

Autologous cellular immunotherapy for cancer

Paola Oliosio^{1,3}, Antonio Iacone^{2,3}

¹ *Unità di Terapia Intensiva Ematologica per il Trapianto Emopoietico, Azienda Unità Sanitaria Locale, Pescara*

² *Dipartimento di Medicina TrASFusionale, Azienda Unità Sanitaria Locale, Pescara*

³ *Laboratorio di Terapia Cellulare, Azienda Unità Sanitaria Locale, Pescara, Italy*

Cellular immunotherapy is a procedure with the aim to recognize tumor cells and induce an immune response that leads to specific tumor cell killing.

The potential antitumoral effect is well-documented in experimental animal models and clinical trials.

First experimental evidence for the immunogenicity of tumors was reported in 1893, when William B Coley¹ observed that patients with advanced sarcoma responded to the intratumoral inoculation of streptococcal cultures or their toxins, non-specifically activating their immune system.

This concept was expanded many years later by using killed tumor cells or tumor cells lysates mixed with adjuvants such as bacille Calmette-Guérin (BCG)² and *Corynebacterium parvum*³ to further enhance tumor-specific immune responses.

One century later, Rosenberg⁴ pioneered the administration of high doses of Interleukin (IL)-2 to patients with metastatic renal cell carcinoma or melanoma confirmed that human tumor can respond to immunotherapy.

IL-2 is a cytokine produced by human T-helper lymphocytes with immunoregulatory effects, including the expansion of lymphocytes following activation by specific antigen. IL-2 has no direct impact on cancer cells, which can grow unimpeded *in vitro* also in high concentrations of the cytokine. Thus, the impact of IL-2 on cancers derives from its ability to expand lymphocytes with anti-tumor activity.

L'immunoterapia cellulare adottiva è una strategia terapeutica che ha come obiettivo riconoscere le cellule tumorali e indurre una risposta immune specifica in grado di causare la lisi delle cellule neoplastiche. Il potenziale effetto antitumorale di tale terapia è ampiamente documentato in studi condotti su modelli animali ed in corso di sperimentazioni cliniche. La prima evidenza della immunogenicità dei tumori risale al 1893, quando William B Coley¹ osservò che pazienti affetti da sarcomi in fase avanzata rispondevano alla inoculazione intratumorale di colture di batteri vivi o di tossine streptococciche, attivando in maniera non specifica il sistema immunitario. Tale concetto venne allargato, molti anni dopo, usando cellule neoplastiche uccise o lisate di cellule tumorali, insieme ad adiuvanti, quali il bacillo di Calmette-Guérin (BCG)² e il *Corynebacterium parvum*³ per esaltare ulteriormente la risposta immune tumore-specifica. Circa un secolo dopo Coley, Rosenberg⁴ fu il primo a somministrare alte dosi di interleuchina-2 (IL-2) a pazienti con metastasi da carcinoma renale o da melanoma, confermando che i tumori nell'uomo sono in grado di rispondere all'immunoterapia. IL-2 è una citochina, prodotta dai linfociti T-helper umani, che ha effetti immunoregolatori, ivi compresa l'espansione dei linfociti attivati da uno specifico antigene. IL-2 non ha un impatto diretto sulle cellule neoplastiche, che possono crescere *in vitro* senza alcun impedimento, in presenza di concentrazioni anche alte della citochina. Quindi, l'azione della IL-2 sul tumore deriva dalla sua capacità di espandere i linfociti con attività antineoplastica. Attualmente, l'immunoterapia dei tumori riconosce due approcci: immunizzazione attiva e trasferimento passivo. La prima strategia comprende

Correspondence:

Dott. Antonio Iacone

Via Fonte Romana 8

65120 Pescara, Italia

E-mail: antonioiacone@virgilio.it

Presently, cancer immunotherapy can be divided into active immunization and passive transfer approaches.

The former strategy includes the injection of modified autologous cancer cells, as well as the injection of tumor antigen protein, peptide or nucleic acid delivered with or without adjuvant.

The latter approach may be divided in specific or non-specific, and involves the transfer of immune T-cells activated and expanded *ex-vivo*, and then transferring the cells to patients, such as lymphokine activated killer cells or specific cytotoxic T lymphocytes. This work has focused largely on isolating and expanding T and activated NK cells utilizing different strategies.

The immune response to cancer

The onset of immune response requires lymphocytes, antigen (Ag) and a third-party cell to present Ags to the lymphocytes called antigen-presenting cells (APCs).

Dendritic cells (DCs) are the most potent APC with the unique ability to stimulate naïve resting T cells and to initiate and maintain primary immune responses.

DCs are specialized to capture exogenous Ags, able to process Ag in peptide fragments and present it coupled to major histocompatibility complex (MHC) molecules, with all the adhesive and co-stimulatory signals to initiate Ag-specific immune response. Importantly, they express abundant adhesion molecules and integrins (LFA-3, ICAM-1, ICAM-3), MHC class I and class II together with co-stimulatory molecules CD80, CD86 e CD40, necessary to promote T-cell activation.

T-cell interaction involve co-stimulatory molecules on DCs which activate T cells via their ligands CD40, CD28 and by the production of cytokines such as IL-12 that direct T_H1 cell differentiation and induce a sustained cytotoxic T-cell response.

Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are one of the effector cells that are able to lyse tumor cells. For T cell activation two signals are required, delivered by APC.

The first signal is through the T cell receptor (TcR) and is both Ag specific and MHC restricted.

T cells recognize peptide antigens present on the cell surface together with class I or class II MHC molecules.

l'inoculazione di cellule autologhe neoplastiche, così come quella di proteine antigeniche, di peptidi o di acidi nucleici tumorali, con o senza adiuvanti.

Il secondo approccio può essere specifico o non specifico e coinvolge il trasferimento di cellule T attivate ed espanse *ex-vivo* e il loro inoculo ai pazienti, come cellule *killer* attivate da linfocine (le cellule LAK) o come specifici linfociti T citotossici (CTL).

Questo lavoro ha focalizzato l'attenzione principalmente sulla separazione ed espansione di cellule T e di cellule NK (*Natural Killer*) attivate, utilizzando diverse metodiche.

La risposta immune ai tumori

L'inizio di una risposta immune richiede la presenza di linfociti, di un antigene (Ag) e, come terza parte, delle cosiddette APC, cioè di cellule che presentano gli antigeni (*Antigen-Presenting Cells*). Le cellule dendritiche (DC) sono le più potenti APC con un'abilità unica nello stimolare cellule T native in riposo a dare inizio e a mantenere una risposta immune primaria.

Le DC sono specializzate nel catturare gli Ag esogeni, nel frammentarli in peptidi e nell'accoppiarli alle molecole MHC (*Major Histocompatibility Complex*), insieme ai segnali di adesione e di co-stimolazione, per dare inizio alla risposta immune Ag-specifica.

Infatti, esprimono numerose molecole di adesione, integrine (LFA-3, ICAM-1 e ICAM-3), molecole MHC di I e II classe e molecole di co-stimolazione (CD80, CD86 e CD40), indispensabili a promuovere l'attivazione delle cellule T.

L'azione delle cellule T coinvolge le molecole di co-stimolazione presenti sulle DC, che attivano le cellule T attraverso i loro ligandi CD40 e CD28 e, mediante la produzione di citochine quali l'IL-12, indirizzano la differenziazione delle cellule T_H1 e inducono una risposta prolungata delle cellule T citotossiche.

I linfociti T citotossici (CTL) rappresentano una popolazione di cellule effettrici capace di lisare le cellule tumorali.

