una prognosi peggiore<sup>29</sup>.

### **1.7 Terapia medica: farmaci a bersaglio molecolare**

BRAF è mutato nell'8% dei tumori umani e in circa il 40-50% dei melanomi. Ad oggi, sono state caratterizzate circa 300 mutazioni di BRAF, la maggior parte a livello del codone 600, ma anche a livello di altri siti. Quasi tutte queste mutazioni attivano in maniera costitutiva la via molecolare MAPK, che viene dunque svincolata da elementi extracellulari. La mutazione più frequente in assoluto è la BRAF V600E.

La scoperta della mutazione di BRAF e del suo significato in termini di driver oncogenico è avvenuta nel 2002. Questa scoperta ha permesso di teorizzare e sperimentare l'impiego di farmaci a target molecolare.

Il primo BRAF inibitor sperimentato nel melanoma BRAF V600E mutato è stato sorafenib (BAY 43-9006). Nonostante fosse più attivo contro il CRAF rispetto al BRAF, mostrò risultati promettenti nei modelli murini ma fallì la sperimentazione umana come agente singolo.

Nel 2005 venne sintetizzata la piccola molecola PLX4032 (Plexxikon), successivamente nota come vemurafenib, altamente selettiva per la mutazione di BRAF, con una potenza inibitrice nei confronti della chinasi mutata di circa 12 volte superiore rispetto alla chinasi non mutata.

Successivamente, l'identificazione di GSK2118436 (GlaxoSmithKline) o dabrafenib avvenne nel 2009. Dabrafenib è un inibitore reversibile, ATP competitivo, che selettivamente inibisce la chinasi BRAFV600E mutata circa 20 volte di più rispetto alla chinasi BRAF WT.

Infine, LGX818 (Novartis, later Array), o encorafenib, ha cominciato a essere valutato nel 2013. Dati preliminari e *in vitro* hanno dimostrato un'elevata potenza e una promettente efficacia. Questa molecola sembra indurre, in aggiunta, autofagia secondaria a senescenza nelle cellule BRAF V600E mutate.

### BRAF<sub>i</sub> versus chemioterapia

I risultati più significativi provengono da due studi: il BRIM-3<sup>30</sup> con il vemurafenib e il BREAK-3<sup>31</sup> con il dabrafenib. I risultati di entrambi gli studi evidenziano il vantaggio dei BRAF inibitori sulla chemioterapia.

Complessivamente<sup>32</sup>, 524 pazienti sono stati trattati con farmaci BRAF inibitori, e 401 pazienti sono stati trattati con chemioterapia, con un beneficio statisticamente significativo a favore dei BRAF inibitori in termini di OS (HR 0.4), di PFS (HR 0.27) e di ORR. Al contempo, questi farmaci si sono dimostrati superiori rispetto alla chemioterapia nella preservazione della qualità di vita, in riferimento specialmente allo studio BREAK-3. Infatti, sulla base dei questionari somministrati in corso di studio, si è registrato un aumento della funzionalità emozionale, sociale e una riduzione di sintomi quali nausea, vomito, perdita dell'appetito, insonnia etc.

Nonostante questi risultati incoraggianti, nello studio BRAK-3 la PFS mediana è stata di 5.1 mesi, simile a quella riportata nello studio BRIM-3: questo dato sottolinea come le cellule di melanoma diventino resistenti piuttosto velocemente. Da qui la necessità di identificare e bypassare questo ampio ventaglio di meccanismi di resistenza.

### MEK inibitori versus chemioterapia

Gli inibitori selettivi di MEK si sono dimostrate sono capaci di inibire la crescita cellulare e indurre l'apoptosi in cellule BRAF e NRAS mutate.

In studi preclinici infatti, linee cellulari di melanoma si sono mostrate estremamente sensibili a questi farmaci<sup>33</sup> e, nei modelli murini (xenograft models), hanno dimostrato di poter arrestare la crescita delle cellule BRAF mutate e ridurre la crescita delle cellule RAS mutate mediante apoptosi, riduzione dell'angiogenesi e della proliferazione<sup>34</sup>.

A seguito dei risultati dello studio METRIC (trametinib vs dacarbazina / paclitaxel)<sup>35</sup>, trametinib è stato il primo inibitore di MEK a essere approvato per il trattamento del melanoma metastatico BRAF mutato, mentre cobimetinib ha ricevuto l'approvazione esclusivamente in combinazione al BRAF inibitore vemurafenib.

Binimetinib è stato recentemente testato sia in monoterapia, sia in combinazione con un terzo BRAF inibitore, encorafenib. Lo studio di fase III NEMO<sup>36</sup> (binimetinib vs dacarbazine) ha dato risultati sovrapponibili in termini di OS per i due bracci (11 vs 10.1

mesi), mostrando tuttavia una buona differenza in termini di ORR (15% vs 7%) a favore del binimetinib.

### Combinazioni di BRAF e MEK inibitori

Già in studi preclinici era stato osservato combinando BRAF e MEK inibitori fosse possibile migliorare gli outcome di efficacia, ritardare lo sviluppo di resistenze e ridurre gli effetti collaterali della monoterapia con BRAF inibitori<sup>37</sup>. In ragione di queste osservazioni, un interesse sempre maggiore è cresciuto attorno alle combinazioni di farmaci target.

Il beneficio di questa strategia terapeutica è stato validato attraverso diversi studi. Complessivamente<sup>32</sup>, questi studi, che hanno raccolto dati di 918 pazienti trattati con la combinazione e 866 con la monoterapia, hanno dimostrato una superiorità statisticamente significativa della combinazione rispetto alla monoterapia in termini di OS (HR 0.70), PFS (HR 0.56) e ORR. Relativamente alla tossicità, la combinazione si è rivelata meglio tollerata rispetto alla monoterapia, con una minore percentuale di eventi avversi di grado 3 o superiore. Infine, in termini di qualità di vita, la combinazione ha mostrato di essere superiore nella combinazione che nella monoterapia con un trend favorevole in termini di dolore, insonnia, percezione del proprio benessere fisico, psichico, sociale, emozionale e cognitivo.

Nello studio di fase III COMBI-d<sup>38</sup>, 423 pazienti non precedentemente trattati, BRAF V600E/K mutati, sono stati trattati con dabrafenib e trametinib o con dabrafenib in monoterapia. Nel corso del tempo, tutti gli outcome di efficacia hanno confermato il vantaggio della combinazione rispetto alla monoterapia, con una ORR del 68 vs 55% e una percentuale di risposte complete del 18 e 15% rispettivamente, una PFS mediana di 11.0 mesi vs 8.8 (HR 0.67) e una OS mediana di 25.1 mesi vs 18.7 (HR 0.71)<sup>39</sup>. I tassi di sopravvivenza a 3 anni sono stati del 44% vs 32%<sup>40</sup>.

La combinazione dabrafenib e trametinib è stata testata inoltre in un altro studio di fase III, il COMBI-v. In questo studio 704 pazienti BRAF mutati, non pretrattati, sono stati trattati con dabrafenib + trametinib o vemurafenib in monoterapia<sup>41</sup>. La ORR è stata più alta nel braccio di combinazione (67 vs. 53%), la PFS mediana significativamente superiore (12.1 vs. 7.3 mesi; HR 0.61) e la sopravvivenza mediana 26.1 mesi vs 17.8. Risultati ancora migliori si sono ottenuti nella popolazione con LDH normale (PFS mediana di 17.5 mesi vs 9.2; HR 0.55; 2-year OS 66%; median OS non raggiunta vs 21.5

mesi HR 0.56); al contrario, nel gruppo con LDH elevato, la median PFS è stata 5.5 mesi vs 4.0 (HR 0.70), la OS mediana di 10.6 mesi vs 8.9 (HR 0.81)<sup>42</sup>.

Una successiva pooled analysis<sup>43</sup> dei due studi ha permesso di analizzare i dati dei 563 pazienti trattati con la medesima combinazione. La PFS mediana è stata di 11.1 mesi; la OS mediana di 25.9 mesi rispettivamente. La PFS a 4 anni del 21% e del 19% a 5 anni. La OS a 3 anni del 37% e a 5 anni del 34%. Questi eccellenti risultati di efficacia raggiunti in praticamente un terzo dei pazienti, dimostrano che risposte durevoli sono ottenibili anche con la target therapy e non solo con l'immunoterapia. I fattori associati a una buona risposta sono stati l'età più avanzata, il sesso femminile, il livello normale di LDH, il basso carico di malattia (meno di 3 siti metastatici). Tra i pazienti che hanno raggiunto una risposta completa (19%), la sopravvivenza a 5 anni si è rivelata impressionante (71%).

Lo studio che ha portato alla registrazione di vemurafenib e cobimetinib è stato lo studio CoBRIM<sup>44</sup>, uno studio con 495 pazienti BRAF mutati, trattati con cobimetinib + vemurafenib o vemurafenib in monoterapia. A un follow up di 14.2 mesi, la PFS mediana è stata di 12.3 mesi vs 7.2 (HR 0.58), la OS mediana di 22.3 mesi vs 17.4 (HR 0.70) mentre la 3-year OS è stata del 37.4% vs 31.1%. In questo studio, circa il 50% dei pazienti aveva un LDH normale e questo sottogruppo ha ottenuto migliori outcome, con una sopravvivenza a 3 anni del 47.8%, una sopravvivenza mediana di circa 35 mesi e una PFS mediana di 13.4 mesi. Al contrario, nei pazienti con LDH elevato, la sopravvivenza a 3 anni è stata del 39.7% vs 20.8%.

Nello studio COLUMBUS<sup>45</sup>, 577 pazienti BRAF mutati, non precedentemente trattati o a progressione da immunoterapia, sono stati avviati a ricevere terapia con encorafenib + binimetinib, encorafenib o vemurafenib in monoterapia. La PFS mediana della combinazione versus il vemurafenib è stata di 14.9 versus 7.3 mesi (HR 0.54). La ORR, ugualmente, si è dimostrata superiore nella combinazione rispetto alla monoterapia con vemurafenib (75 vs. 49%), con una percentuale più alta di risposte complete (16 vs. 7%).

La combinazione, inoltre, ha ridotto drasticamente alcuni eventi avversi come la fotosensibilità e l'insorgenza di altri tumori cutanei non-melanoma, una tossicità che era dovuta all'attivazione paradossa della via delle MAPK nelle cellule BRAF Wildtype. Resta però ancora irrisolto il problema dello sviluppo di resistenze, in quanto la sopravvivenza libera da progressione (PFS) a 12 mesi risulta ancora attorno al 50%.

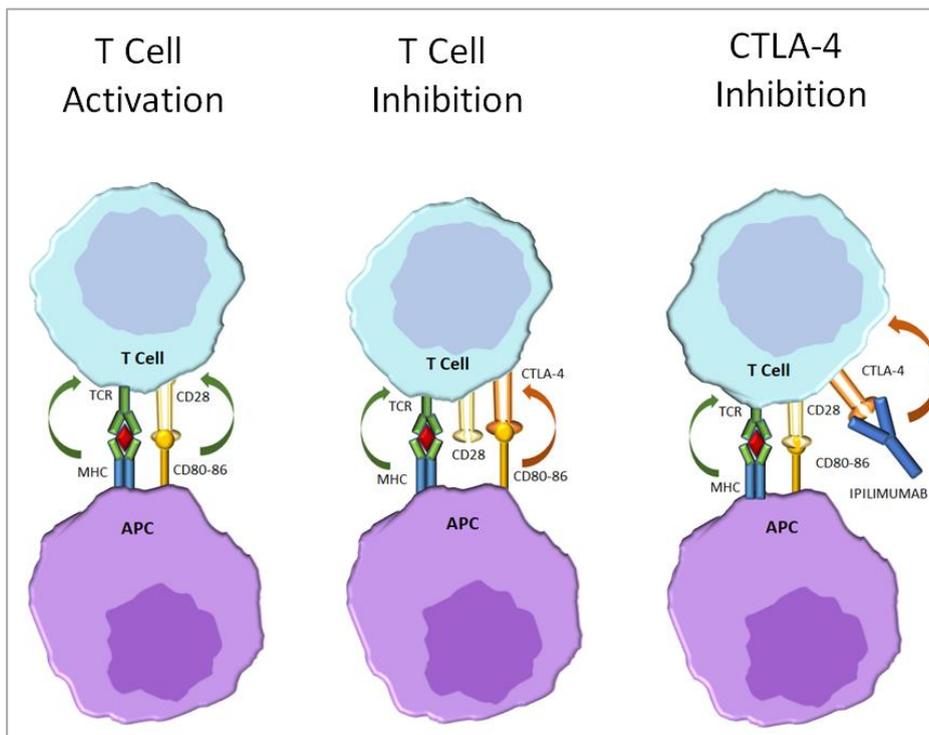
## 1.8 Terapia medica: farmaci immunoterapici

L'approvazione del primo checkpoint inhibitor risale al 2011 e ha rappresentato il più grande avanzamento nella terapia dei tumori solidi degli ultimi 10 anni. Quando si parla di checkpoint immunologici, ci si riferisce genericamente a meccanismi mediante i quali il sistema immunitario viene inibito in modo tale da non arrecare danni a cellule self o a tessuti sani. In condizioni fisiologiche questa autoregolazione immunitaria permette di mantenere in equilibrio un sistema continuamente sottoposto a spinte attivanti, evitando dunque risposte eccessive e potenzialmente dannose per l'organismo nel suo complesso. Le cellule tumorali riescono a sfruttare questi fenomeni, riuscendo a elidere la risposta immunitaria. I farmaci inibitori dei checkpoint immunologici ripristinano la risposta immunitaria anti-tumorale mediante diversi meccanismi; tuttavia, per lo stesso principio, possono provocare anche tutta una serie di tossicità associate all'attivazione di linfociti autoreattivi<sup>46</sup>. Questi eventi avversi immuno-correlati (irAE), pur essendo potenzialmente letali, sono oggi conosciuti e controllabili.

### CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte–Associated Antigen 4)

CTLA-4 (Cytotoxic T-LymphocyteAntigen 4) o CD152 è un recettore appartenente alla famiglia delle immunoglobuline espresso sulla superficie dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> recentemente attivati. Il legame con uno dei suoi ligandi, B7-1 (CD80) oppure B7-2 (CD86) espressi sulle APC, trasmette all'interno del linfocita un segnale di tipo inibitorio, contribuendo così alla regolazione della risposta immunitaria<sup>47</sup>.

Ipilimumab agisce bloccando l'interazione tra il CTLA4 e i suoi ligandi, agendo quindi come un antagonista competitivo (**Figura E**): impedisce in questo modo il silenziamento della risposta immune e ne induce, al contrario, l'iperattivazione. Ipilimumab è stato approvato in Italia dall'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) nel 2013.