Per la loro attivazione sono necessari due segnali, entrambi forniti dalle APC. Il primo segnale è dato dal recettore delle cellule T (TcR) ed è, contemporaneamente, antigene-specifico e MHC-ristretto. Le cellule T riconoscono i peptidi antigenici

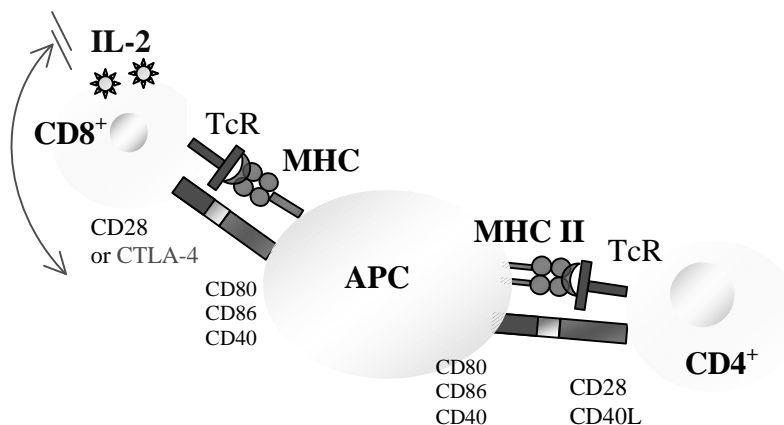


Figure 1 - Antigen Presenting Cell - T cell interactions

Two signals are necessary for the initial activation of naive T cells. If only signal 1 is presented an immune response will not be initiated inducing tolerance or ignorance of tumor antigens.

- Signal 1: MHC class I and II molecules on the APC surface legate with T-cell receptor (TcR) on CD8⁺ and CD4⁺, respectively.
- Signal 2: co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) on the mature APC legate the CD28 co-stimulatory receptor on T cells inducing T-cell activation. If CTLA-4 binds co-stimulatory molecules inhibits T-cell activation and IL-2 production.

TcR on CD8⁺ T lymphocytes recognize peptides of 8-11 amino acids in length, derived from cytoplasmic proteins and transported via the endoplasmic reticulum to the cell surface class I MHC molecules.

Larger peptides, of 12-18 amino acids in length, that are derived from extracellular proteins, bind class II MHC molecules and are presented to CD4⁺ T cells on the cell surface.

The second signal, not Ag-specific nor MHC restricted, is delivered to co-stimulatory receptor present on T-cell surface, such as CD28, by co-stimulatory ligands members of the B7 family expressed on APCs (Figure 1).

When both signals are delivered, Ag-specific T cells activate and induce them to expand and differentiate into cytotoxic effector cells⁵.

Other cells of the innate immune system with intrinsic antitumor effector function non-MHC-restricted are represented by natural killer (NK), NKT and $\gamma\delta$ T cells^{6,7}.

They express activating receptors such as NKG2D, that recognise MHC class I molecules regulated on tumor cells but the mechanism of antigen recognition does not require MHC compatibility between effector and target cell.

After activation, these cells produce INF- γ which induces macrophages and DCs to produce IL-12, further activating the innate response.

presenti sulla superficie cellulare associati alle molecole MHC di I e II classe. I TcR sui linfociti T CD8⁺ riconoscono peptidi della lunghezza di 8-11 amminoacidi, provenienti da proteine citoplasmatiche e trasferiti, via reticolo endoplasmatico, alle molecole MHC di I classe sulla superficie cellulare.

Peptidi più grandi, 12-18 amminoacidi, che derivano dalle proteine extracellulari, legano molecole di classe II e sono presentati ai linfociti CD4⁺. Il secondo segnale, non Ag-specifico né MHC-ristretto, è rilasciato dai recettori di co-stimolazione presenti sulla superficie delle cellule T, quali il CD28, attraverso ligandi membri della famiglia B7 sulle APC (Figura 1).

Quando entrambi i segnali sono rilasciati, attivano le cellule T Ag-specifiche e le inducono ad espandersi e a differenziarsi in cellule citotossiche effettrici⁵.

Altre cellule del sistema immunitario naturale con intrinseca funzione antitumorale non MHC-ristretta sono le cellule NK, le cellule NKT e le cellule $\gamma\delta$ T^{6,7}.

Esse esprimono recettori attivanti, quali NKG2D, che riconoscono molecole MHC di I classe sulle cellule tumorali, ma il riconoscimento dell'Ag non richiede la compatibilità MHC fra cellule effettrici e cellule bersaglio.

Dopo l'attivazione, queste cellule producono INF- γ che a sua volta induce macrofagi e DC a produrre IL-12, che attiva ulteriormente la risposta immune naturale.

Table I - Mechanisms responsible for tumor escape

1- Defects in T cells	- Insufficient numbers of Ag-specific T cells - Induction of anergy - Failure to develop or retain memory
2- Defects in Ag presentation	- Defective expression of adhesion molecules - Defective class I and II MHC expression - Defective Ag processing and transport - Absence of Ag - Modification of tumor peptide Ag
3- Tumor cells	- Defective expression of co-stimulatory molecules - Expression of down regulatory molecules - Secretion of immunosuppressive cytokines
4- Negative regulatory / suppressor T cells	- CD4 ⁺ CD25 ⁺ T cells - CD4 ⁺ NK T-cells

Immune escape

The development of malignant disease might be seen as a failure of immune surveillance. A variety of active mechanisms may limit the effectiveness of immune stimulation (Table I). These include:

- active tolerance of T cells resulting from the lack of expression of co-stimulatory molecules on the tumor;
- active down regulation of T-cell-receptor signal transduction;
- the programmed cell death apoptosis of T cells when encountering tumor;
- active suppression by lymphocytes.

A major factor limiting immune recognition of cancer cells is the fact that tumors arise from the organism's own tissue and mainly express self antigens to which T cells have been tolerized.

Tumor cells may also preserve themselves from immune destruction, losing expression of tumour or MHC class I antigens by mechanisms of immune selection and causing lack of recognition, a phenomenon termed *immune ignorance*. In the absence of co-stimulation, T cells tend to become *anergic*, a state of induced unresponsiveness characterized by reduced IL-2 and IFN- γ production and low CD25 expression.

Additionally, tumors may induce immunosuppression producing high levels of the immunoinhibitory substances IL-10, TGF- β (transforming growth factor beta), or VEGF (vascular endothelial growth factor) and the expression of apoptosis-inducing Fas ligand.

These mechanisms suppress T cell activation and APC capacity of DCs and macrophages by blocking the production of pro-inflammatory molecules or

Elusione della risposta immune

Lo sviluppo di un tumore può anche essere considerato come il fallimento dell'immunosorveglianza. Diversi meccanismi possono limitare l'efficacia di una risposta immune (Tabella I).

Essi comprendono:

- tolleranza da parte delle cellule T per carenza di espressione delle molecole di co-stimolazione sul tumore;
- sottoregolazione del trasferimento del segnale da parte dei recettori sulle cellule T;
- apoptosi programmata delle cellule T quando vengono a contatto con cellule tumorali;
- soppressione attiva da parte di una classe di linfociti.

Il fattore più importante che limita il riconoscimento delle cellule tumorali da parte del sistema immunitario è legato al fatto che il tumore si origina nello stesso organismo ed esprime Ag propri (*self*) verso i quali le cellule T sono tolleranti.

Le cellule tumorali possono esse stesse preservarsi dalla distruzione, perdendo antigeni tumorali o antigeni MHC di I classe, mediante un meccanismo di selezione che determina il mancato riconoscimento, fenomeno noto come *ignoranza immunologica*.

In assenza del segnale di co-stimolazione, la cellula T tende a divenire *anergica*, stato che causa la mancata risposta, con una ridotta produzione di IL-2 e di IFN- γ e scarsa espressione di CD25.

Inoltre, il tumore può indurre immunosoppressione con la produzione di alti livelli di sostanze immunoinibitorie, quali IL-10, TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*) o il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), o con l'espressione del ligando del

increasing expression of the STAT3 protein. Another host negative immunoregulatory mechanism is represented by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4), a negative co-stimulatory receptor with higher affinity than CD28 for co-stimulatory molecules, that inhibits T-cell activation and IL-2 production.

Finally, recent evidence suggests that effective immune responses to tumor antigens may be inhibited by regulatory cells that contribute to the prevention of autoimmunity, such as CD4⁺CD25⁺ negative-regulatory T cells or CD4⁺NK T-cells which inducing the expression of TGF- β inhibits the antitumor toxicity mediated by CD8⁺ CTLs⁸.

Natural Killer and Lymphokine Activated Killer Cells

NK cells comprise about 10% of all blood lymphocytes and are CD16⁺, CD56⁺ and CD3⁻.

They are an important component of the innate immune system, which do not require prior sensitisation and mediate killing through various mechanisms, but the perforin/esterase pathway is prevalent.

Mechanism of escape of tumour cells from NK/A-NK cytotoxicity may be due to:

- lack of adhesion molecules;
- defects in intracellular signalling leading to ineffective activation of NK cells;
- expression of Fas-L on targets;
- impaired production of perforin or esterase;
- impaired binding of perforin on the surface of tumor cells;
- tumor architecture not allowing NK/A-NK cells to reach tumor cells.

NK cells exposed to high concentration of IL-2 become activated NK (A-NK)⁹ cells, which differentiate from lymphokine-activated killer cells (LAK) generated from mononuclear cells and capable of killing NK-resistant cell targets and a wide spectrum of different tumor cells in both autologous and allogeneic setting.

In murine models the administration of high-dose IL-2 and LAK cells induce the regression of established pulmonary, hepatic and sub dermal metastases.

In 1985 Rosenberg *et al.*¹⁰ published their first pilot study on 25 patients with metastatic cancer, in whom

Fas (proteina di superficie appartenente alla famiglia dei recettori del *Tumor Necrosis Factor* o TNF) che induce apoptosi. Questi meccanismi sopprimono l'attivazione delle cellule T e la capacità di presentare l'Ag da parte delle DC e dei macrofagi, bloccando la produzione di molecole pro-infiammatorie o aumentando l'espressione della proteina STAT3.

Un altro meccanismo di immunoregolazione negativa è rappresentato dal CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*), un recettore a stimolazione negativa con maggiore affinità per le molecole di co-stimolazione rispetto al CD28 e che inibisce l'attivazione delle cellule T e la produzione di IL-2.

Infine, evidenze recenti prospettano che una efficace risposta immune agli Ag tumorali possa essere inibita dalle cellule regolatorie che prevengono l'autoimmunità, quali le CD4⁺CD25⁺, cellule T ad attività regolatoria negativa e le CD4⁺NK-T, cellule T che inducono l'espressione del TGF- β , inibente la tossicità antineoplastica mediata dai CD8⁺ CTL⁸.

Cellule NK e LAK

Le cellule NK sono cellule CD16⁺, CD56⁺ e CD3⁻ che costituiscono circa il 10% di tutti i linfociti periferici. Sono componenti importanti del sistema immunitario naturale, non richiedono precedenti sensibilizzazioni e mediano la distruzione cellulare (*killing*) mediante vari meccanismi, prevalentemente attraverso la via perforina/esterasi.

I meccanismi di elusione delle cellule tumorali dalla citotossicità indotta dalle cellule NK e dalle NK attivate (A-NK) si realizzano per:

- mancanza di molecole di adesione;
- difetti nei segnali intracellulari, con conseguente attivazione inefficace delle NK;
- espressione del ligando del Fas (Fas-L) sulle cellule bersaglio;
- alterata produzione di perforina o di esterasi;
- alterato legame della perforina alla superficie delle cellule tumorali;
- particolare struttura del tumore che impedisce alle cellule NK/A-NK di raggiungere le cellule neoplastiche.

Le cellule NK, esposte ad alte concentrazioni di IL-2, si attivano diventando A-NK⁹ differenziandosi così dalle cellule LAK (*Lymphokine-Activated Killer*), che originano dalle cellule mononucleate e sono capaci

Table II - Clinical trials with LAK cells

Authors	Year	n° pats	Kind of tumour	LAK cells	IL-2	Response
Rosenberg <i>et al.</i> ¹⁰	1987	157	MM	IL-2+LAK	vs random	CR:7.5% vs 2% PR : 14.2% vs 10.9%
Fisher <i>et al.</i> ¹¹	1988	29	RCC	7x10 ¹⁰	+ 12.0MU/Kg	OR: 16%
Paciucci <i>et al.</i> ¹²	1989	32	MM	8.9x10 ¹⁰	+ 3x10 ⁵ U/Kg	CR+PR : 20.5%
Paciucci <i>et al.</i> ¹³	1989	24	miscellaneous	5.6x10 ⁹	+ 1-5 MU/m ²	CR+PR: 20.8%
Stahel <i>et al.</i> ¹⁴	1989	23	miscellaneous	5.1x10 ¹⁰	+ 9x10 ⁴ U/Kg	CR+PR: 17%
Negrier <i>et al.</i> ¹⁵	1989	95	RCC	LAK+IL-2	vs IL-2 18x10 ⁶ /m ²	CR :10% vs 6% PR:18% vs 13%
McCabe <i>et al.</i> ¹⁶	1991	94	MM	LAK	vs IL-2 alone	CR+PR :12% vs 16%
Rosenberg <i>et al.</i> ¹⁷	1993	181	metastatic cancer	IL-2+LAK	vs IL-2 alone random	CR: 11.8% vs 5% PR: 16.% vs 15.2% OS 3 yrs: 31% vs 17% CRF+PR: 33%
Keiholz <i>et al.</i> ¹⁸	1994	9	liver metastatic carcinoma	into the portal vein or hepatic artery + into the splenic artery or iv		
Murray <i>et al.</i> ¹⁹	1995	66	RCC	IL-2+LAK	vs IL-2 3 MU/m ² random	CR-PR:3% vs)% p=0.61
Rimura and Yamaguchi ²⁰	1997	174	lung carcinoma	IL-2+LAK	vs other	OS 5yrs: 54.4% vs 33.4% OS 9yrs: 52% vs “\$.2% p < 0.001
Pizza <i>et al.</i> ²¹	2001	122	RCC	LAK	vs other	CR+PR: 29% OS 11 yrs: 25% median OS : 28vs7.5 mo
Duillman <i>et al.</i> ²²	2004	40	multiform glioblastoma	LAK intralesional	vs other	OS 1 yr: 34% median OS:17.5vs13.6 mo p=0.012

MM: malignant melanoma; RCC: renal cell carcinoma; CR: complete remission; PR: partial remission; OR: overall response; OS: overall survival

standard therapy had failed. Patients received 1.8 to 18.4 x10¹⁰ autologous LAK cells and up to 90 doses of IL-2. Objective regression of cancer (more than 50% of volume) was observed in 11 out of 25 patients (44%). Complete remission (CR) of cancer occurred in 1 patient with metastatic melanoma (sustained for up 10 months after therapy) and partial responses in 9 patients with pulmonary or hepatic metastases from melanoma, colon cancer or renal cell cancer and in 1 patient with lung adenocarcinoma.