**Figura E.** Attivazione e inibizione delle cellule T in rapporto a CTLA-4; meccanismo d'azione di ipilimumab.

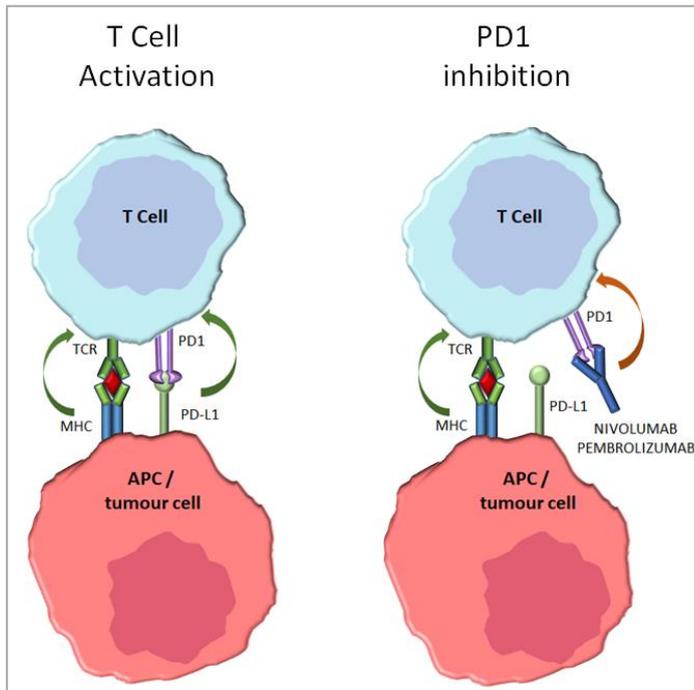
Il primo trial di fase III<sup>48</sup> ha comparato ipilimumab in monoterapia, ipilimumab in associazione al vaccino gp100 e il vaccino gp100 in monoterapia. L'analisi di sopravvivenza dello studio ha dimostrato il vantaggio di ipilimumab, da solo o in associazione, con valori di OS mediana di 10.1 e 10 mesi rispetto a 6.4 mesi raggiunti col vaccino.

In un trial successivo<sup>49</sup>, che ha reclutato 500 pazienti non precedentemente trattati, è stato confrontato ipilimumab in combinazione con dacarbazina e dacarbazina in monoterapia (standard of care). Questo studio ha dimostrato il vantaggio del braccio con ipilimumab con una OS mediana di 11 vs 9 mesi e una OS a 3 anni del 21% vs 12%. Per la prima volta un immunoterapico provava di essere superiore rispetto alla chemioterapia.

Dato ulteriormente interessante deriva da una pooled analysis<sup>50</sup> pubblicata nel 2015, che ha preso in considerazione i dati di 1861 pazienti trattati con ipilimumab e che ha dimostrato come il 20% circa dei pazienti trattati con ipilimumab fosse vivo a 3 anni, ma soprattutto che chi raggiungeva questo "cutoff" temporale dei 3 anni poi manteneva la risposta a 5 e a 10 anni, introducendo per la prima volta in oncologia il concetto di plateau.

## PD-1 (Programmed Death Ligand 1)

I farmaci anti-PD1 agiscono come immunomodulanti bloccando il legame attivante tra il recettore PD-1, situato sulle cellule linfocitarie T, e i suoi specifici ligandi. PD-1 è un recettore proteico espresso sulla superficie delle cellule linfocitarie T attive; i suoi ligandi naturali sono PD-L1 e PD-L2 e appartengono alla famiglia delle molecole B7. Quando il PD-L lega il PD-1, la cellula T viene inattivata (**Figura F**).



**Figura F.** Attivazione delle cellule T in rapporto a PD1; meccanismo d'azione di pembrolizumab e nivolumab.

Circa il 40-50% delle cellule di melanoma esprime PD-L1, mentre meno informazioni si hanno riguardo al ruolo di PD-L2.

Attualmente, esistono 2 farmaci anti PD-1 approvati dall'FDA per il trattamento del melanoma metastatico: nivolumab e pembrolizumab. Entrambi questi farmaci, nati sul solco di ipilimumab, sono anticorpi monoclonali rivolti contro PD-1, funzionando come agenti competitivi e antagonisti rispetto al PD-L.

Lo studio CheckMate 066<sup>51</sup> è stato condotto su 418 pazienti trattati con nivolumab o dacarbazina. Durante lo svolgimento dello studio, il 10 Giugno 2014 la commissione di monitoraggio ha diffuso un documento in cui segnalava un netto vantaggio in OS a favore del nivolumab: quale conseguenza è stata concesso il crossover immediato al braccio del nivolumab di tutti i pazienti caduti nel braccio della dacarbazina. L'OS mediana non è

stata raggiunta nel braccio con nivolumab, mentre nel braccio della dacarbazina è stata di 11.2 mesi; a 2 anni è stata del 58% vs 27% rispettivamente.

Lo studio KEYNOTE 006<sup>52</sup>, la cui analisi finale è stata pubblicata solo nel 2017, ha confrontato ipilimumab con pembrolizumab in due differenti schedule di somministrazione. La sopravvivenza a 4 anni è stata del 42% per le schedule di pembrolizumab vs 34% (HR 0.73) nella popolazione generale; risultati leggermente migliori si sono ottenuti nella popolazione non pretrattata, con il 44.3% vs 36.4%. Per comprendere il risultato sorprendentemente buono di ipilimumab in questo studio, bisogna ricordare come fosse concesso il crossover alla progressione. Il vantaggio del pembrolizumab si è confermato inoltre relativamente alla PFS e alla durata delle risposte che, come riportato al congresso ASCP 2018, superano il 65% a 42 mesi di osservazione.

Infine, lo studio CheckMate 067<sup>53</sup> è stato uno studio di fase 3, randomizzato, in doppio cieco, con 3 bracci di trattamento: monoterapia con nivolumab, terapia di combinazione con nivolumab e ipilimumab e monoterapia con ipilimumab. Sfortunatamente, lo studio non era disegnato per il confronto diretto tra la combinazione di ipilimumab e nivolumab con nivolumab in monoterapia: è necessario pertanto leggere i dati alla luce di questo elemento. Recentemente, all'ESMO 2019, sono stati presentati i risultati di sopravvivenza a 5 anni di questa sperimentazione, che confermano il vantaggio della combinazione ipi nivo (52%) e di nivolumab (44%) versus ipilimumab 26% con un (HR 0.63).

La combinazione ipi nivo ha mostrato tuttavia un profilo di tossicità peggiore rispetto alle monoterapie, problema a cui si sta facendo fronte studiando la combinazione di pembrolizumab dose standard e ipilimumab dose ridotta<sup>54</sup>.

## **1.9 Effetti biologici dell'immunoterapia**

Il meccanismo con cui avviene l'attivazione, l'inattivazione e la riattivazione farmacologica del linfocita T, sebbene parzialmente compreso, comprende ancora dei punti oscuri. Di riflesso, nella pratica clinica non risulta chiaro il motivo per cui la terapia è efficace solo in una frazione di pazienti. L'analisi dei dati dei trial clinici ha permesso di identificare approssimativamente tre gruppi di pazienti<sup>55</sup>:

- coloro che rispondono fin dall'inizio al trattamento e continuano a farlo nel tempo (responders);
- coloro che non hanno mai risposto al trattamento con ICI (innate resistance);

- coloro che hanno mostrato una risposta iniziale al trattamento con ICI ma che sono successivamente andati incontro a resistenza con una progressione di malattia (acquired resistance).

Finora, è stato dimostrato come la resistenza all'immunoterapia possa derivare da un difetto a livelli diversi del processo dell'immunità antitumorale<sup>56</sup>. Su questa base, è stato ipotizzato come a resistenze diverse corrispondano meccanismi diversi, che quindi richiedono altrettanto diverse possibili (o potenziali) strategie terapeutiche per essere superati con successo.

Innanzitutto, per poter agire, il sistema immunitario (e nel particolare l'immunità adattativa) necessita di essere attivato per poter generare dei cloni di linfociti T specifici contro il tumore. L'attivazione del sistema immunitario passa per la produzione di neoantigeni che, statisticamente, sono legati al carico mutazionale di una neoplasia. Oggi sappiamo che i tumori che presentano un basso carico mutazionale sono meno immunogenici<sup>57,58</sup> e correlati quindi con una minore risposta al trattamento. Tuttavia, la presentazione efficace di un neoantigene tumorale appropriato, l'attivazione e il priming dei linfociti T non sempre sono sufficienti a garantire una risposta duratura contro il tumore, a causa dell'effetto sfavorevole esercitato dal microambiente tumorale (TME) sulla vitalità dei linfociti.

Il TME, per contrastare l'attivazione e sfuggire al riconoscimento mediato dai linfociti T CD8<sup>+</sup> infiltranti il tumore (CD8<sup>+</sup> TILs), mette in atto numerosi meccanismi immunosoppressivi tra i quali l'upregolazione sui linfociti di recettori immuno-checkpoint quali PD-1, CTLA-4, Tim-3 e LAG-3.

In particolare, all'interno del tumore i linfociti T CD8 che over-esprimono il recettore PD-1 mostrano uno stato funzionale alterato definito "exhaustion", caratterizzato da una ridotta funzione effettrice. Evidenze recenti suggeriscono che le cellule T "exhausted" (Tex) possano svolgere un ruolo chiave durante la risposta al trattamento con ICI in quanto la loro attività antitumorale può essere ripristinata dall'interruzione del pathway PD-1/PD-L1. L'esaurimento funzionale (exhaustion) dei linfociti T CD8 è già stato ampiamente descritto in ambito infettivologico<sup>59</sup>, ed è oggi nota l'esistenza di popolazioni linfocitarie distinte che rispondono in maniera differente ai diversi ICI.

Recentemente è stato eseguito un profilo citometrico dei TILs che ha rivelato che anti-PD-1 e anti-CTLA-4 agiscono con meccanismi differenti sulle popolazioni cellulari dell'infiltrato<sup>60</sup>: si è dimostrato che il blocco di PD-1 rinvigorisce la risposta dei linfociti

T CD8, mentre il blocco di CTLA-4 provoca l'espansione di una popolazione di T CD4 Th1-like che esprime il ligando co-stimolatorio ICOS. Non bisogna inoltre sottovalutare l'esistenza di checkpoint immunologici inibitori alternativi a PD-1 e CTLA-4, come T cell Immunoglobulin and Mucin domain 3 (Tim-3), e l'espressione di fattori di trascrizione quali Eomesodermin Eomes, associati all'esaurimento funzionale dei linfociti T. Secondo recenti studi<sup>61</sup> condotti sull'infiltrato linfocitario associato a carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), i linfociti T CD8 infiltranti che esprimono alti livelli di PD-1 (PD-1 high) presentano caratteristiche fenotipiche e funzionali differenti rispetto ai T CD8 che esprimono PD-1 a livello intermedio (ovvero simile a quello riscontrabile nei PBMC di un donatore sano) o basso (PD-1 low), o nullo (PD-1 neg). In particolare, la popolazione PD-1 high sarebbe associata all'espressione di alti livelli di TIM3 e alla positività del fattore di trascrizione Eomes, denotando un esaurimento funzionale (exhaustion) di queste cellule.

Anche dopo aver ottenuto una risposta efficace da parte del sistema immunitario verso il tumore, resta il problema di mantenere nel tempo questa efficacia. Una popolazione cellulare chiave in questo processo è quella dei linfociti T della memoria, la cui generazione può essere ostacolata da alterazioni epigenetiche potenzialmente reversibili con l'impiego di farmaci già disponibili in commercio, come gli agenti ipometilanti e gli inibitori di istone deacetilasi<sup>55</sup>.

Poter predire la risposta al trattamento o arrivare a comprendere il razionale alla base di ciascuna resistenza risulta quindi quanto mai cruciale.

Ulteriore aspetto riguarda l'analisi delle varianti geniche a singolo nucleotide (SNV) di questi checkpoint immunologici. Gli SNV sono per la maggior parte localizzati in regioni regolatorie non codificanti, e molto più raramente determinano il cambiamento di un solo aminoacido nella sequenza peptidica (variante non sinonima).

Secondo recenti evidenze<sup>62,62,63</sup> gli SNV di PD-1 e PD-L1 sono stati associati sia alla prognosi che alla risposta a chemioterapia o a nivolumab nel carcinoma non a piccole cellule del polmone (NSCLC). Sarebbe utile quindi analizzare, anche nel melanoma, il ruolo di tali SNV nella risposta immune e nei meccanismi alla base della risposta e della resistenza agli anticorpi inibitori i checkpoint immunologici.

Lo studio di queste varianti geniche ha già fornito evidenze significative per quanto riguarda alcuni SNV di CTLA-4, in particolare gli SNV -1577G>A, CT60G>A, come pure l'SNV -1661G>A, che sono risultati associati rispettivamente alla miglior risposta al

trattamento<sup>65</sup> e all'insorgenza di eventi avversi immuno-correlati<sup>66</sup> in pazienti trattati con ipilimumab. Questi risultati pongono un forte accento sul valore degli SNV come potenziali fattori predittivi e/o prognostici in questi pazienti. Inoltre, è importante notare che alcuni degli SNV di PD-1 possono anche influenzare la percentuale di linfociti T PD-1 positivi, come riportato per l'allele C del SNV PD1.5, rispetto all'allele T, in pazienti con diabete mellito autoimmune<sup>67</sup>. Risulta quindi interessante valutare il possibile effetto degli SNV sulla densità dei linfociti T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> infiltranti il tumore oltre che sull'intensità di espressione di PD-1.

Un altro aspetto importante nell'immunobiologia del melanoma riguarda l'attività delle cellule natural killer (NK). Si tratta di linfociti dell'immunità innata<sup>68</sup> – capaci quindi di eliminare le cellule target senza dover essere attivate con il riconoscimento di un antigene proteico specifico presentato da una cellula APC (come avviene nell'immunità adattiva) – e caratterizzati da una potente attività citolitica verso le cellule infettate da virus che esprimono bassi livelli di molecole HLA-I, oltre a essere considerati i più potenti effettori attivi contro diversi tumori *in vitro*<sup>69,70</sup>. Questo straordinario potenziale *in vitro* però, non trova una valida conferma *in vivo*, dove questa efficacia risulta compromessa da molteplici fattori immunosoppressori<sup>71-73</sup> prodotti nel contesto del microambiente tumorale, come ad esempio l'enzima indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO), il transforming growth factor b (TGFβ), e la prostaglandina E2 (PGE2) – implicati anche nei complessi meccanismi di exhaustion dell'immunità adattiva.

La comprensione di questi meccanismi di immunotolleranza ha portato a una sperimentazione clinica, poi abbandonata, degli anticorpi inibitori dell'enzima IDO: epacadostat e inoximod, in combinazione con anti-PD-1<sup>74</sup>. Risulta evidente il forte potenziale dei linfociti NK nell'immunità antitumorale<sup>75</sup>. Un potenziale che per poter rappresentare un valore clinico aggiunto necessita una comprensione ancora più approfondita del meccanismo d'azione dei farmaci a bersaglio molecolare e degli anticorpi bloccanti i checkpoint immunologici su questa popolazione cellulare, anche alla luce delle recenti evidenze sperimentali che correlano i livelli di linfociti NK intratumorali e di cellule dendritiche stimolatorie intratumorali (SDCs) con la risposta agli anticorpi anti-PD-1 e con la sopravvivenza globale nei pazienti con melanoma<sup>76</sup>. Esistono ulteriori evidenze, inoltre, che dimostrano l'esistenza di linfociti NK che esprimono PD-1<sup>77</sup>.

## 2. OBIETTIVI

In questo lavoro sono state analizzate le caratteristiche fenotipiche e funzionali dell'infiltrato linfocitario (TIL) presente in biopsie di metastasi di melanoma cutaneo. In particolare, è stato correlato il grado di espressione di PD-1 nei linfociti T CD8 infiltranti con il grado di espressione di *checkpoint* immunologici alternativi (TIM3), e con l'esaurimento funzionale.