Several clinical trials were conducted with IL-2 with or without LAK cells and the results were similar demonstrating a slightly increased number of CR in the group that received LAK cells reinfusion.

The most frequent toxicities included capillary leak syndrome with severe fluid retention and weight gain, hypotension, oliguria, fever, cardiac arrhythmia, the majority of which were supraventricular, elevation of bilirubin and creatinine levels, but all these adverse side effects resolved after IL-2 administration was stopped.

A summary of most relevant clinical trials¹⁰⁻²² is given in table II.

di lisare cellule bersaglio NK-resistenti, oltre a un largo spettro di differenti cellule tumorali, autologhe e allogene. In modelli murini, la somministrazione di alte dosi di IL-2 e di cellule LAK fa regredire metastasi stabilizzate polmonari, epatiche e sottodermiche. Nel 1985, Rosenberg *et al.*¹⁰ hanno pubblicato il loro primo studio-pilota su 25 pazienti con tumori metastatizzati, nei quali la terapia standard era fallita. I pazienti avevano ricevuto da 1,8 a 18,4x10¹⁰ cellule LAK autologhe e fino a 90 dosi di IL-2. Si era osservata una oggettiva regressione del tumore (più del 50% in volume) in 11 pazienti (44%). Una remissione completa (CR) del tumore si era verificata in un paziente affetto da melanoma metastatico (CR che si manteneva oltre 10 mesi dopo la terapia) e una risposta parziale in 9 pazienti con metastasi polmonari o epatiche da melanomi, neoplasie renali o coloretali e in 1 paziente con adenocarcinoma polmonare. Sono state condotte numerose sperimentazioni cliniche con IL-2, con o senza cellule LAK, e i risultati sono stati sovrapponibili, dimostrando solo un lieve aumento di CR nel gruppo che aveva ricevuto le cellule LAK. Gli effetti tossici più frequenti comprendevano: *capillary leak syndrome* con contestuale grave ritenzione di liquidi e aumento di peso, ipotensione, oliguria, febbre, aritmie cardiache

Tumor Infiltrating Lymphocytes

Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) are T lymphocytes characterized phenotypically as CD3⁺CD8⁺CD56⁻, that derived from malignant tissue specimens and display cytotoxicity MHC-restricted against autologous tumor cells. They can be expanded with IL-2 at low-intermediate concentrations and reinfused into patients with renal cell carcinoma (RCC) and malignant melanoma (MM).

Alexander and Rosenberg²³ demonstrated a synergistic antitumor activity of TIL in combination with IL-2, capable of mediating an effect that is 50-100 times more potent in murine as well as human metastatic tumor models than those observed with LAK cells. In fact, with the combination of TIL, IL-2 and cyclophosphamide, 100% of mice bearing the MC-38 colon adenocarcinoma were cured of advanced hepatic metastases and up to 50% of mice adenocarcinoma were cured of advanced pulmonary metastases.

Trials using TIL and high dose IL-2 in patients with advanced RCC, MM and other advanced tumors have achieved clinical responses ranging from 13% to 60% with most reports ranging between 15% and 20%^{24,25}. The wide range of responses may be explained by differences in patient's selection, as well as by laboratory processing differences, impaired T cell receptor (TcR) signalling functions and the apoptosis marker's repertoire. In fact, undetectable or very low levels of TcR epsilon chain, p56 (lck), Fas Ligand and Bax expression were found, while Bcl-2 values were elevated. Approaches that overcome such defects in TIL or other T cell preparations may improve clinical responses.

One limitation of TIL therapy is the toxicity associate with high dose IL-2 infusion, which restricts its use only in good performance status patients. Although high doses of TIL can be infused without toxicities, TIL efficacy is believed to be linked to co-administration of high dose IL-2.

Clinical Trials

In 1988, Rosenberg *et al.*²⁶ published the first preliminary report on 20 patients with metastatic melanoma after a single dose of cyclophosphamide. Objective regression of the cancer was observed in 9 of 15 patients (60%) who had no previously treated

(in maggioranza sopraventricolari), aumento della bilirubina e della creatinina; tutti questi effetti collaterali si risolvevano quando veniva sospesa la somministrazione di IL-2. La tabella II mostra le sperimentazioni cliniche più rilevanti¹⁰⁻²².

Linfociti infiltranti i tumori

I linfociti che infiltrano le neoplasie, denominati TIL (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*), sono T linfociti, fenotipicamente CD3⁺CD8⁺CD56⁻, che derivano dal tessuto neoplastico ed esercitano una citotossicità MHC-ristretta contro le cellule tumorali autologhe. Possono essere espansi *in vitro* con concentrazioni medio-basse di IL-2 e reinfusi a pazienti con carcinoma renale (CCR) o melanoma maligno metastatico (MM).

Alexander e Rosenberg²³ hanno dimostrato un'attività antitumorale sinergica dei TIL in combinazione con IL-2, in grado di mediare un effetto 50-100 volte più potente nei confronti delle cellule tumorali di origine sia murina che umana, rispetto a quello osservato con le cellule LAK. Infatti, con la combinazione TIL, IL-2 e ciclofosfamide, il 100% dei topi con adenocarcinoma del colon MC-38 venivano guariti dalle estese metastasi epatiche e oltre il 50% da quelle polmonari. Sperimentazioni condotte impiegando TIL ed alte dosi di IL-2 in pazienti con CCR, MM o altri tumori in fase avanzata ottenevano risposte cliniche, fra il 13 e il 60% dei casi, per lo più dal 15 al 20%^{24,25}. L'ampia gamma di risposte può essere spiegata dalle differenze nella selezione dei pazienti così come da quelle relative alle tecniche di laboratorio, alle alterate funzioni di segnale dei TcR e del repertorio dei marcatori di apoptosi. Infatti, si sono riscontrati livelli non misurabili o bassissimi di catene ε del TcR, del p56 (lck), del Fas-L e del Bax, mentre i livelli di Bcl-2 sono risultati elevati. Se si riusciranno a superare tali problemi nella preparazione delle cellule TIL o di altre cellule T, si potranno migliorare anche i risultati e quindi la risposta clinica.

Una limitazione nell'uso terapeutico delle TIL è la tossicità associata all'infusione di alte dosi di IL-2, che limita il suo impiego soltanto in pazienti in buone condizioni. Benché possono essere infuse alte dosi di TIL senza tossicità, l'efficacia di queste cellule sembra essere legata alla contemporanea somministrazione di alte dosi di IL-2.

with IL-2 and in 2 of 5 patients (40%), in whom previous therapy with IL-2 had failed. Regression of cancer occurred in the lungs, liver, bone, skin and subcutaneous sites and lasted from 2 to more than 13 months.

In a second study Arienti *et al.*²⁷ enrolled 16 patients with metastatic melanoma obtaining 1 CR and 3 PR in 12 evaluable patients (response rate 33%).

In 1995, Goedegebuure *et al.*²⁸ treated 16 melanoma patients; of these, 3 (19%) showed a durable CR, 9 (56%) had no response (NR) and 4 (25%) had progressive disease (PD). One non-responder demonstrated CR within 1 year of treatment. Interestingly, TIL from responders possessed significantly higher cytotoxicity against autologous tumor cells than TIL from non-responders ($p < 0.05$).

Ratto *et al.*²⁹ experienced the infusions of TIL and IL-2 subcutaneously in 29 patients who underwent resection for stage III non-small-cell lung cancer. Median survival was 14 months and the 2-year survival was 40%. Three patients remain alive and disease-free (DF) at more than 2 years after operation.