È stato quindi correlato il profilo immunologico dell'infiltrato con le varianti geniche a singolo nucleotide (SNV) di PD-1 che hanno un ruolo funzionale nelle malattie autoimmuni e nei tumori, e che potrebbero avere un significato predittivo non solo della risposta al trattamento con anti-PD-1, ma anche del reclutamento di linfociti T CD8<sup>+</sup> nell'infiltrato tumorale.

L'intento è stato quello di individuare possibili biomarcatori predittivi della risposta al trattamento con terapia a bersaglio molecolare e/o inibitori dei checkpoint immunologici.

Gli obiettivi:

- (1) Analisi fenotipica e funzionale dell'infiltrato linfocitario su biopsie di melanoma cutaneo in pazienti sottoposti a terapia a bersaglio molecolare e/o a inibitori dei *checkpoint* immunologici;
- (2) Analisi dell'espressione di PD-1 nei TIL;
- (3) Correlazione della percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> (PD-1 *high/low/neg*) e dei loro livelli di espressione di PD-1 con alcuni SNV di PD-1 e PD-L1.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Reclutamento dei pazienti**

In questa tesi saranno discussi i dati preliminari riferiti a una casistica di 30 pazienti (di cui sono state ottenute 33 biopsie in totale) arruolati fra il 07/04/2017 e il 03/10/2019 all'interno dello studio osservazionale SEQPERMEL.

Lo studio ha una durata prevista di 3 anni ed è stato promosso dall'Ospedale Policlinico San Martino.

Sono stati inclusi nello studio i pazienti trattati con inibitori di BRAF e MEK e/o con ICI (pembrolizumab, nivolumab in monoterapia o combinati a ipilimumab) previo consenso informato.

Di seguito i criteri di inclusione:

1. Età maggiore di 18 anni;
2. Aspettativa di vita maggiore di 12 settimane;
3. Diagnosi di melanoma metastatico istologicamente confermato;
4. Indicazione di biopsia per scopi diagnostici, palliativi o terapeutici;
5. *Performance status* (PS) Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) compreso fra 0 e 3.

I pazienti sono stati seguiti secondo pratica clinica per la gestione delle tossicità, valutazione della risposta alle terapie, progressione di malattia e sopravvivenza globale. Lo stadio del tumore è stato stabilito secondo il sistema di classificazione TNM (Tumor, Node, Metastasis) dell'AJCC (American Joint Committee on Cancer) e le risposte obiettive classificate secondo i criteri RECIST 1.1 e iRECIST per le risposte all'immunoterapia<sup>78,79</sup>. È stato creato un database dei campioni inseriti nello studio contenente i dati clinici dei pazienti (linee terapeutiche, risposte obiettive, PFS, tossicità), analisi dell'infiltrato linfocitario, analisi degli SNV di PD-1.

#### **3.2 Biopsie tumorali**

Tutti i pazienti arruolati hanno avuto indicazione ad effettuare una biopsia per scopi diagnostici, terapeutici o palliativi. Il materiale biologico è pervenuto all'UO di Anatomia e Istologica Patologica per le indagini diagnostiche (verifica della lesione, tipizzazione, caratterizzazione della popolazione cellulare da esaminare e studiare). Il campionamento è

quindi avvenuto per assegnazione di un codice alfanumerico personale per ciascun paziente (i.e. SPM seguito da numero arabo crescente).

L'analisi fenotipica e funzionale dell'infiltrato linfocitario (TILs) è stata condotta presso l'UO Immunologia sotto il coordinamento della Prof.ssa Pietra.

**Processazione dei campioni biotici.** Le lesioni resecate sono state immediatamente processate in *single-cell suspensions* per sminuzzamento meccanico con forbici sterili e scissione enzimatica con 500 µl collagenasi tipo IA e 30 µl DNase (Digestive Mix) per un'ora in rotazione, e filtraggio su filtro da 100 µm (Celbio S.p.A.). L'omogenato ottenuto è stato poi separato mediante gradiente di densità (Ficoll Hypaque) per eliminare le cellule necrotiche.

**Anticorpi e analisi funzionale mediante citofluorimetria multiparametrica dei linfociti T infiltranti.** In **Tabella 1** sono elencati gli anticorpi monoclonali coniugati con differenti fluorocromi impiegati nelle differenti analisi citofluorimetriche.

Antigene (CD)	Fluorocromo	Clone	Ditta	Diluizione	Codice
CD19	VioBright FITC	LT19	MILTENYI	1:25	130-104-578
CD3	APC-R700	UCHT1	BD	1:50	565119
CD39	BB515	TU66	BD	1:25	565469
CD4	FITC	RPA-T4	MILTENYI	1 100	560649
CD45	APC-H7	2D1	BD	1:100	560178
CD45 RA	BV510	HI100	BD	1:100	563031
CD45 RO	FITC	UCHL1	BD	1:5	555492
CD56	PC7	N901 (HLDA6)	Coulter	1:100	A21692
CD8	APC	RPA-T8	BD	1:100	561952/561953
CD8	PC7	SFCI21Thy2D3	Coulter	1:200	A21692
EOMES	FITC	WD1928	eBioscience	1:50	11-4877-42
Granzyme B	PE- CF594	GB11	BD	1:200	562462
IL-2	PE-CF594	5344111	BD	1:75	562384
IFN-gamma	AlexaFluor 647	B27	BD	1:100	557729
TNF alpha	Per-CP-Cy 5.5	MAb11	BD	1:25	560679
KI-67	Per-CP-Cy 5.5	B56	BD	1:100	561284
PD1	PE	PD1.3.1.3	MILTENYI	1:100	130-117-384
TIM-3	BV421	7D3	BD	1:200	565563
CD8	PE Vio 615	REA734	MILTENYI	1:75	130-110-685
CD103	APC	BerACT8	Biolegend	1:50	350216
ICOS	APC Fire 750	C398.4A	Biolegend	1:33	313535

**Tabella 1.** Lista degli anticorpi utilizzati nel seguente studio e dei relativi fluorocromi, ditte produttrici, diluizione finale usata per la fluorescenza e numero di catalogo.

Per la caratterizzazione fenotipica di superficie, la sospensione cellulare ottenuta dalla processazione del campione è stata lavata e risospesa in 50 µl di PBS contenente gli opportuni anticorpi monoclonali (mAbs) coniugati con differenti fluorocromi per la colorazione di superficie. È stato aggiunto successivamente colorante per la vitalità cellulare live/dead Aqua (Invitrogen). Le cellule quindi sono state incubate per 20 minuti a 4 °C. Dopo un lavaggio, infine, sono stati impiegati 300 µl di formalina 0,5% per la fissazione. Per le colorazioni intranucleari, le cellule sono state lavate, fissate e permeabilizzate usando Fix/Perm Solution (eBioscience) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi eseguiti con Permeabilization Buffer (eBioscience), le cellule sono state risospese in 1X Permeabilization Buffer (eBioscience) contenente gli anticorpi ed incubate per 40 minuti a temperatura ambiente.

Per l'analisi quantitativa del repertorio TCR Vβ dei TIL infiltranti le biopsie di MM è stato utilizzato il kit IO Test Beta Mark (Beckman Coulter). Questo kit consente di studiare il repertorio su sottoinsiemi di cellule T, utilizzando anticorpi per marcatori di cellule T aggiuntivi, come CD3, CD4 e CD8. Il kit è composto da 8 vials contenenti miscele di anticorpi anti-TCR Vβ coniugati (con FITC, PE o FITC+PE) corrispondenti a 24 specificità TCRVβ differenti (il kit ha circa il 70% di copertura del normale repertorio TCR umano).

Le colorazioni intracitoplasmatiche per TNFα, IFNγ e IL-2 sui TIL sono state effettuate dopo stimolazione policlonale delle cellule con Phorbol 12-Myristato 13-Acetano (PMA) 10 ng/ml (Sigma Aldrich) e ionomicina (Sigma Aldrich) 500 ng/ml. Dopo un'ora dalla stimolazione sono state aggiunte monesina 1:1500 (GolgiStop BD) e brefeldina A 1:1000 (GolgiPlug BD). Dopo ulteriori quattro ore di incubazione a 37°C, le cellule sono state lavate, fissate e permeabilizzate usando Fix/Perm solution (BD Bioscience) per 20 minuti a 4 °C. Dopo un lavaggio, le cellule sono state risospese in 1X Permeabilization Buffer (BD Bioscience) contenente gli opportuni anticorpi coniugati con fluorocromi per 30 minuti a 4 °C.

L'acquisizione dei campioni è stata condotta su citofluorimetro FACS Gallios a tre laser (Beckman Coulter). La popolazione linfoide d'interesse è stata acquisita impostando gli assi del grafico su CD45 vs Side Scatter Area (SSC-A). Le cellule non vitali sono state escluse dall'analisi mediante l'utilizzo del colorante per la vitalità cellulare live/dead Aqua (Invitrogen).

Sono state escluse le cellule adese l'una all'altra con *doublet event exclusion* (FSC Linear height vs FSC Area). È stata compensata la sovrapposizione spettrale fra i fluorocromi. Le analisi sono state condotte mediante software FlowJo v10.3 (Tree Star Inc.) e GraphPad Prism v6.0e (GraphPad Software Inc.). Da ciascun campione bioptico sono state isolate anche le cellule neoplastiche vive per sminuzzamento con forbici sterili e dissociazione enzimatica con 500 µl collagenasi tipo IA e 300 µl DNase in RPMI serum-free 1640 (Lonza) per un'ora a 37°C. La sospensione di cellule tumorali è stata lavata con RPMI 1640 + siero fetale bovino (FBS) al 10% (Euroclone, Celbio S.p.A., Milano, Italia). Per la rimozione di macroaggregati di tessuto tumorale è stato impiegato filtro da 100 µm (Celbio S.p.A., Milano, Italia). Gli eritrociti contaminanti sono stati rimossi per lisi osmotica. L'omogenato ottenuto è stato poi separato mediante gradiente di densità (Ficoll Hypaque) qualora fossero presenti numerose cellule non vitali. La sospensione ottenuta è stata poi lavata in PBS (Celbio S.p.A., Milano, Italia), risospesa in terreno di coltura RPMI 1640 + 10% FBS, addizionato all'1% di soluzione antibiotica (penicillina 5 mg/ml, streptomycina 5 mg/ml). Le cellule di melanoma sono state infine piastrate e incubate a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Ciascuna linea di melanoma ottenuta è stata campionata con il codice alfanumerico personale di ciascun paziente.

### **3.3.1 Prelievi di sangue periferico**

Sui prelievi di sangue periferico è stata condotta l'analisi degli SNV di PD-1 e PD- L1 in collaborazione con la dott.ssa Pistillo, presso l'UO Epigenetica dei Tumori.

### **3.3.2 Estrazione di DNA e amplificazione mediante PCR**

Il DNA genomico è stato estratto dal sangue periferico in toto (in EDTA) utilizzando il mini kit QIAamp DNA Blood (Qiagen, Milano) seguendo le istruzioni del produttore.

Dopo l'estrazione è stata valutata la purezza dei campioni tramite lo spettrofotometro Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer che utilizza un puntale ottico per poter recuperare il DNA dopo la lettura.

Lo strumento misura l'assorbanza a 260 nm (lunghezza d'onda di assorbimento degli acidi nucleici), a 230 nm (lunghezza d'onda di assorbimento dei carboidrati e dei fenoli), e a 280 nm (caratteristica delle proteine). Per buoni indici di purezza i rapporti fra le assorbanze lette devono essere compresi fra i seguenti valori:  $A_{260}/A_{280}= 1,6-1,8$  e  $A_{260}/A_{230}= 1,8-2,2$ .

Il DNA è stato amplificato mediante PCR con primer specifici che comprendono l'SNV d'interesse all'interno della regione amplificata. L'amplicone che ne risulta sequenza specifico. I primer utilizzati nella presente tesi e le loro condizioni di utilizzo sono già stati precedentemente testati.

### 3.3.3 Tipizzazione delle varianti geniche SNV di PD-1 e PD-L1

È stata eseguita la tipizzazione di 23 pazienti SEQPERMEL per un pannello di 8 SNV di PD-1 e PD-L1 selezionati in base al ruolo funzionale in alcune malattie autoimmuni e all'associazione con vari tumori:

- PD1.3G>A (introne 4)
- PD1.5C>T (esone 5)
- PD1.6G>A (3' UTR)
- PD1.7T>C (introne 1)
- PD1.10C>G (introne 3)
- PD-L1C>A 8293 (introne 4)
- PD-L1C>T (3' UTR) rs2297136
- PD-L1G>C (3' UTR) rs4143815

Si tratta di SNV localizzati soprattutto in regioni regolatorie non codificanti e in grado di alterare principalmente l'efficienza trascrizionale di PD-1 e PD-L1 attraverso alcuni meccanismi:

- Riducendo la trascrizione di mRNA specifico;
- distruggendo siti di legame per fattori di trascrizione chiave per la maturazione e la funzionalità di linfociti T e NK, come nel caso di PD1.3 (Zhang G, et al., 2014; Zhang G, et al., 2015) per RUNX1 e NFκB, importanti per la funzionalità dei linfociti (regolano la trascrizione di vari geni tra cui TCR, CD3, IL-2, IFN-γ); e nel caso di PD1.10 per il fattore ZEB, importante per la maturazione dei linfociti T CD8 e delle cellule NK;
- alterando il sito di legame per i miRNA regolatori come nel caso di PD1.6 per il miR-4717 che mantiene la riduzione di PD-1 e l'upregolazione di IFN-γ e TNF-α; e gli SNV di PD-L1 che modulano l'espressione di PD-L1<sup>80</sup>;
- alterando siti di *splicing* o della struttura secondaria dell'mRNA.

Le tipizzazioni degli SNV sono state eseguite mediante saggi basati sulla tecnologia di *pyrosequencing* (PSQ) e di lightSNiP assay – solo per PD1.3<sup>81</sup>

Il PSQ è stato condotto con l'utilizzo del PyroMark Q96 ID (Qiagen).

Il PSQ è un metodo di sequenziamento per sintesi basato sul rilevamento luminometrico del rilascio di pirofosfato a seguito dell'incorporazione di un nucleotide. I risultati vengono presentati come picchi in un programma. L'altezza del picco è proporzionale alla quantità di nucleotidi incorporati.

Il LightSNiP invece è un saggio in *real time* PCR basato sull'analisi delle diverse temperature di denaturazione (*melting*) delle varianti geniche. A temperature diverse corrispondono varianti geniche diverse.

Le frequenze genotipiche degli SNV dei pazienti sono state confrontate con quelle di soggetti sani caucasici mediante il test statistico  $\chi^2$  di Pearson. Lo stesso test è stato impiegato anche per valutare la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg usando il programma di de Finetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

## 4. RISULTATI

### 4.1.1 Analisi dell'infiltrato linfocitario presente nelle biopsie tumorali

Mediante un'analisi citofluorimetrica multiparametrica abbiamo caratterizzato l'infiltrato linfoide (CD45<sup>+</sup>) presente all'interno delle biopsie tumorali (n=33) ottenute da 30/48 pazienti arruolati nel protocollo SEQPERMEL. I dati, riassunti in Tabella 1 si riferiscono all'analisi eseguita su 33 biopsie tumorali di MM (melanoma metastatico).

Pazienti SPM	Linfociti CD45 <sup>+</sup>		CD3 <sup>+</sup> T		CD8 <sup>+</sup> T			CD4 <sup>+</sup> T			NK	
	%CD3 <sup>+</sup>	%NK	%CD4	%CD8	%PD-1 <sup>neg</sup>	%PD-1 <sup>low</sup>	%PD-1 <sup>high</sup>	%PD-1 <sup>neg</sup>	%PD-1 <sup>low</sup>	%PD-1 <sup>high</sup>	%PD1 <sup>neg</sup>	%PD1 <sup>pos</sup>
#1	73	4	38	62	8	67(16)(b)	5(77)	14	80(9)	6(92)	76	24(14)
#2	77	6	57	39	12	49(12)	39(121)	12	74(11)	14(104)	97	3
#7	78	2	20	76	8.7	91(4.7)	0	12	87(7)	0	97	3
#8	89	6	28	68	16	22(6)	59(75)	29	59(7.6)	12(65)	94	6
#10	84	5	38	60	7	28(13)	65(154)	26	61(11)	12(132)	96	4
#11ln(a)	74	2	64	33	61	39(7.5)	0	51	49(5)	0	92	8
#13	23	2	40	48	6	94(11)	0	20.1	79.2(7)	0	96	4
#14	95	3	27	58	27	14(4)	58(40)	18	64(6)	18(40)	100	0
#15ln	59	1	76	22	15	81(20)	4(57)	43	55(6.9)	3(105)	97	3
#16ln	88	8	30	67	4	9(15)	89(96)	18	66(10)	16(55)	93	7
#17	44	2	80	16	65	35(4)	0	52	47.5(3)	0	99	1
#18	67	22	32	61	18	82(10)	0	26	74(4)	0	98	2
#19	88	4	39	48	31	45(13)	24(60)	30.8	62(5)	7(33)	100	0
#20	95	3	42	49	5	25(9)	70(91)	12	53(10)	33(89)	86	14
#20r(c)	96	2	64	28	10	20(3)	69(20)	9	28(3)	62(17)	92	8
#20rr(d)	68	21	42	55	64	36(2)	0	89	11(1.8)	0	100	0
#21	72	24	34	58	24	63(10)	13(140)	12	82(10)	6(84)	96	4
#21r	73	14	18	74	37	63(4)	0	63	37(2)	0	100	0
#23	55	28	57	32	48	38(4)	14(15)	62	26(5)	12(25)	94	6
#24	85	0.5	35	59	6	94(9)	0	70	3(5)	0	92	8
#26	86	5	59	37	28.7	71(11)	0	11	88(21)	0	96	4
#28ln	76	1	62	36	58	17(3)	26(17)	70	23(3)	5(13)	97	3
#30	96	1	24	73	3	97(14)	0	6	94(7)	0	90	10
#31	95	2	20	77	2	4(4)	94(33)	13	53(4)	33(24)	96	4
#34r	69	17	62	33	53	45(4)	0	58	41(3)	0	100	0
#36ln	97	0.5	25	66	1	10(3)	89(8)	11	43(2)	45(9)	82	18
#38	97	1	35	62	58	42(1)	0	92	8(2)	0	100	0
#39	98	1	50	47	32	68(2)	0	52	48(2)	0	100	0
#40ln	81	1	33	65	10	13(6)	77(58)	13	28(6)	59(53)	77	23
#40r	93	0.5	14	85	2	9(14)	89(74)	8	39(10)	53(79)	67	33
#41	66	5	33	60	19	9(5)	72(59)	8	49(5)	42(23)	87	13
#44	81	7	53	41	26	22(3)	53(11)	15	38(2)	46(9)	97	3
#47	75	4	51	41	55	36(5)	9(83)	27	68(7)	4(50)	96	4

(a) metastasi linfonodali; (b) in numeri in parentesi si riferiscono ai valori dello stain index calcolato secondo la formula:  $Stain\ Index = (Median\ of\ Positive - Median\ of\ Negative) / (SD\ of\ Negative * 2)$ ; (c) biopsia resistente al primo trattamento; (d) biopsia resistente al secondo trattamento

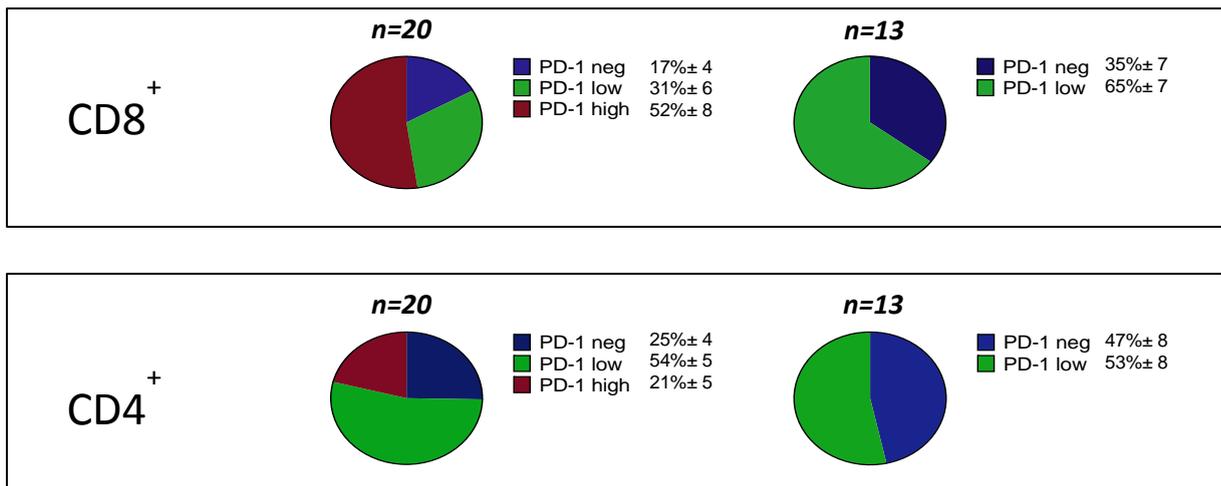
**Tabella 1. % delle differenti popolazione linfocitarie T e NK presenti nell'infiltrato in 33 biopsie di MM.** Riassunto delle caratteristiche fenotipiche dell'infiltrato linfocitario presente in 33 biopsie di metastasi di melanoma (ottenute da 30 pazienti). All'interno della popolazione T (sia T CD4 T CD8) si possono evidenziare differenti subsets linfocitari caratterizzati da un differente livello di espressione del checkpoint PD-1 (qua indicate come PD-1 high” “PD-1 low” e PD-1 neg). I numeri in parentesi si riferiscono ai valori dello stain index calcolato secondo la formula:  $Stain\ Index = (Median\ of\ Positive - Median\ of\ Negative) / (SD\ of\ Negative * 2)$ .

All'interno delle lesioni tumorali più dei 3/4 di linfociti presenti sono rappresentati da cellule T CD3<sup>+</sup>. L'unica eccezione è rappresentata dall'infiltrato linfocitario presente nella biopsia (linfonodale) del paziente SPM13 in cui sono presenti alte percentuali di cellule B CD19<sup>+</sup> (dato non mostrato). Nell'infiltrato linfocitario sono individuabili anche le cellule NK (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>). In particolare, l'infiltrato linfoide ottenuto dalle lesioni SPM18, SPM20RR, SPM21 e SPM23 è caratterizzato da un'alta percentuale di cellule NK (> del 20% dei TILs). I linfociti T CD3<sup>+</sup> presenti nelle biopsie SPM 1, 7, 8, 10, 14, 16, 18, 19, 20, 20RR, 21, 21R, 24, 30, 31, 36, 38, 40, 40R, e 41 sono per la maggior parte CD8<sup>+</sup>. Mentre nelle altre biopsie prevalgono, in percentuale, i linfociti T CD4<sup>+</sup>. Abbiamo inoltre analizzato l'espressione del recettore PD-1 nelle differenti sottopopolazioni linfocitarie T (CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>). Il recettore inibitorio PD-1 è espresso in alta percentuale dai linfociti T infiltranti il tumore. In particolare, sia i linfociti T CD8<sup>+</sup> che i linfociti T CD4<sup>+</sup> esprimono sulla loro superficie differenti livelli di PD-1. Si possono distinguere infatti:

- sottopopolazioni T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> che esprimono alti livelli di PD-1 (PD-1 high)
- sottopopolazioni T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> che esprimono bassi livelli di PD-1 (PD-1 low)
- sottopopolazioni (negli infiltrati linfoidi) che non esprimono PD-1 (PD-1 neg).

Nella **Tabella 1** i numeri che compaiono in parentesi si riferiscono ai valori dello stain index del recettore PD-1 che è stato calcolato secondo la formula indicata nella legenda alla Tabella.

**In Figura 1** sono mostrate le frequenze delle differenti sottopopolazioni T PD-1 (high, low e neg) presenti nelle 33 biopsie analizzate. In particolare, in **20/33** biopsie è stato possibile evidenziare sottopopolazioni T (sia CD8<sup>+</sup> che CD4<sup>+</sup>) che esprimevano sulla loro superficie differenti livelli di PD-1. Al contrario in **13/33** biopsie sia i linfociti CD8<sup>+</sup> TIL che i CD4<sup>+</sup> TIL esprimevano bassi livelli di PD-1

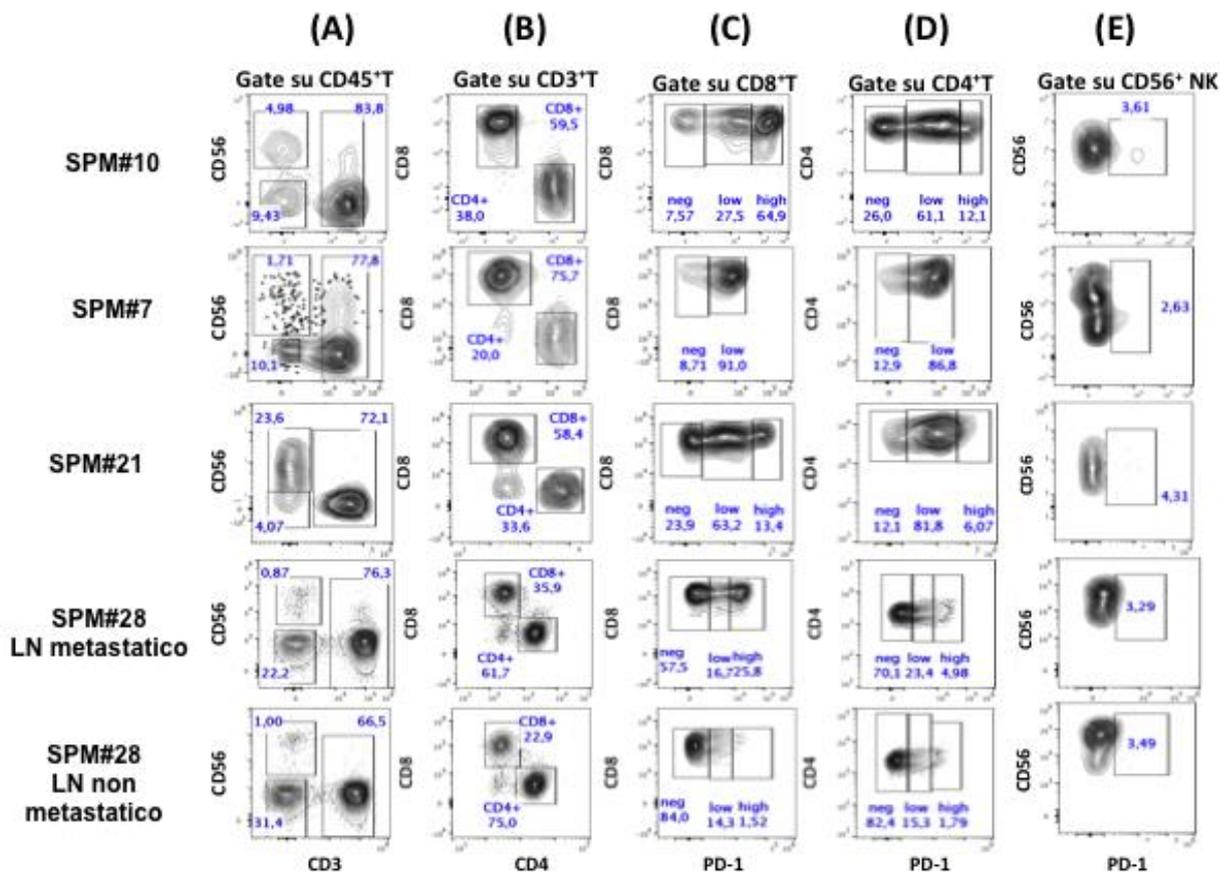


**Figura 1.** Percentuali e livelli di espressione del recettore PD-1 (high, low e neg) nei linfociti T infiltranti (TIL) in 33 biopsie di MM

In **Figura 2** sono mostrate in dettaglio le analisi citofluorimetriche dei TILs isolati dalle biopsie ottenute da 4 pazienti (SPM10, 7, 21 e 28). La “*gating strategy*” adottata per le nostre analisi citofluorimetriche è stata la seguente: un primo gate è stato eseguito sulle cellule CD45<sup>+</sup>, un secondo gate è stato eseguito sui linfociti CD45<sup>+</sup> identificati attraverso parametri fisici (FS-A vs SS-A) (non mostrati in figura). Nei **panelli (A)** sono mostrati i dot-plots (CD3 vs CD56) attraverso i quali possono essere identificate le cellule T (CD3<sup>+</sup>) e le cellule NK (CD3-CD56<sup>+</sup>). I **panelli (B)** mostrano le percentuali dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> infiltranti le differenti biopsie.

In particolare, nell’infiltrato linfocitario T CD3<sup>+</sup> presente nelle biopsie SPM10, SPM21 e SPM28 (**panelli C e D**) si possono evidenziare 3 differenti sottopopolazioni sia CD8<sup>+</sup> che CD4<sup>+</sup> che esprimono sulla loro superficie diversi livelli di PD-1 (indicate come PD-1 neg/low/high). Al contrario, all’interno dei linfociti T CD3<sup>+</sup> derivati dalla biopsia del paziente SPM7 possono essere evidenziati solo 2 subsets di linfociti, sia CD8<sup>+</sup> che CD4<sup>+</sup>, che esprimono bassi livelli di PD-1 sulla superficie o che sono negativi per tale marcatore (qua indicate come PD-1 neg e PD-1 low).

È, infine interessante notare che nell’infiltrato linfoide derivato dal paziente SPM21 21 sono presenti % significative di cellule NK **Pannello (A)**. Infine, qui sono mostrati anche i risultati che mostrano che nella biopsia del paziente SPM28 (LN metastatico), le cellule T CD8<sup>+</sup> esprimono differenti livelli di PD-1, mentre sono assenti nella biopsia (LN non metastatico) non coinvolta dalla malattia dello stesso paziente.