In 1993, Figlin *et al.*³⁰ carried out a pilot study involving 55 patients with renal cell cancer treated with nephrectomy followed by TIL plus low-dose of IL-2 obtaining objective response rates of 33% to 35% and 1-year survival rates of 65% to 73%.

On the basis of this encouraging single-institution study, they conducted, between 1994 and 1997, a randomized multicenter study to prospectively compare TIL plus low-dose IL-2 versus low-dose IL-2 alone. A total of 178 patients with resectable primary tumors were enrolled at 29 centers in the United States and Europe. After radical nephrectomy, 160 patients were randomized, 81 to the TIL/IL-2 group, 79 to the IL-2 control group. Among 72 patients eligible for TIL/IL-2 therapy, 33 (41%) received no TIL therapy, because of an insufficient number of viable cells. Intention to treat analysis showed objective response rates of 9.9% vs 11.4% and 1-year survival rates of 55% vs 47% in the TIL/IL-2 and IL-2 control group, respectively.

The study was terminated early for lack of efficacy, not confirming the treatment benefit associated with TIL/IL-2 observed in the pilot study, even if only 59% of the patients in the TIL/IL-2 group received TIL therapy vs 96% (23/24) in the pilot study.

In 2002, Dreno *et al.*³¹ performed a phase II/III randomized trial on 88 stage III melanoma patients

Sperimentazioni cliniche

Nel 1988, Rosenberg *et al.*²⁶ hanno pubblicato il primo resoconto preliminare sul trattamento di 20 pazienti affetti da MM dopo l'infusione di una singola dose di ciclofosfamide. È stata rilevata una oggettiva regressione neoplastica in 9 su 15 (60%) pazienti che non erano stati precedentemente trattati con IL-2 e in 2 su 5 (40%) pazienti, nei quali il trattamento con IL-2 era fallito. La regressione del tumore ha interessato polmoni, fegato, ossa, pelle e sottocutaneo e si è protratta da 2 a più di 13 mesi. In un secondo studio, Arienti *et al.*²⁷ hanno arruolato 16 pazienti con MM e ottenuto 1 CR e 3 remissioni parziali (PR) in 12 pazienti valutabili (33% di risposte). Nel 1995, Goedegebuure *et al.*²⁸ hanno trattato 16 soggetti affetti da MM: di questi, 3 (19%) hanno mostrato una CR duratura, 4 (25%) progressione di malattia (PM) e 9 (56%) non hanno risposto (NR). Un soggetto *non-responder* ha presentato una CR entro 1 anno. Dato interessante, le TIL mostravano una maggiore citossicità contro le cellule neoplastiche autologhe nei soggetti *responders* piuttosto che nei *non-responders* ($p < 0,05$). Ratto *et al.*²⁹, hanno sperimentato l'infusione sottocutanea di TIL e IL-2 in 29 malati che erano stati sottoposti a resezione polmonare per tumori non a piccole cellule in stadio III. La sopravvivenza mediana è stata di 14 mesi e, a 2 anni, la sopravvivenza è stata del 40%. Tre pazienti sono sopravvissuti, liberi da malattia (DF), più di 2 anni dopo l'intervento.

Nel 1993, Figlin *et al.*³⁰ hanno condotto uno studio-pilota che interessava 35 pazienti con CCR trattati con nefrectomia, seguita da infusione di TIL più IL-2 a basse dosi, ottenendo una risposta oggettiva dal 33 al 35% e una sopravvivenza a 1 anno dal 65 al 73%. Sulla base di questa incoraggiante esperienza, fatta da un singolo istituto, essi hanno intrapreso fra il 1994 e il 1997 uno studio multicentrico randomizzato per paragonare, prospetticamente, l'impiego di TIL più IL-2 a basse dosi con quello di sola IL-2 a basse dosi. Sono stati reclutati, da 29 centri negli Stati Uniti e in Europa, 178 pazienti con tumori primitivi passibili di resezione.

Vennero randomizzati 160 pazienti sottoposti a nefrectomia radicale, 81 appartenenti al gruppo TIL/IL-2 e 79 al gruppo di controllo IL-2. Di 72 pazienti appartenenti al gruppo TIL/IL-2, 33 (41%) non ricevettero TIL per un numero insufficiente di cellule vitali. L'analisi dei dati dimostrò un indice di risposta

who received TIL plus IL-2 or IL-2 only after complete tumor resection. After a median follow-up of 46.9 months Kaplan-Meier analysis did not show a significant extension of relapse-free interval or overall survival between the 2 group.

However, analysis revealed that TIL infusion was statistically correlated with prolonged relapse-free survival in those patients with only one invaded lymph node, the estimated relapse rate was significantly lower ($p = 0.0285$) and the overall survival (OS) was increased ($p = 0.039$) compared to the IL-2 only arm. These results confirm that tumor burden might be a crucial factor in the efficacy of TIL.

Ridolfi and Amadori³² performed a pilot study on 22 stage III and IV melanoma patients who underwent radical metastasectomy and were reinfused with TIL and IL-2 according to West's scheme. A total of 8/22 patients (36.3%) were DF at a median follow-up of 5 years. DFS and OS in the remaining 14 patients were 44% and 37% and 52% and 45% at 2 and 3 years, respectively.

Another promising application has been the use of TIL to treat ovarian carcinomas. Ikarashi *et al.*³³ stimulated lymphocytes infiltrating ovarian carcinomas with anti-CD3 and IL-2 and used them to treat 12 patients after surgery and chemotherapy. After a median follow-up of 22 to 23 months, the treatment group had 100% survival by Kaplan-Meier, whereas the 2-year survival for patients with progressive epithelial ovarian cancer was reported as between 47% and 63%.

Cytokine Induced Killer Cells

CIK cells are a unique population of cytotoxic T lymphocytes with the characteristic CD3⁺CD56⁺ phenotype that was first described by Lanier *et al.*³⁴ in 1986 in both human and murine tissues.

These cells, morphologically similar to large granular lymphocytes, as determined by Giemsa stain, are large 16-20 μ with abundant cytoplasm and numerous cytoplasmic granules containing pore-forming protein and granzymes⁵.

They are rare in the peripheral blood, with approximately 3% of lymphocytes found to be of this phenotype. This population of highly efficient cytotoxic effector cells capable of lysing a broad variety of tumor cell targets has been termed CIK cells

oggettiva del 9,9% contro l'11,4% e un indice di sopravvivenza a 1 anno del 55% contro il 47%, nel gruppo TIL-IL-2 e, rispettivamente, in quello IL-2 di controllo.

Lo studio venne chiuso anticipatamente per mancanza di efficacia, dato che non confermava i benefici associati all'uso di TIL/IL-2 evidenziato nello studio-pilota, anche se soltanto il 55% dei pazienti del primo gruppo aveva ricevuto TIL contro il 96% (23 su 24) dello studio-pilota. Nel 2002, Dreno *et al.*³¹ hanno effettuato una sperimentazione randomizzata, fase II/III, su 88 pazienti affetti da MM in stadio III, che avevano ricevuto TIL più IL-2 o soltanto IL-2 dopo la resezione completa del tumore.

Dopo un *follow-up* mediano di 46,9 mesi, l'analisi della sopravvivenza secondo Kaplan-Meier non mostrava nei due gruppi un aumento significativo dell'intervallo libero da ricadute né della sopravvivenza totale (ST).