**Figura 2. Analisi citofluorimetrica dell'infiltrato linfocitario presente nelle biopsie di MM dei pazienti SPM 10, 7 e 21 e 28. Pannello (A), Dot-plots CD3 vs CD56 che identificano i linfociti NK (popolazione CD3-CD56<sup>+</sup>) e le cellule T (CD3<sup>+</sup>). Pannello (B) Percentuali dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> all'interno della popolazione T CD3<sup>+</sup>. Pannelli (C e D) Espressione del recettore PD-1 nelle popolazioni T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, rispettivamente. Il recettore PD-1 è espresso a diversi gradi di intensità (elevata/high, intermedia/low, negativa/neg). Pannello (E) espressione di PD-1 nella popolazione NK. I numeri all'interno dei differenti dot-plots (Pannelli A-E) si riferiscono alla % delle cellule positive per i marcatori indicati.**

#### **4.1.2 Il differente livello di espressione del PD-1 sui linfociti T CD8<sup>+</sup> infiltranti (CD8<sup>+</sup>TILs) identifica diverse sottopopolazioni caratterizzate da un differente profilo fenotipico**

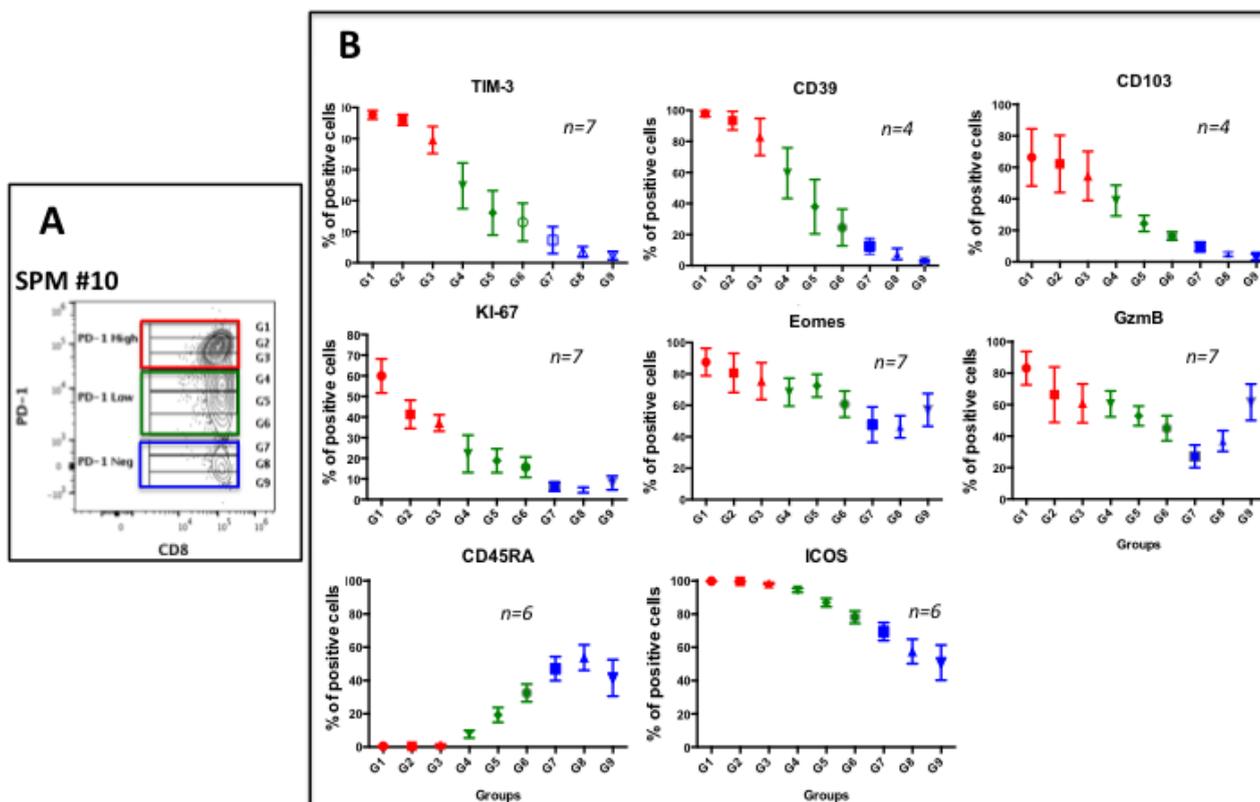
Abbiamo analizzato più in dettaglio le caratteristiche fenotipiche dei linfociti T CD8<sup>+</sup> (PD-1 neg/low/high) presenti nelle biopsie tumorali. In primo luogo, seguendo il protocollo di analisi proposto da Thommen DS e collaboratori<sup>61</sup> abbiamo valutato se i

differenti livelli di espressione del marcatore PD-1 possano essere utilizzati per identificare CD8<sup>+</sup> TILs che differiscono fenotipicamente nell'espressione di altri recettori inibitori, di proteine contenute nei granuli citotossici, e di fattori di trascrizione che determinano il profilo funzionale delle cellule.

Abbiamo focalizzato la nostra analisi sui seguenti marcatori:

- Tim-3 (recettore inibitorio dei IC i cui ligandi noti sono Galectina 9, HMGB1 e CEACAM1)
- CD39 (un ectoenzima che con CD73 è implicato nella produzione locale di adenosina portando così ad un ambiente immunosoppressivo e un marcatore "putativo" di "esaurimento funzionale" delle cellule T)<sup>82</sup>
- CD103 (un marker che identifica le cellule T residenti nel tessuto / cellule T reattive residenti nel tumore)
- GzmB (enzima presente nei granuli dei linfociti T citotossici)
- Eomes (un fattore di trascrizione associato con l'"*exhaustion*" dei linfociti T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>).
- Ki-67 (un marcatore nucleare di proliferazione)
- ICOS (una molecola costimolatoria presente sui linfociti T attivati)
- CD45RA (un'isoforma della fosfatasi CD45 che identifica i linfociti T naïve)

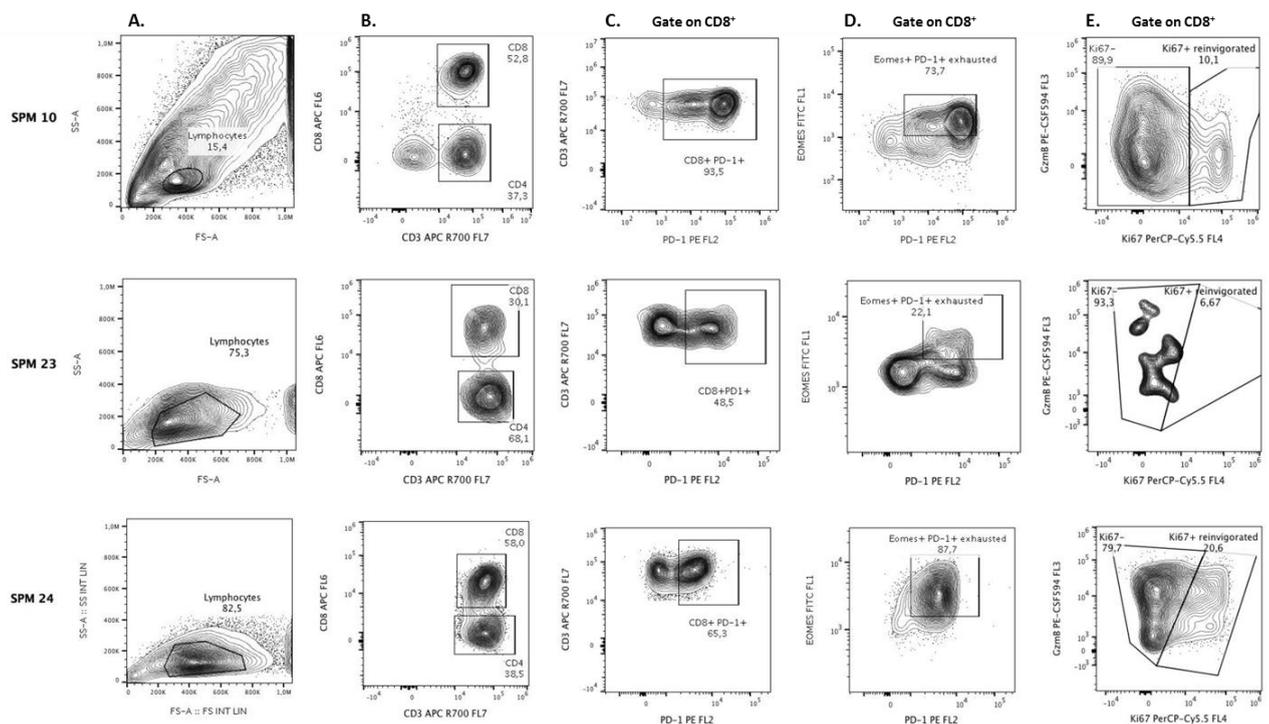
In particolare, come mostrato in **Figura 3 pannello A** abbiamo determinato l'espressione dei suddetti marcatori in nove sottopopolazioni di CD8<sup>+</sup> TILs suddivise in base al livello di espressione (intensità media di fluorescenza, mean fluorescence intensity, MFI) del PD-1 che è più intenso nel "gruppo 1" (G1) e meno intenso nel "gruppo 9" (G9). I risultati ottenuti sono mostrati in **Figura 3 pannello B**.



**Figura 3. Correlazione tra l'espressione di alcuni recettori e I livelli di espressione di PD-1 su CD8<sup>+</sup> TILs.** Nel **pannello A** è mostrata la strategia di gating delle sottopopolazioni CD8<sup>+</sup> TIL in relazione all'espressione di PD-1 (MFI) per l'analisi dei differenti sottogruppi (da G1 a G9). Nel **pannello B** è mostrata la co-espressione di alcuni marcatori sulle sottopopolazioni CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> in differenti MM biopsie

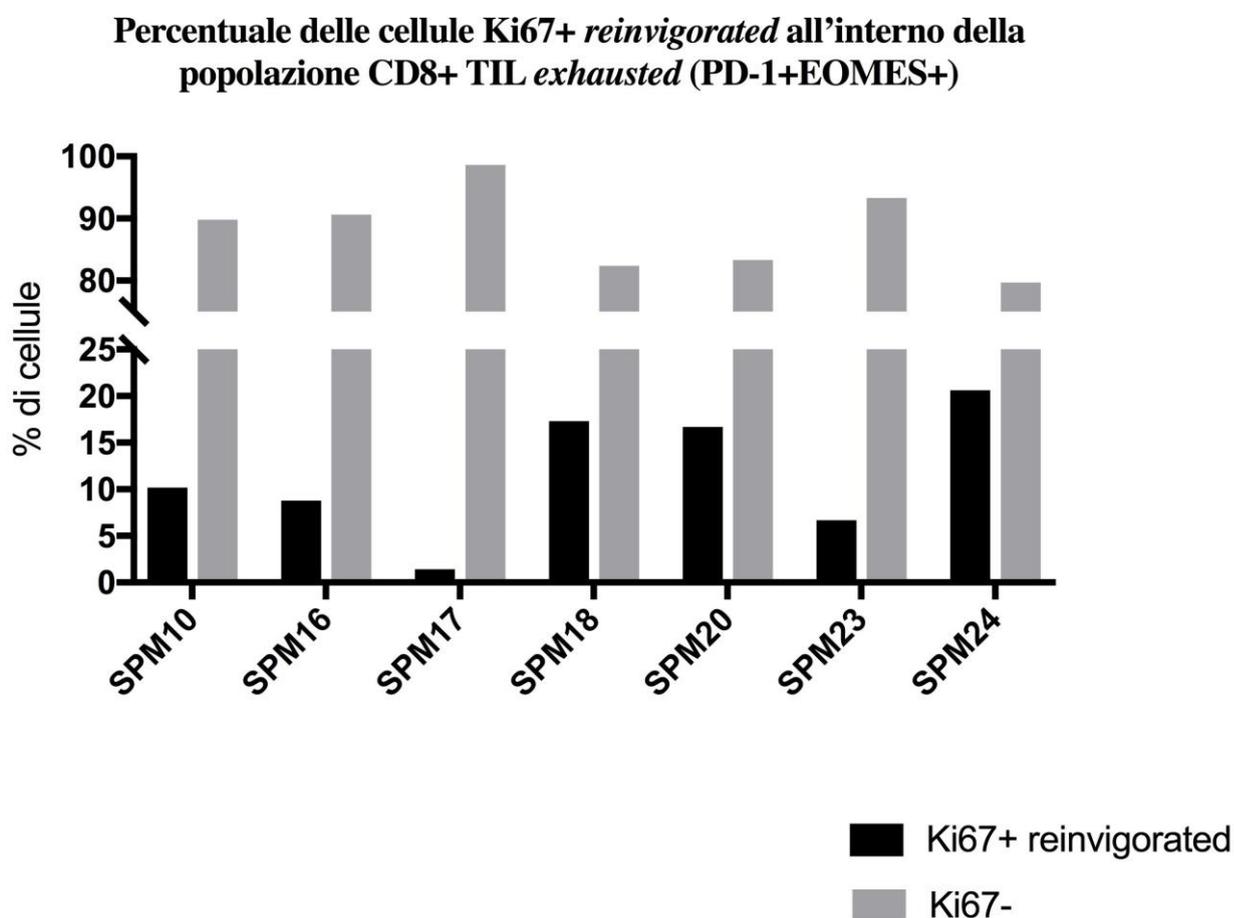
I risultati mostrano chiaramente che i livelli di espressione di PD-1 identificano sottogruppi CD8<sup>+</sup> TIL con fenotipo distinto. In particolare, Tim-3, CD39, CD103 e Ki-67 sono espressi con maggiore frequenza nei linfociti CD8<sup>+</sup> che esprimono alti livelli di PD-1, mentre Eomes e GzmB sono espressi anche in sottogruppi di cellule T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>low</sup> e PD-1<sup>neg</sup>. La co-espressione di CD103 e CD39 da parte delle cellule CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> potrebbe suggerire che questo sottoinsieme di cellule potrebbe essere quello che è effettivamente stato in contatto diretto con il tumore come dimostrato nel recente lavoro di Duhon et al.<sup>84</sup>. Inoltre, l'alta espressione del marcatore di proliferazione Ki-67 da parte delle cellule CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> supporta l'ipotesi che queste cellule proliferino nel microambiente tumorale. È anche interessante notare che cellule CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> sono T-cell memory (in quanto CD45RA negative).

Dal momento che la co-espressione del recettore PD-1 e del fattore di trascrizione Eomes sono considerati marker di *exhaustion*<sup>61,83</sup>, abbiamo quindi esaminato se all'interno della popolazione Tex (CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Eomes<sup>+</sup>) fossero presenti cellule con capacità proliferativa (Ki67<sup>+</sup>) e quindi cellule potenzialmente *reinvigorated*. L'analisi è stata condotta sugli infiltrati linfocitari isolati dai campioni biotici derivati dai pazienti SPM 10, 16, 17, 18, 20, 23 e 24. In **Figura 4** sono mostrati in dettaglio le analisi citofluorimetriche dei CD8<sup>+</sup> TILs isolati dalle biopsie ottenute da pazienti 10, 23 e 24. La “*gating strategy*” adottata per le analisi citofluorimetriche è stata la seguente: un primo gate (**panello A**) è stato eseguito sui linfociti identificati attraverso parametri fisici (FS-A vs SS-A). Nei **panelli B** sono mostrati i dot-plots (CD3 vs CD8) attraverso i quali possono essere identificate le cellule T CD8. Nei **panelli C** sono mostrati i dot-plots (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> vs PD-1) attraverso i quali sono state selezionate le cellule T CD8<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> infiltranti le differenti biopsie. Nei **panelli D** sono mostrati i dot-plots (PD-1 vs Eomes) attraverso i quali sono state selezionate per la successiva analisi le cellule Tex (CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Eomes<sup>+</sup>). Nei **panelli E** sono evidenziate le sottopopolazioni CD8<sup>+</sup> Tex Ki67<sup>+</sup> o Ki67<sup>-</sup>.



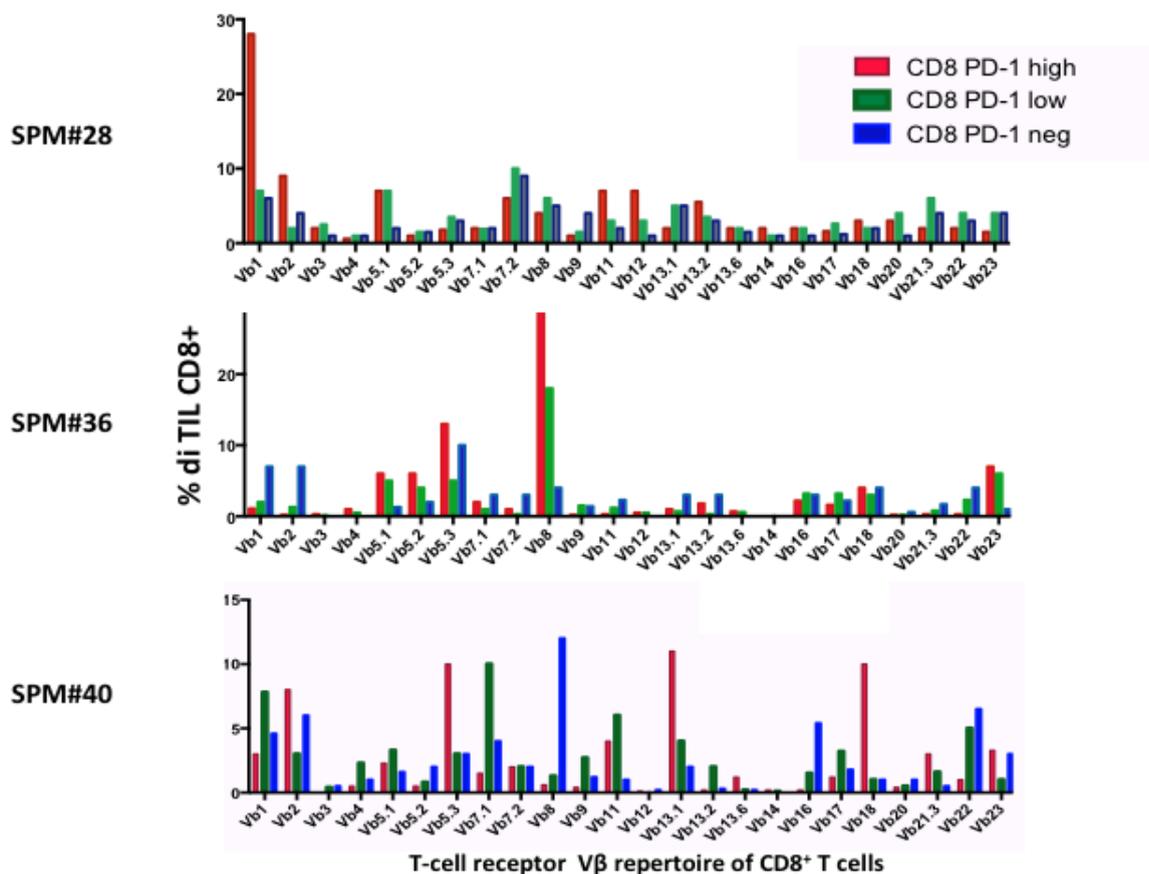
**Figura 4. Analisi citofluorimetrica dell’infiltrato linfocitario T “exhausted” Ki67<sup>+</sup> di SPM 10, 23 e 24. Pannello A)** Strategia di gating per individuare la popolazione linfocitaria fra le cellule CD45<sup>+</sup>. **Pannello B)** Gate sulla popolazione CD3<sup>+</sup> e individuazione dei linfociti T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. **Pannello C)** Strategia di gating per individuare i linfociti T CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>. **Pannello D)**, Strategia di gating per individuare la popolazione CD8<sup>+</sup> T exhausted (Eomes<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>). **Pannello E)**, Strategia di gating per individuare la popolazione reinvigorated/proliferante (Ki67<sup>+</sup>) all’interno di quella Tex (exhausted). I numeri all’interno dei differenti dot-plots (**panelli B-E**) si riferiscono alla percentuale delle cellule positive per i marcatori indicati.

Come mostrato in **Figura 5**, la maggior parte delle cellule CD8<sup>+</sup> Tex non esprime il marcatore di proliferazione Ki67 (l'88,2% sono Ki67<sup>-</sup>, SD= 6,36; mediana= 90), mentre le cellule Ki67<sup>+</sup> (proliferanti “*reinvigorated*”) sono in media l'11,6% (SD=6,43; mediana= 10). Si considerano pertanto ad elevato contenuto di cellule T CD8<sup>+</sup> *reinvigorated* quegli infiltrati che mostrano una percentuale di Ki67<sup>+</sup> al di sopra della mediana (10%). Questi dati sono in accordo con le recenti evidenze<sup>61</sup> ottenute analizzando i CD8<sup>+</sup> TILs presenti nei tumori polmonari (NSCLC), e suggeriscono che le popolazioni Tex PD-1 high (presenti ad esempio nelle biopsie dei pazienti SPM10 e SPM20) sono in grado di esprimere il marcatore Ki67<sup>+</sup> mantenendo quindi potenzialmente la capacità di proliferare nel sito tumorale.



**Figura 5.** Percentuale delle cellule Ki67<sup>+</sup> (*reinvigorated*) all'interno della popolazione CD8<sup>+</sup> TIL *exhausted* (PD-1<sup>+</sup>EOMES<sup>+</sup>). Si considerano gli infiltrati ad elevato contenuto di cellule reinvigorated quelli con percentuale maggiore del 10% (mediana).

Inoltre abbiamo analizzato il repertorio TCR V $\beta$  delle cellule T CD8<sup>+</sup> (PD1 high, low e neg) presenti nelle biopsie di MM. Nella **Figura 6** sono mostrati i risultati ottenuti da 3 diversi pazienti. Le cellule T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> presentano espansioni V $\beta$  rilevabili (in particolare TCRV $\beta$ 1 in SPM28, V $\beta$ 8 in SPM36 e V $\beta$ 5.3, 13.1 e 18 in SPM40) diverse da quelle osservate nelle cellule T CD8<sup>+</sup> PD-1 low/neg.

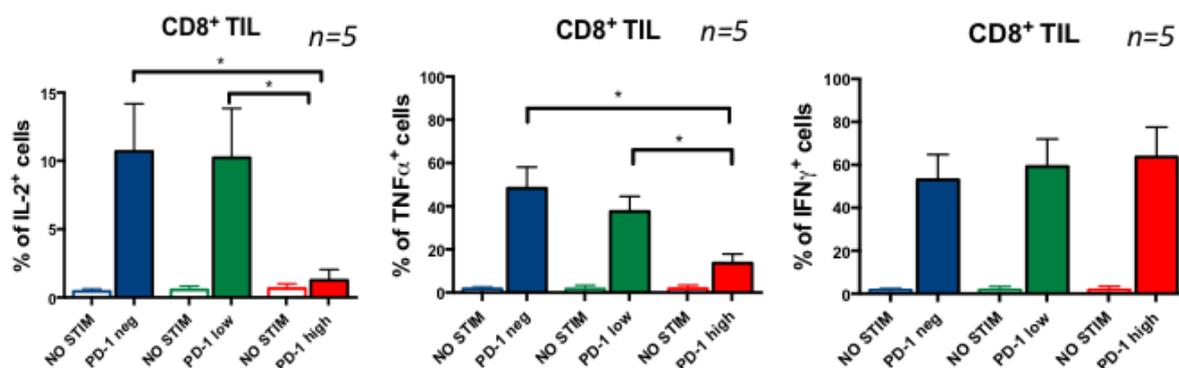


**Figura 6.** Repertorio del TCR V $\beta$  nelle sottopopolazioni CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (high, low e neg) presenti in 3 differenti biopsie (SPM 28, 36 e 40).

#### 4.1.3 Correlazione tra il livello di espressione di PD-1 e le capacità effettrici dei linfociti CD8<sup>+</sup>

Un recente studio<sup>61</sup> ha dimostrato che esiste una correlazione inversa tra le funzioni effettrici delle cellule T e i livelli di espressione del recettore PD-1. Per analizzare se le funzioni effettrici delle cellule CD8<sup>+</sup> TILs sono perse gradualmente durante il loro esaurimento funzionale e sono quindi correlate ai livelli di espressione del recettore PD-1 abbiamo valutato la capacità dei linfociti CD8<sup>+</sup> TILs (PD-1 high/low/neg) di rilasciare citochine effettrici (quali IL-2, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ).

In particolare, le cellule CD8<sup>+</sup> TIL presenti nelle biopsie derivate da 5 pazienti (n=5) sono state testate per la loro capacità di produrre citochine effettrici (quali IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) dopo stimolazione policlonale *in vitro*. I dati ottenuti mediante analisi citofluorimetrica multiparametrica sono mostrati in **Figura 7**.



**Figura 7.** Produzione di citochine effettrici (IL2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) da parte dei differenti subsets T CD8<sup>+</sup> caratterizzati da una differente espressione del marcatore PD-1. La significatività statistica è stata valutata utilizzando il Student's t test. P<0.05(\*). Le linee rappresentano la SEM.

I dati ottenuti suggeriscono che, dopo stimolazione policlonale, le sottopopolazioni di CD8<sup>+</sup> PD-1neg e PD-1low sono in grado di esprimere IL-2, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Al contrario, le cellule T CD8<sup>+</sup> PD-1high non esprimono nè IL-2 nè TNF $\alpha$ , mentre hanno la capacità di esprimere IFN $\gamma$ .

Collettivamente i nostri dati suggeriscono che dopo stimolazione: i) cellule T PD-1<sup>neg</sup> e PD-1<sup>low</sup> esprimono tutte le citochine effettrici; ii) Le cellule T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup>, a differenza dei subsets PD-1<sup>low/neg</sup>, non hanno la capacità di esprimere nè IL-2 nè TNF $\alpha$ , mentre mantengono la capacità di esprimere IFN $\gamma$ .

## 4.2 Analisi delle varianti geniche a singolo nucleotide di PD-1 e PD-L1

La **Tabella 2** riporta la caratterizzazione genotipica di 8 SNV di PD-1 e PD-L1 in 23 pazienti SEQPERMEL e mostra i genotipi omozigoti *wild type*, eterozigoti ed omozigoti portatori della variante allelica (da ora in poi genotipi “mutati”) dei vari SNV dei pazienti

SEQPERMEL. Si può osservare che i genotipi “mutati” (in rosso) sono presenti sia in omozigosi che in eterozigosi per i vari SNV ma soprattutto per alcuni SNV suggerendone una possibile influenza in questi pazienti.

Patient SPM Code	PD1.3 G>A	PD1.5 C>T	PD1.6 G>A	PD1.7 T>C	PD1.10 C>G	PD-L1 8293 C>A	PD-L1 rs2297136 C>T	PD-L1 rs4143815 G>C
SPM1	GG	CC	GG	TC	CC	CC	CT	GG
SPM2	GG	TT	GG	TT	CC	CA	TT	GG
SPM7	GG	CT	GG	TT	CC	CC	CT	GG
SPM8	GG	CC	GG	TC	CC	CC	CT	GG
SPM10	GG	CT	GG	TC	CG	CC	CC	GG
SPM11	GG	CC	GG	TT	CC	CA	TT	GG
SPM13	GG	CC	GG	CC	CG	CC	CT	GG
SPM14	GG	CT	GA	TT	CC	CA	TT	GG
SPM15	GG	CC	GG	TC	CC	CC	CC	GC
SPM17	GG	TT	GA	TT	CC	CA	TT	GG
SPM18	GA	CC	GG	CC	CC	CC	TT	GG
SPM19	GG	CT	GG	TT	CC	CC	TT	GC
SPM20	GG	CC	GG	TC	CC	CC	CT	GC
SPM21	GG	TT	GG	TT	CC	CA	TT	CC
SPM22	GA	CT	GG	TC	CC	CA	CT	GG
SPM23	GG	CC	GG	TT	CC	CA	TT	GC
SPM24	GG	CT	GA	TT	CC	CC	TT	GG
SPM26	GG	TT	GA	TT	CC	CC	CC	GG
SPM30	GG	CC	GG	TC	CG	CC	TT	CC
SPM34	GG	CC	GG	CC	CC	CA	TT	GG
SPM36	GG	CT	GG	TT	CC	CA	CT	GG
SPM38	GA	CT	GG	TC	CC	CC	CT	GC
SPM39	GA	CC	GG	CC	CC	CA	CT	GG

**Tabella 2.** Caratterizzazione genotipica di 8 SNV in 23 pazienti. Le varianti geniche sono segnalate in rosso. Analisi effettuata mediante pirosequenziamento e LightSNiP.

**La distribuzione genotipica degli SNV di PD-L1 8293C>A e PD-L1G>C rs4143815 si discosta da quella dei soggetti sani.**

La distribuzione dei genotipi di PD-1 e PD-L1 è stata confrontata con quella di soggetti sani di controllo (database 1000Genome) per valutarne un possibile ruolo nella suscettibilità al melanoma (Tabella 3) come riportato in altri tumori<sup>85</sup>

Genotipi	Pazienti SEQPERMEL (n=23)	CTR sani (n=503)	P-value
<b>PD1.3 G&gt;A</b>			
G/G	19 (82.6)	391 (77.7)	0.723
G/A	4 (17.4)	101 (20.1)	
A/A	0 (0)	11 (2.2)	
<b>PD1.5 C&gt;T</b>			
C/C	11 (47.8)	189 (37.6)	0.581
C/T	8 (34.8)	224 (44.5)	
T/T	4 (17.4)	90 (17.9)	
<b>PD1.6 G&gt;A</b>			
G/G	19 (82.6)	396 (78.7)	0.763
G/A	4 (17.4)	97 (19.3)	
A/A	0 (0)	10 (2.0)	
<b>PD1.7 T&gt;C</b>			
T/T	11 (47.8)	215 (42.7)	0.646
T/C	8 (34.8)	222 (44.1)	
C/C	4 (17.4)	66 (13.2)	
<b>PD1.10 C&gt;G</b>			
C/C	20 (87.0)	459 (91.3)	
C/G	3 (13.0)	42 (8.3)	
G/G	0 (0)	2 (0.4)	
<b>PD-L1 C&gt;A 8293</b>			
C/C	13 (56.5)	407 (80.9)	0.007
C/A	10 (43.5)	88 (17.5)	
A/A	0 (0)	8 (1.6)	
<b>PD-L1 C&gt;T rs2297136</b>			
C/C	3 (13.1)	108 (21.5)	0.212
C/T	9 (39.1)	240 (47.7)	
T/T	11 (47.8)	155 (30.8)	
<b>PD-L1 G&gt;C rs4143815</b>			
G/G	16 (69.6)	230 (45.7)	0.077
G/C	5 (21.7)	214 (42.5)	
C/C	2 (8.7)	59 (11.7)	

**Tabella 3.** Distribuzione delle frequenze genotipiche degli SNV di PD-1 e PD-L1 nei pazienti e in soggetti sani di controllo.

In primo luogo, abbiamo osservato che le frequenze genotipiche dei pazienti sono simili a quelle dei soggetti sani di controllo per tutti gli SNV tranne per l'SNV PD-L1C>A 8293 che mostra differenze significative (P value=0.007) e per l'SNV PD-L1G>C rs4143815 che mostra una tendenza verso possibili variazioni (P value= 0.077).