Comunque, l'analisi ha rivelato che l'infusione di TIL era statisticamente correlata con una maggior sopravvivenza senza ricaduta in quei pazienti nei quali era invasivo un solo linfonodo e che l'indice stimato di ricaduta era significativamente più basso ($p=0,0285$) e la ST era aumentata ($p=0,039$), quando paragonati a quelli del braccio "IL-2 soltanto". I risultati confermano che le dimensioni della massa tumorale rappresentano un fattore cruciale nell'efficacia delle TIL.

Ridolfi e Amadori³² hanno condotto uno studio-pilota su 22 pazienti con MM in stadio III e IV, che erano stati sottoposti a metastasiectomia radicale e che avevano ricevuto infusioni di TIL e IL-2 secondo lo schema di West.

Otto su 22 pazienti (36,3%) erano DF a un *follow-up* mediano di 5 anni. Nei rimanenti 14 pazienti, la sopravvivenza DF (DFS) è stata del 44% a 2 anni e del 37% a 3 anni, mentre la sopravvivenza totale (OS) è stata, rispettivamente, del 52% e del 45%.

Un'altra promettente applicazione è stata l'impiego di TIL nel carcinoma ovarico. Ikarashi *et al.*³³ hanno stimolato con CD3 e IL-2 linfociti infiltranti carcinomi ovarici e li hanno utilizzati per trattare 12 malate dopo chirurgia e chemioterapia.

Ad un *follow-up* mediano di 22-23 mesi, il gruppo trattato presentava una sopravvivenza del 100% al Kaplan-Meier, mentre la sopravvivenza a 2 anni per le pazienti con cancro ovarico epiteliale progressivo viene riportato fra il 47 e il 63%.

by Schmidt-Wolf and Negrin³⁵, to distinguish them from standard CD3⁻CD16⁺CD56⁺ natural NK or LAK cells and CD3⁺CD56⁻ CTLs.

T cells with NK cell activity (NK-T) have been described in both murine and human tissues. To date, 2 populations of NK-T cells have been described. The first is primarily CD4⁺ and has a restricted TcR repertoire expression.

This population is abundant in the liver and thymus, recognises CD1d and produces large quantities of IL-4. The second is essentially CD8⁺ and has a more variable TcR repertoire. It does not depend on CD1d and has been found primarily in the spleen and bone marrow.

CIK cells are NK-T cells derived from CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T cells and not from NK cells that expand *in vitro* nearly 6.000 fold after 21 days of culture in the presence of IFN- γ , followed by IL-2, monoclonal antibody against CD3 (MoAb anti-CD3) and IL-1. The timing of IFN- γ addition, before IL-2, is critical and results in increased cytotoxicity. IFN- γ stimulates monocytes to produce IL-12 that drives the cells to express a T_H1 phenotype³⁶, synergizes with MoAb anti-CD3 in inducing T cell proliferation and it also enhances NK cytotoxicity.

MoAb anti-CD3 acts as a mitogenic stimulus for all T cells, which can be expanded in the presence of IL-2. After 3 weeks of culture, T cells differentiate into two population: CD3⁺CD56⁺ and CD3⁺CD56⁻. The dominant cell phenotype is CD3⁺CD8⁺TCR α/β ⁺ and a significant proportion expresses HLA-DR and the NK-T cell marker.

The percentage of this population is extremely variable but in normal donors is usually in the range of 20-50%. Maximal generation of CIK cells was obtained from CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T cells, although both CD3⁺CD4⁺CD8⁺ and CD3⁺CD8⁺ cells could generate CIK cells to a lesser extent and mature CIK cells express CD8⁺ and a small percentage of CD4⁺. Differently to NK cells, they do not express the CD16 (Fc γ receptor) surface molecule and thus are not capable of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Evaluation of TcR repertoire using a panel of V β MoAbs showed a varied TcR usage that do not change over time in culture, indicating that the expanded cells are polyclonal.

Expanded CIK cells remain dependent upon exogenous IL-2 because removal of IL-2 leads to a decrease in cell viability and antitumor activity.

Cellule *killer* indotte da citochine (CIK)

Le cellule CIK sono una popolazione unica di cellule T citotossiche, con caratteristico fenotipo CD3⁺CD56⁺, identificate in tessuti sia umani che murini, da Lanier *et al.*³⁴ nel 1986. Tali cellule, morfologicamente simili alla colorazione di Giemsa ai grandi linfociti granulari, hanno un diametro di 16-20 μ , con abbondante citoplasma e numerosi granuli citoplasmatici contenenti proteine *pore-forming* o perforine e granzimi⁵. Le CIK sono rare nel sangue periferico, rappresentando circa il 3% dei linfociti circolanti. Tali cellule, capaci di notevole attività citotossica in grado di lisare un'ampia varietà di cellule tumorali, sono stata denominate CIK da Schmidt-Wolf e Negrin³⁵ per distinguerle dalle cellule NK o LAK CD3⁺CD16⁺CD56⁺ e dalle CTL CD3⁺CD56⁻.

Cellule T con attività NK (NK-T) sono state descritte in tessuti sia umani che murini. Ad oggi, sono state riportate 2 diverse popolazioni NK-T. La prima è essenzialmente CD4⁺ e ha un repertorio TcR ristretto; è abbondante nel fegato e nel timo, riconosce il CD1d e produce grandi quantità di IL-4. La seconda è soprattutto CD8⁺ positiva e ha un repertorio TcR più vario; non dipende dal CD1d e si trova soprattutto nella milza e nel midollo osseo. Le CIK sono cellule NK-T che derivano dai linfociti T CD3⁺CD4⁻CD8⁻ e non dalle NK e possono espandersi *in vitro* circa 6.000 volte dopo 21 giorni di coltura in presenza di IFN- γ , IL-1, OKT3, un anticorpo monoclonale diretto contro il CD3 (MoAb anti-CD3) e IL-2. La cadenza dell'aggiunta di IFN- γ , prima della IL-2, è critica, in quanto aumenta la citotossicità. IFN- γ , stimola i monociti a produrre IL-12, che porta le cellule a esprimere il fenotipo T_H1³⁶, ha un'azione sinergica con MoAb anti-CD3, inducendo proliferazione delle cellule T e aumentando la citotossicità NK. Il MoAb anti-CD3 agisce come stimolo mitogenico per tutte le cellule T, che possono espandersi in presenza di IL-2. Dopo 3 settimane di coltura, le cellule T si differenziano in due popolazioni: CD3⁺CD56⁺ e CD3⁺CD56⁻. Il fenotipo dominante è CD3⁺CD8⁺TCR α/β ⁺ e una percentuale significativa esprime HLA-DR e il marcatore NK-T. La percentuale di tale popolazione è estremamente varia ma nei soggetti normali è usualmente compresa fra il 20 e il 50%. La massima generazione di CIK si ottiene dalle cellule T CD3⁺CD4⁻CD8⁻, benché sia le cellule CD3⁺CD4⁺CD8⁺ sia quelle CD3⁺CD8⁺ possono generare cellule CIK sia pure in misura minore e le

Cytotoxic Activity

CIK cells showed a higher level of cytotoxic activity than LAK cells. In tumor colony assay these cells were capable of generating a log cell kill of 2.5-3.5, that represent an additional increase of about 2 logs as compared with LAK cells. In fact, autologous CIK cells have both *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activity against a broad range of tumor cell lines: OCI-Ly8, SU-DHL-4 (two different human B cell lymphoma cell lines), K-562, autologous and allogeneic tumor cells from patients with Chronic Myeloid Leukaemia (CML) and multidrug resistant cell lines. No major toxic effect on normal haematopoietic cells was showed in CFU-GM assay, so these cells may be superior to LAK cells for the purging of autologous bone marrow in the context of autologous bone marrow transplantation in patients with CML.

Clonogenic tests demonstrated a log cell kill of 3, favourably compared with a cocktail of MoAb for bone marrow purging regimens³⁷.

Mechanism of target cells destruction

The cytotoxicity is non-MHC restricted nor non-ADCC dependent, since these cells do not express CD16 but CIK-cell-mediated, involving the adhesion molecules and vectorial exocytosis of cytotoxic granules content. Cytoplasmic granules contain a pore-forming protein called perforin or cytolysin, granzymes, a family of serine esterase, lysosomal enzymes and proteoglycan molecules. These effector cells recognise tumor cell targets by yet to be identified mechanisms and release cytotoxic granules into the extracellular space at the site of target cell contact, perforin lyse the target cells and granzymes induce apoptosis. Two mechanisms of cytoplasmic granule release are operative.

The first pathway stimulated by CIK recognition structures in concert with Lymphocyte Function associated Antigen (LFA-1) leads to a granule-dependant cytolysis. It is sensitive to increased intracellular cAMP levels and resistant to the immunosuppressive drugs CsA and FK-506.

The second pathway, TcR dependant, which proceeds through stimulation of CD3 or CD3-like receptors on CIK cells, leads to granule-mediated killing that is sensitive to increased intracellular cAMP

CIK mature esprimono il CD8⁺ e una piccola percentuale il CD4⁺. A differenza delle cellule NK, le CIK non esprimono la molecola di superficie CD16 (recettore Fc γ) e, perciò, non sono in grado di attivare una ADCC (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*).

La valutazione del repertorio TcR, utilizzando un pannello di MoAb V β , ha mostrato una varietà di espressione del TcR che non si modifica nel corso della coltura, indicando che le cellule espanse sono policlonali. Le cellule CIK espanse restano dipendenti dall'IL-2 esogena, dato che la rimozione di IL-2 determina una riduzione significativa della vitalità cellulare e dell'attività antitumorale.

Attività citotossica

Le cellule CIK presentano un'attività citotossica superiore alle cellule LAK. Tests clonogenici hanno dimostrato una riduzione della massa cellulare neoplastica pari a 3 log (*range* 2,5-3,5) che rappresenta un aumento di circa 2 log rispetto alle cellule LAK ed è paragonabile a quella ottenuta con un cocktail di MoAb nelle metodiche di *purging* midollare³⁷.

Infatti, le cellule CIK autologhe hanno attività antitumorale, sia *in vitro* che *in vivo*, nei riguardi di un ampio spettro di linee cellulari neoplastiche: OCI-Ly8, SU-DHL-4 (due differenti linee del linfoma umano a cellule B), K-562, blasti di LMC (*Leucemia Mieloide Cronica*) sia di origine autologa che allogenica e linee cellulari *multidrug resistant*. Nello stesso tempo, non si è dimostrato alcun effetto tossico maggiore sui normali progenitori ematopoietici nei test con CFU-GM, così che tali cellule possono dimostrarsi migliori delle LAK anche per il *purging* del midollo osseo nel trapianto autologo in pazienti con LMC³⁷.

Meccanismi della distruzione delle cellule-bersaglio

La citotossicità non è MHC-ristretta né ADCC-dipendente, dal momento che tali cellule non esprimono il CD16, ma è mediata dal contatto cellula CIK/cellula *target*, coinvolgendo le molecole di adesione e l'esocitosi vettoriale del contenuto dei granuli citotossici.

I granuli citoplasmatici contengono proteine *pore-forming*, denominate perforine o citolisine, i granzimi,

levels, CsA and FK-506. The first pathway is usually the dominant one; in fact, antibodies against LFA-1 and its counter receptor, Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), blocked CIK cell-mediated tumor cell lysis, while antibodies to MCH class I and II molecules on target cells or antibodies against TCR α/β^+ , CD3, CD4, CD8, CD56 do not block cytolytic activity. To date, only disruption of the LFA-1 (α chain-CD11a and β chain-CD18) and ICAM-1 (CD54) interaction has been shown to inhibit expanded CIK cell cytotoxic activity whereas T cell receptor activation is not.

In contrast, monoclonal antibodies against multidrug resistance P-glycoprotein (Pgp) did not block the lysis of tumor cells resistant to chemotherapy by CIK cells. This indicates that Pgp is not directly involved in the interaction between tumor target and CIK effector cells and that CIK cells possess a high level of cytotoxic activity against tumor cell lines resistant to chemotherapeutic agents and may be useful in overcoming disease caused by drug resistance. Furthermore, Verneris *et al.*³⁸ investigated the sensitivity of CIK cells to Fas-mediated apoptosis and showed that Fas engagement leads to apoptosis in small numbers of CIK cells and does not significantly influence antitumor cytotoxicity.

***In vivo* antitumor activity**

In 1994, Lu and Negrin³⁷ have used SCID mice injected with SU-DHL-4 cells to evaluate the *in vivo* antitumor effects of CIK cells vs LAK cells. Groups of animals injected with CIK cells, one day after inoculation with SU-DHL-4 cells, had significantly prolonged survival as compared to control animals injected with tumor cells alone ($p < 0.001$) or animals treated with LAK cells ($p < 0.002$).

About 45% of animals treated with CIK cells became long-term survivors (>100 days) showing no molecular evidence of occult lymphoma after 6 months as compared to none of the animals treated with LAK cells. Recently, Hoyle *et al.*³⁹ proved that Philadelphia (Ph) chromosome negative CIK cells may be expanded from patients with CML in chronic phase or blast crisis. These cells produce cytokines such as IL-2, IFN- γ and TNF- α and have *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity against tumor cell lines and autologous leukaemic cells.

To test the *in vivo* efficacy of CIK cells, they

una famiglia di serin-esterasi, gli enzimi lisosomiali e molecole di proteoglicano. Queste cellule effettrici riconoscono le cellule tumorali bersaglio mediante meccanismi non ancora identificati, rilasciano granuli citotossici nello spazio extracellulare del punto di contatto con le cellule bersaglio, mentre le perforine lisano le cellule bersaglio e i granzimi inducono apoptosi. Sono operativi due meccanismi di degranulazione.

Il primo, mediato dal LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen*), determina una citolisi indotta dai granuli. Il meccanismo è sensibile agli aumenti intracellulari dei livelli di cAMP (*cyclic Adenosine MonoPhosphate*) e non è inibito dai farmaci immunosoppressori, CsA ed FK-506. Il secondo, TcR-dipendente, agisce attraverso la stimolazione dei recettori CD3 e CD3-*like* sulle cellule CIK e determina una citolisi mediata dai granuli, sensibile all'aumentato livello intracellulare di cAMP, di CsA e di FK-506. Il primo meccanismo è solitamente dominante; infatti gli anticorpi anti-LFA-1 e anti-ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecole 1*) bloccano la lisi delle cellule tumorali mediata dalle CIK, mentre gli anticorpi diretti contro le molecole HLA di I e II classe sulle cellule bersaglio o quelli contro TCR α/β^+ , CD3, CD4, CD8, CD56 non bloccano l'attività citolitica. Attualmente, soltanto la rottura dell'interazione fra LFA-1 (catena α di CD11a e catena β di CD18) e ICAM-1 (CD54) si è dimostrata in grado di inibire l'aumentata attività citolitica delle cellule CIK, mentre l'attivazione dei recettori delle cellule T non lo fa.