Questi dati, anche se andranno confermati in un gruppo di pazienti più numeroso, potrebbero indicare un ruolo potenziale degli SNV di PD-L1C>A 8293 e PD-L1G>C rs4143815 nel rischio di sviluppare melanoma, probabilmente legato ad un loro effetto sulla risposta immune dell'ospite.

In secondo luogo, abbiamo osservato che le frequenze genotipiche degli SNV dei pazienti rispettano l'equilibrio di Hardy-Weinberg, ovvero le frequenze osservate non si discostano significativamente da quelle attese sulla base delle frequenze alleliche nella popolazione.

#### **Correlazione tra gli SNV PD1.5C>T e PD-L1C>T rs2297136 con l'infiltrato linfocitario delle biopsie tumorali.**

Abbiamo quindi valutato il possibile ruolo degli SNV sull'infiltrato linfocitario delle biopsie tumorali. In particolare, su: (i) la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> non esprimenti PD-1 (PD-1 *neg*) o esprimenti vari livelli di PD-1 (PD-1 *low* e PD-1 *high*); (ii) l'intensità di espressione di PD-1 sui linfociti T CD8<sup>+</sup> (*low* e *high*) (**Tabella 4**).

SNV	Percentuale di cellule T CD8 <sup>+</sup>			Espressione di PD-1 (MSI)	
	PD-1 neg	PD-1 low	PD-1 high	PD-1 low	PD-1 high
<b>PD1.5 C&gt;T</b> <i>Genotipo</i>					
T- (C/C) wild type	24.7	63.7	13.8	9.4	63.0
T+ (C/T+T/T) mutato	24.6	51.2	24.0	7.2	87.2
<b>PD-L1 C&gt;T</b> <b>rs2297136</b> <i>Genotipo</i>					
T- (C/C) wild type	17.1	59.8	23.0	14.6	105.5
T+ (C/T+T/T) mutato	25.8	56.4	18.5	7.3	69.7

**Tabella 4.** Correlazione degli SNV PD1.5 e PD-L1 rs2297136 con la percentuale di linfociti T CD8 infiltranti il melanoma e l'intensità di espressione di PD-1 valutata come mean stain index (MSI).

La correlazione degli SNV con l'infiltrato è stata eseguita sui 23 pazienti SEQPERMEL tipizzati ed ha evidenziato una possibile influenza degli SNV PD1.5 e PD-L1 rs2297136 sui linfociti T CD8 esprimenti vari livelli di PD-1, sia come percentuale di cellule infiltranti che come intensità di espressione di PD-1.

Infatti, per quanto riguarda l'SNV PD1.5, abbiamo osservato che il genotipo mutato T<sup>+</sup> (C/T<sup>+</sup>T/T), confrontato con il genotipo T<sup>-</sup> (C/C), diminuisce la percentuale media dei linfociti T CD8<sup>+</sup> PD-1 *low* (51.2 vs 63.7) ed aumenta quella dei CD8<sup>+</sup> *high* (24.0 vs 13.8). Inoltre, a tale aumento corrisponde un aumento dell'intensità di espressione media di PD-1 *high* (87.2 vs 63.0).

Per quanto riguarda l'SNV PD-L1 rs2297136, abbiamo osservato che il genotipo mutato T<sup>+</sup> (C/T<sup>+</sup>T/T), confrontato con il genotipo T<sup>-</sup> (C/C), aumenta la percentuale media dei linfociti CD8<sup>+</sup> PD-1 *neg* (25.8 vs 17.1) mentre diminuisce quella dei CD8<sup>+</sup> PD-1 *high* (18.5 vs 23.0). A tale diminuzione corrisponde una diminuzione dell'intensità di espressione media di PD-1 soprattutto *high* (69.7 vs 105.5).

#### **4.3 Analisi dei dati clinici**

Sono riportati nelle tabelle che seguono i dati clinici riferiti a una casistica di 48 pazienti affetti da melanoma avanzato (stadio IV) trattati con targeted therapy e/o anticorpi inibitori i checkpoint immunologici, seguiti dall'ottobre 2015 al novembre 2019 nel quadro dello studio osservazionale SEQPERMEL. La **Tabella 5** mostra risposte obiettive, sopravvivenza libera da progressione (PFS) relative alla prima linea di trattamento, e la sopravvivenza globale (OS).

SPM	First line	C1 (time)	OR	PD (time)	PFS	OS
1	BRAF + MEKi	24/08/2016	PD	07/04/2017	7.5	9.1
2	BRAF + MEKi	18/07/2016	PD	31/03/2017	8.2	12.3
3	BRAF + MEKi	27/04/2017	PD	28/07/2017	3.1	11.5
4	Anti CTLA-4	16/11/2015	PD	03/02/2016	2.6	19.2
5	Anti PD1	16/10/2015	SD	14/09/2017	23.3	55+
6	/	/	/	/	/	/
7	Anti PD1	09/11/2016	PR	/	37.2 +	37.2
8	BRAF + MEKi	12/05/2017	PD	12/01/2018	8.2	17.5
9	/	/	/	/	/	/
10	BRAF + MEKi	09/12/2016	PD	30/05/2017	5.7	21.5
11	BRAF + MEKi	23/03/2016	PR	/	44.9 +	44.9+
12	/	/	/	/	/	/
13	BRAF + MEKi	27/07/2017	PR	19/07/2018	11.9	14.2
14	SECOMBIT	18/08/2017	PR	28/09/2017	1.4	6.3
15	TRILOGY	14/12/2017	PR	/	24.8 +	24.8+
16	/	/	/	/	/	/
17	CL TR 252	10/01/2017	SD	/	35.2	35.2+
18	Anti PD1	04/07/2017	PD	21/12/2017	5.6	13
19	TRILOGY	08/03/2018	PD	28/06/2018	3.7	7.6
20	Anti PD1	08/05/2018	SD	15/10/2019	17.5	19.1+
21	/	/	/	/	/	/
22	Anti PD1	11/07/2017	CR	29/06/2019 +	24.1	24.1
23	COMBI – I	14/05/2018	PR	28/09/2018	4.5	7.3
24	Anti PD1	07/03/2017	SD	07/09/2018	18.3	22.8
25	/	/	/	/	/	/
26	TRILOGY	09/05/2017	RP	03/09/2018	16	21.5
27	Anti PD1	21/02/2017	SD	21/08/2018	18.2	23.7
28	/	/	/	/	/	/
29	BRAF + MEKi	24/05/2017	NA	NA	NA	30
30	Anti PD1	06/02/2018	SD	/	22.1	22.1+
31	BRAF + MEKi	16/02/2018	SD	01/03/2019 +	12.6	12.6
32	Anti PD1	11/04/2018	PD	19/02/2019	10.4	20+
33	Anti PD1	17/07/2018	RP	07/08/2019 +	12.8	12.8
34	Anti PD1	05/03/2019	PD	01/09/2019 +	6	6
35	TRICOTEL	09/04/2019	PD	24/07/2019 +	3.5	3.5
36	Anti PD1	10/04/2018	RC	/	20 +	20+
37	BRAF + MEKi	23/03/2019	RC	/	6.4 +	6.4+
38	Anti PD1	03/08/2018	RP	/	16.2 +	16.2+
39	Anti PD1	27/01/2016	RP	25/09/2018	32.4	46.8+
40	BRAF + MEKi	11/06/2018	RP	/	17.9+	17.9+
41	Anti PD1	16/07/2019	PD	15/08/2019	1	1
42	BRAF + MEKi	13/11/2017	PD	09/07/2019	20.1	24.9+
43	/	/	/	/	/	/
44	Anti PD1	11/07/2017	RP	/	29.1+	29.1+
45	Anti PD1	20/09/2019	PD	05/11/2019	1.5	2.4+
46	Anti PD1	18/09/2019	RP	/	2.5 +	2.5+
47	Anti PD1	/	/	/	/	/
48	BRAF + MEKi	22/10/2019	RP		1.3 +	1.3+

**Tabella 5.** Dati clinici osservati in risposta alla prima linea di trattamento, relativi a 48 pazienti SEQPERMEL.

## 5. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni sono state introdotte terapie immunologiche innovative che prevedono l'utilizzo di anticorpi bloccanti l'asse PD-1/PD-L1 (ICI) che hanno riportato notevoli successi nel trattamento di diverse forme di tumori solidi, incluso il melanoma. Tuttavia, permane un'elevata quota di pazienti che non risponde a questo tipo di trattamento e i meccanismi molecolari sottesi la mancata risposta rimangono ancora poco chiari.

### 5.1 Analisi dell'infiltrato linfocitario

I dati ottenuti da questo studio evidenziano che all'interno dei MM (in linea con i recenti studi condotti sul NSCLC<sup>61</sup>) sono presenti cellule T CD8<sup>+</sup> caratterizzate da una differente espressione in superficie del recettore PD-1 (PD-1 high, PD-1 low, PD-1 neg). Abbiamo quindi condotto un'analisi sulle proprietà di queste differenti sottopopolazioni intratumorali CD8<sup>+</sup> TILs con livelli definiti di PD-1 valutando se i differenti livelli di espressione del recettore PD-1 potessero correlare con differenti "stadi" cellulari "disfunzionali".

I risultati mostrano chiaramente che i livelli di espressione di PD-1 identificano sottogruppi CD8<sup>+</sup> TIL con fenotipo e funzioni distinte. In particolare, all'interno del tumore i linfociti T CD8<sup>+</sup> PD1 high sono cellule caratterizzate fenotipicamente dall'over-espressione di altri recettori inibitori, quali TIM-3 suggerendo che le cellule T CD8<sup>+</sup> PD-1 high nel sito tumorale possano essere "bloccate" nella loro azione non solo dal PD-1, ma anche da Tim-3 e quindi potrebbero non "beneficiare" della terapia (con anti-PD-1) in quando "frenate" nella loro azione anche dal recettore inibitorio Tim-3.

I marcatori CD39, CD103 e Ki-67 sono espressi con maggiore frequenza nei linfociti CD8<sup>+</sup> che esprimono alti livelli di PD-1, mentre Eomes e GzmB sono espressi anche in sottogruppi di cellule T CD8<sup>+</sup> PD-1 low e PD-1 neg. Collettivamente questi risultati suggeriscono che: *i*) Le cellule T CD8 PD-1high hanno delle caratteristiche fenotipiche tipiche delle Tex definite dall'espressione di TIM-3, CD39 ed Eomes.; *ii*) la sottopopolazione di cellule T CD8<sup>+</sup> PD-1 high potrebbe essere arricchita in cellule reattive contro tumore come suggerito dalla co-espressione di entrambe le molecole CD39 e CD103<sup>84, 86</sup>; *iii*) Le cellule CD8<sup>+</sup> PD-1 high proliferano nel tumore e sono potenzialmente dotate di un alto potenziale citotossico, dimostrato dall'alta frequenza di le cellule Ki67<sup>+</sup> e Granzyme B<sup>+</sup>.

La molecola CD39, è un'ectonucleotidasi che metabolizza l'ATP. Questo enzima che può proteggere le cellule CD8<sup>+</sup> PD1 high dalla morte cellulare indotta dall'ATP nel microambiente tumorale,

tipicamente ricco di ATP<sup>87</sup>. Inoltre, come già discusso, dal momento che, recentemente, le cellule CD8<sup>+</sup> CD39<sup>+</sup> sono state descritte essere arricchite in CTL tumore-specifici<sup>84, 86</sup>, l'espressione del CD39 da parte dei CD8<sup>+</sup> PD1 high TILs potrebbe conferire a questo subset una funzione immunitaria antitumorale altamente efficace e sostenuta. Infine, in accordo con i risultati precedenti, si può speculare che all'interno della sottopopolazione T CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> PD1 high probabilmente possono essere presenti cellule citotossiche (CTL) specifiche per TAA caratterizzate dall'espressione molecole (GzmB), fattori di trascrizione (Eomes) e molecole co-stimolatorie (ICOS) correlate alla loro capacità funzionale (e.g attività citotossica).

L'analisi preliminare dei riarrangiamenti TCR V $\beta$  eseguiti sulle cellule T CD8<sup>+</sup> infiltranti le biopsie derivate da 3 pazienti ha evidenziato che le cellule PD-1<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup> sono oligoclonali in quanto esprimono TCRV $\beta$  che sono presenti in basse % nelle popolazioni PD-1<sup>low/neg</sup> CD8<sup>+</sup>. Questo dato suggerisce che la sottopopolazione CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> caratterizzata dall'espressione di particolari V $\beta$  (differenti nei differenti pazienti) potrebbe essere stata indotta ad espandersi *in vivo* in risposta ad antigeni.

Infine, per analizzare se i differenti livelli di espressione del recettore PD-1 potessero correlare con differenti "stadi" effettori abbiamo analizzato le capacità funzionali di tali cellule. Per fare ciò, le cellule CD8<sup>+</sup> TILs con differenti livelli di PD-1 sono state testate per la loro capacità di produrre, dopo stimolazione policlonale *in vitro*, citochine effettrici (quali IL-2, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ). I dati ottenuti mostrano che mentre i CD8<sup>+</sup> TILs PD-1 low/neg, producono se stimolati sia IL-2 che IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , i linfociti T CD8<sup>+</sup> PD-1high non sono in grado di produrre IL-2 e TNF $\alpha$  pur mantenendo la loro capacità di rilasciare IFN $\gamma$ . L'interferone IFN $\gamma$  è una citochina capace non solo di favorire la risposta antitumorale CD8-mediata, incrementando l'espressione delle molecole HLA di classe I da parte del tumore ma è anche in grado di indurre sulle cellule di melanoma l'espressione di PD-L1<sup>88</sup> e dell'enzima IDO<sup>89</sup> amplificando e favorendo di fatto i meccanismi immunosoppressivi che si attuano nel sito tumorale. I nostri dati funzionali suggeriscono che i CD8<sup>+</sup> PD-1 high TILs nei MM sono una sottopopolazione cellulare che ha mantenuto alcune funzioni effettrici tipiche delle cellule T CD8<sup>+</sup> classiche (quale la produzione di IFN $\gamma$ ) ed ha acquisito caratteristiche fenotipiche peculiari (quali l'espressione del recettore inibitorio Tim-3). Saranno necessari ulteriori studi per verificare se l'attività funzionale dei linfociti CD8<sup>+</sup> PD-1 high possa essere potenziata *in vivo* mediante l'utilizzo combinato di anticorpi bloccanti sia PD-1 sia altri recettori inibitori (quali Tim-3).

I risultati del presente studio forniscono anche una base di partenza per la valutazione dei CD8<sup>+</sup> TIL caratterizzati da un differente livello di espressione di PD-1 in studi sia in fase iniziale che in fase

tardiva di nuove immunoterapie e vaccini contro il cancro per fornire una prova precoce dell'efficacia nonché potenziali biomarcatori di risposta.

Le sottopopolazioni CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> TIL possono essere isolate dai campioni di MM usando i marcatori di superficie che abbiamo identificato e potenzialmente espansi *in vitro* per screenare e testare le terapie ICB. In sintesi, il nostro studio fornisce approfondimenti molecolari sulle differenti caratteristiche fenotipiche e funzionali dei CD8<sup>+</sup> TIL caratterizzati da una differente espressione di PD-1 e quindi potrebbero aprire la strada allo sviluppo di nuovi approcci per migliorare le risposte immunitarie dei CD8<sup>+</sup> TIL nel melanoma metastatico.

## 5.2 Analisi delle varianti geniche a singolo nucleotide di PD-1 e PD-L1

Un altro obiettivo dello studio è quello di valutare la possibile relazione tra la quantità di linfociti T CD8<sup>+</sup> (PD-1 *high/low/neg*) infiltranti le biopsie e il livello di espressione di PD-1 sui CD8 con alcuni SNV di PD-1 e PD-L1. In particolare, sono stati presi in considerazione 5 SNV di PD-1 (PD1.3G>A, PD1.5C>T, PD1.6G>A, PD1.7T>C, PD1.10C>G) e 3 SNV di PD-L1 (PD-L18293C>A, PD-L1C>T rs2297136, PD-L1G>C rs4143815) che sono funzionalmente rilevanti nelle malattie autoimmuni<sup>67, 90</sup> e nei tumori<sup>62-64</sup>. È stata quindi eseguita la tipizzazione per gli 8 SNV su 23 pazienti a partire dal DNA germinale estratto dai PBMC *matched* con le biopsie. I risultati ottenuti sono spiegabili con le seguenti osservazioni:

a) Per quanto riguarda gli effetti del genotipo T<sup>+</sup> dell'SNV PD1.5C>T (aumento CD8 PD-1 *high* ed espressione PD-1), si può ipotizzare che, essendo il PD1.5C>T un SNV sinonimo (non cambia l'aminoacido), la sua azione sia dovuta al fatto di essere probabilmente in *linkage disequilibrium* con altri SNV funzionali di PD-1. Il risultato osservato è simile a quello riportato in pazienti di una coorte giapponese con diabete autoimmune in cui l'allele T aumenta la percentuale di linfociti T PD-1 positivi nei PBMC<sup>67</sup>.

b) Per quanto riguarda gli effetti del genotipo T<sup>+</sup> dell'SNV PD-L1C>T rs229713 (diminuzione CD8 PD-1 *high* ed espressione PD-1), si può ipotizzare che l'allele T leghi con minor efficienza il miR-324-5p all'mRNA di PD-L1<sup>63</sup> aumentandone l'espressione. L'upregolazione di PD-L1 sulle cellule di melanoma potrebbe indurre apoptosi dei linfociti T CD8<sup>+</sup> PD-1 *high* come riportato per altre cellule tumorali (cellule di epatocarcinoma cocoltivate con cellule T CD8<sup>+</sup>)<sup>91</sup>.

I dati mostrano come gli SNV PD-1.5C>T e PD-L1C>T rs229713 possano avere un probabile ruolo predittivo sulla densità di linfociti T CD8<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> *high* e *low* infiltranti le biopsie cutanee nei pazienti SEQPERMEL e sull'intensità di espressione di PD-1 su tali linfociti.

In conclusione, dati preliminari dello studio SEQPERMEL ottenuti, e le recenti evidenze suggeriscono che è stata adottata la strategia giusta per individuare dei marker predittivi della risposta al trattamento con terapia a bersaglio molecolare e/o anticorpi inibitori dei checkpoint immunologici. L'infiltrato linfocitario (TIL) rappresenta la fonte di riferimento per lo studio dell'attività linfocitaria tumore-specifica ed è il bersaglio principale nell'azione degli anticorpi anti-PD-1. Dall'analisi dei TIL ci aspettiamo di raggiungere uno scenario futuro dove la terapia del melanoma avanzato sia sempre più personalizzata e adattabile nel tempo su una base di dati biologici predittivi. L'analisi degli SNV di PD-1 e PD-L1 può inoltre rappresentare un valido strumento in tal senso, come suggeriscono alcune evidenze significative per quanto riguarda alcuni SNV di CTLA-4.

## BIBLIOGRAFIA

1. Global Cancer Observatory. <http://gco.iarc.fr/>.
2. Gershenwald, J. E. & Guy, G. P. Stemming the Rising Incidence of Melanoma: Calling Prevention to Action. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **108**, (2016).
3. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. <https://monographs.iarc.fr/>.
4. Wu, S. *et al.* History of Severe Sunburn and Risk of Skin Cancer Among Women and Men in 2 Prospective Cohort Studies. *Am. J. Epidemiol.* **183**, 824–833 (2016).
5. Ghiasvand, R. *et al.* Indoor Tanning and Melanoma Risk: Long-Term Evidence From a Prospective Population-Based Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* **185**, 147–156 (2017).
6. Patel, R. V., Clark, L. N., Lebwohl, M. & Weinberg, J. M. Treatments for psoriasis and the risk of malignancy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **60**, 1001–1017 (2009).
7. Goldstein, A. M. & Tucker, M. A. Dysplastic Nevi and Melanoma. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **22**, 528–532 (2013).
8. Melanoma Skin Cancer Statistics. <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>.
9. Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R. & Alaibac, M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *Vivo Athens Greece* **28**, 1005–1011 (2014).
10. Rizvi, S. M. H. *et al.* Long-term Change in the Risk of Skin Cancer After Organ Transplantation: A Population-Based Nationwide Cohort Study. *JAMA Dermatol.* **153**, 1270–1277 (2017).
11. Yanik, E. L. *et al.* Brief Report: Cutaneous Melanoma Risk Among People With HIV in the United States and Canada. *J Acquir Immune Defic Syndr* 499–504 (2018).
12. Peters, G. Tumor suppression for ARFicionados: the relative contributions of p16INK4a and p14ARF in melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 757–759 (2008).
13. Johnson, D. B. & Sosman, J. A. Therapeutic Advances and Treatment Options in Metastatic Melanoma. *JAMA Oncol.* **1**, 380–386 (2015).

14. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279–3290 (2007).
15. Gaestel, M. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 120–30 (2006).
16. Kwong, L. & Chin, L. The brothers RAF. *Cell* **140**, 180–2 (2010).
17. Ibrahim, N. & Haluska, F. G. Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **4**, 551–579 (2009).
18. Curtin, J., Busam, K., Pinkel, D. & Bastian, B. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 4340–6 (2006).
19. Clark, W. H. *et al.* A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* **15**, 1147–1165 (1984).
20. Melanoma - Pathology - Orthobullets. (<https://www.orthobullets.com/pathology/6093/melanoma>).
21. Breslow, A. Prognosis in cutaneous melanoma: tumor thickness as a guide to treatment. *Pathol. Annu.* **15**, 1–22 (1980).
22. Duff, C., Melsom, D., Rigby, H. S., Kenealy, J. M. & Townsend, P. L. A 6 year prospective analysis of the diagnosis of malignant melanoma in a pigmented-lesion clinic: Even the experts miss malignant melanomas, but not often. *Br. J. Plast. Surg.* **54**, 317–21 (2001).
23. Grob, J. J. & Bonerandi, J. J. The 'ugly duckling' sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening. *Arch. Dermatol.* **134**, 103–104 (1998).
24. Kalkhoran, S. *et al.* Historical, Clinical, and Dermoscopic Characteristics of Thin Nodular Melanoma. *Arch. Dermatol.* **146**, 311–8 (2010).
25. Salerni, G. *et al.* Meta-analysis of digital dermoscopy follow-up of melanocytic skin lesions: A study on behalf of the International Dermoscopy Society. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **27**, (2012).
26. Guitera, P. *et al.* In Vivo Confocal Microscopy for Diagnosis of Melanoma and Basal Cell Carcinoma Using a Two-Step Method: Analysis of 710 Consecutive Clinically Equivocal Cases. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2386–2394 (2012).

27. Gershenwald, J. E. *et al.* Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 472–492 (2017).
28. (PDF) Model Predicting Survival in Stage I Melanoma Based on Tumor Progression. [https://www.researchgate.net/publication/20563381\\_Model\\_Predicting\\_Survival\\_in\\_Stage\\_I\\_Melanoma\\_Based\\_on\\_Tumor\\_Progression](https://www.researchgate.net/publication/20563381_Model_Predicting_Survival_in_Stage_I_Melanoma_Based_on_Tumor_Progression).
29. Rousseau, D. & Gershenwald, J. The new staging system for cutaneous melanoma in the era of lymphatic mapping. *Semin. Oncol.* **31**, 415–25 (2004).
30. Chapman, P. B. *et al.* Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, 2581–2587 (2017).
31. Hauschild, A. *et al.* Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **380**, 358–365 (2012).
32. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6491081/>.
33. Tsai, J. *et al.* Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3041–3046 (2008).
34. Solit, D. B. *et al.* BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* **439**, 358–362 (2006).
35. Flaherty, K. T. *et al.* Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **367**, 107–114 (2012).
36. Dummer, R. *et al.* Results of NEMO: A phase III trial of binimetinib (BINI) vs dacarbazine (DTIC) in NRAS-mutant cutaneous melanoma. *ASCO Meet. Abstr.* **34**, (2016).
37. King, A. J. *et al.* Dabrafenib; Preclinical Characterization, Increased Efficacy when Combined with Trametinib, while BRAF/MEK Tool Combination Reduced Skin Lesions. *PLoS ONE* **8**, (2013).
38. Long, G. V. *et al.* Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1877–1888 (2014).
39. Long, G. V. *et al.* Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **386**, 444–451 (2015).

40. Flaherty, K. *et al.* Genomic analysis and 3-y efficacy and safety update of COMBI-d: A phase 3 study of dabrafenib (D) + trametinib (T) vs D monotherapy in patients (pts) with unresectable or metastatic BRAF V600E/K-mutant cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* **34**, 9502–9502 (2016).
41. Robert, C. *et al.* Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N. Engl. J. Med.* **372**, 30–39 (2015).
42. Robert, C. *et al.* Three-year estimate of overall survival in COMBI-v, a randomized phase 3 study evaluating first-line dabrafenib (D) + trametinib (T) in patients (pts) with unresectable or metastatic BRAF V600E/K-mutant cutaneous melanoma. *Ann. Oncol.* **27**, (2016).
43. Robert, C. *et al.* Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **381**, 626–636 (2019).
44. Larkin, J. *et al.* Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1867–1876 (2014).
45. Dummer, R. *et al.* Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **19**, 603–615 (2018).
46. CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=CTLA-4%3A+a+key+regulatory+point+in+the+control+of+autoimmune+disease.+Immunol+Rev+223%2C+143-155>.
47. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
48. Hodi, F. S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
49. Robert, C. *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2517–2526 (2011).
50. Schadendorf, D. *et al.* Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 1889–1894 (2015).
51. Robert, C. *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* **372**, 320–330 (2015).

52. Schachter, J. *et al.* Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet Lond. Engl.* **390**, 1853–1862 (2017).
53. Hodi, F. S. *et al.* Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **19**, 1480–1492 (2018).
54. Long, G. V. *et al.* Standard-dose pembrolizumab in combination with reduced-dose ipilimumab for patients with advanced melanoma (KEYNOTE-029): an open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* **18**, 1202–1210 (2017).
55. Jenkins, R. W., Barbie, D. A. & Flaherty, K. T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br. J. Cancer* **118**, 9–16 (2018).
56. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
57. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 69–74 (2015).
58. Rizvi, N. A. *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124–128 (2015).
59. Hashimoto, M. *et al.* CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. *Annu. Rev. Med.* **69**, 301–318 (2018).
60. Wei, S. C. *et al.* Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* **170**, 1120-1133.e17 (2017).
61. Thommen, D. S. *et al.* A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat. Med.* **24**, 994–1004 (2018).
62. Sasaki, H. *et al.* PD-1 gene promoter polymorphisms correlate with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Mol. Clin. Oncol.* **2**, 1035–1042 (2014).
63. Lee, S. Y. *et al.* Functional polymorphisms in PD-L1 gene are associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer. *Gene* **599**, (2016).
64. Nomizo, T. *et al.* Clinical Impact of Single Nucleotide Polymorphism in PD-L1 on Response to Nivolumab for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Sci. Rep.* **7**, 45124 (2017).

65. Queirolo, P. *et al.* Association of CTLA-4 Gene Variants with Response to Therapy and Long-term Survival in Metastatic Melanoma Patients Treated with Ipilimumab: An Italian Melanoma Intergroup Study. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
66. Queirolo, P. *et al.* CTLA-4 gene variant -1661A>G may predict the onset of endocrine adverse events in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **97**, 59–61 (2018).
67. Fujisawa, R. *et al.* Low programmed cell death-1 (PD-1) expression in peripheral CD4+ T cells in Japanese patients with autoimmune type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* **180**, 452–457 (2015).
68. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9:503-510. *Nat. Immunol.* **9**, 503–10 (2008).
69. Tarazona, R., Duran, E. & Solana, R. Natural Killer Cell Recognition of Melanoma: New Clues for a More Effective Immunotherapy. *Front. Immunol.* **6**, (2016).
70. Pietra, G. *et al.* Human natural killer cells: news in the therapy of solid tumors and high-risk leukemias. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 465–476 (2016).
71. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 715–727 (2006).
72. Pietra, G., Vitale, M., Moretta, L. & Mingari, M. C. How melanoma cells inactivate NK cells. *Oncoimmunology* **1**, 974–975 (2012).
73. Vitale, M., Cantoni, C., Pietra, G., Mingari, M. & Moretta, L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur. J. Immunol.* **44**, (2014).
74. Moon, Y. W., Hajjar, J., Hwu, P. & Naing, A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J. Immunother. Cancer* **3**, (2015).
75. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461–469 (2008).
76. Barry, K. C. *et al.* A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat. Med.* **24**, 1178–1191 (2018).
77. 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.* **139**, 335-346.e3 (2017).

78. Wolchok, J. D. *et al.* Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 7412–7420 (2009).
79. Seymour, L. *et al.* iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol.* **18**, e143–e152 (2017).
80. Lee, S. Y. *et al.* PD-L1 polymorphism can predict clinical outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with first-line paclitaxel-cisplatin chemotherapy. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
81. Banelli, B. *et al.* A Novel Multiplex Pyrosequencing Assay for Genotyping Functionally Relevant Ctlα-4 Polymorphisms: Potential Applications In Autoimmunity and Cancer. *Hum. Immunol.* **75**, (2014).
82. Canale F.P. *et al.*, CD39 expression defines cell exhaustion in tumour-infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Research.* **78** (1):115-118 (2018).
83. Twyman-Saint Victor, C. *et al.* Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* **520**, 373–377 (2015).
84. Duhén, T. *et al.* Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat. Commun.* **9**, 2724 (2018).
85. Dong, W. *et al.* Programmed Cell Death-1 Polymorphisms Decrease the Cancer Risk: A Meta-Analysis Involving Twelve Case-Control Studies. *PLoS ONE* **11**, (2016).
86. Simoni, Y. *et al.* Bystander CD8+ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature* **557**, 575–579 (2018).
87. Pallett, L. J. *et al.* IL-2<sup>high</sup> tissue-resident T cells in the human liver: Sentinels for hepatotropic infection. *J. Exp. Med.* **214**, 1567 (2017).
88. Chen, L. & Han, X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J. Clin. Invest.* **125**, 3384–3391 (2015).
89. Pietra, G. *et al.* Melanoma Cells Inhibit Natural Killer Cell Function by Modulating the Expression of Activating Receptors and Cytolytic Activity. *Cancer Res.* **72**, 1407–15 (2012).
90. Prokunina-Olsson, L. *et al.* A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat. Genet.* **32**, 666–9 (2003).

91. Shi, F. *et al.* PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. Cancer* **128**, 887–896 (2011).