Al contrario, gli anticorpi monoclonali contro la glicoproteina P (Pgp), responsabile della *multidrug resistance*, non bloccano la lisi da parte delle cellule CIK di cellule tumorali resistenti alla chemioterapia. Ciò indica che la Pgp non è direttamente coinvolta nell'interazione fra cellula bersaglio tumorale e cellule CIK effettrici e che tali cellule posseggono un alto livello di attività citotossica contro linee cellulari tumorali che resistono agli agenti chemioterapici e, quindi, possono essere utili nel superare malattie causate da resistenza ai farmaci.

Infine, Verneris *et al.*³⁸ hanno investigato la sensibilità delle cellule CIK all'apoptosi Fas-mediata e hanno dimostrato che il coinvolgimento del Fas porta all'apoptosi di un piccolo numero di cellule CIK e non influenza significativamente la citotossicità antineoplastica.

engrafted CML into SCID mice and demonstrated that a single CIK cell infusion bearing human CML, without the exogenous administration of IL-2, induced the disappearance of Philadelphia positive cells in the spleen of 12/14 animals.

CIK cells negative for abnormal transcripts, such as bcl-2, CBFb/MYHII were also obtained from positive acute leukaemia or lymphoma samples⁴⁰.

Graft versus Host Disease and Graft versus Leukaemia effect

Baker *et al.*⁴¹ tested the potential benefit of CIK cells in a model of purified haematopoietic stem cells (HSC) transplantation across MHC barriers into tumor bearing mice.

In this model, purified HSC have no GvL effect and mice succumb to lymphoma within 8 weeks post-transplant.

In contrast, a significant proportion of the mice (>50%) engrafted with HSC and 1×10^7 CIK cells survived without evidence of tumor growth and in absence of GvHD, while the control group, injected with 2×10^6 splenocytes, died of GvHD within 14 days.

Chimerism analysis of the peripheral blood showed that all mice were 100% donor derived T cells and a significant number of CIK cells at 3 weeks post-transplant (2-10% of PB T cells) were found.

These results suggest that CIK cells have the ability to produce little or no GvHD due to IFN- γ production and confer GvL activity *in vivo*.

Furthermore, the Authors observed that a single injection of expanded CD8⁺NKT cells was capable of protecting animals from an otherwise lethal dose of Bcl1 leukaemia cells. In the same time, this cells produced far less GvHD than splenocytes across MHC barriers, even when 10 times the number of CD8⁺NKT cells as compared to splenocytes were injected.

In conclusion, these studies showed that CIK cells are a phenotypically unique population that produce cytokine of the T_H1 type and have innate tumor immunity against a variety of autologous and allogeneic tumor cells, but are not pan-reactive to alloantigens.

On the basis of these experimental observations, that demonstrate the potential clinical utility, phase I/II clinical trials with autologous CIK cells are currently under investigation in patients with advanced-stage lymphoma and metastatic solid tumor.

Attività antitumorale in vivo

Nel 1994, Lu e Negrin³⁷ hanno usato topi immunodeficienti inoculati con cellule della linea SU-DHL-4 per paragonare gli effetti antitumorali *in vivo* di cellule CIK con quelli delle cellule LAK. Gli animali trattati con cellule CIK, un giorno dopo l'inoculazione di SU-DHL-4, hanno mostrato una sopravvivenza significativamente prolungata rispetto agli animali di controllo inoculati con sole cellule tumorali ($p < 0,001$) o con cellule LAK ($p < 0,002$). Il 45% circa degli animali trattati con cellule CIK sono divenuti "lunghi sopravvivenenti" (>100 giorni), non mostrando, dopo 6 mesi, nessuna evidenza molecolare di linfoma occulto in contrasto alla mancata sopravvivenza di tutti gli animali trattati con cellule LAK. Di recente, Hoyle *et al.*³⁹ hanno dimostrato che si possono espandere cellule CIK, Philadelphia (Ph) negative, provenienti da pazienti affetti da LMC in fase cronica o in crisi blastica. Tali cellule producono citochine come IL-2, IFN- γ e TNF- α e risultano citotossiche sia *in vitro* che *in vivo* contro linee cellulari neoplastiche o contro cellule leucemiche autologhe. Per testare l'efficacia *in vivo* delle cellule CIK, gli Autori hanno fatto attecchire LMC in topi immunodeficienti e hanno dimostrato che un singolo inoculo di cellule CIK, senza somministrazione esogena di IL-2, induceva la scomparsa di cellule Ph-positive nella milza di 12 su 14 animali.

Cellule CIK negative per trascritti anomali, quali bcl-2, CBFb/MYHII, sono state ottenute anche da campioni provenienti da soggetti affetti da leucemia acuta o da linfomi⁴⁰.

Graft versus Host Disease(GvHD) ed effetto Graft versus Leukaemia (GvL)

Baker *et al.*⁴¹ hanno esaminato su topi affetti da tumore il potenziale effetto benefico delle cellule CIK trapiantando, al di là della barriera MHC, cellule staminali emopoietiche (CSE) purificate. In questo modello, le CSE purificate non inducevano alcun effetto GvL e i topi soccombevano al linfoma entro 8 settimane dal trapianto. Al contrario, una percentuale significativa (>50%) di topi, trapiantati con CSE e con 1×10^7 cellule CIK sopravviveva, non evidenziando un accrescimento del tumore né GvHD; il gruppo di controllo, che riceveva 2×10^6 splenociti, moriva di GvHD entro 14 giorni. Le analisi sul

Clinical Trials

In 1999, Schmidt-Wolf *et al.*⁴² published the data of the first trial conducted in 10 patients in progressive disease: 1 had metastatic renal cell carcinoma, 7 colorectal cancer and 2 follicular lymphoma.

Patients received 1-5 intravenous infusions of IL-2 transfected CIK cells and 5 infusions with untransfected CIK cells. They obtained a median of 35×10^8 CIK cells with a range of 2.2 - 125×10^8 . Three patients developed WHO grade 2 fever that resolved with or without antibiotic treatment. No other adverse events were detected.

Clinical outcome in 3 patients showed no change of disease and 1 patient affected by follicular lymphoma obtained complete remission with low amount of IL-2. These data appears promising in patients with progressive metastatic disease resistant to chemotherapy and show that transfection is not absolutely necessary for effectiveness of CIK cells *in vivo*.

In 2000, at the 42^o annual meeting of the American Society of Hematology, Leemhuis and Negrin presented preliminary results from the first 9 patients with advanced Hodgkin's disease and Non Hodgkin's lymphoma treated with escalating doses of CIK cells in an ongoing phase I safety trial. At the higher dose levels patients received 9.4×10^9 CD3⁺ cells (120×10^6 /Kg) and 3.0×10^8 - 5.8×10^8 CD3⁺CD56⁺ cells.

Toxicity was minimal and there were no immediate adverse reactions to the infusions.

Clinical outcome demonstrated 2 partial responses and 2 stabilization of disease, that represent an encouraging result obtained in heavily pre-treated patients with advanced disease.

Wang *et al.*⁴³ designed a study to evaluate the effect of adoptive transfer of autologous CIK cells on 13 patients with primary hepatocellular carcinoma. Patients, all with hepatocirrhosis with more than 20 years of chronic HBV infection, received 3-5 $\times 10^9$ cells.

After CIK cells therapy no side effects on liver and kidney were found, the average HBV viral load decreased, liver function and host immune responses improved.

A phase I safety trial with CIK cells is ongoing at Pescara Hospital⁴⁴. At present, 8 patients were enrolled, 6 advanced lymphomas and 2 kidney carcinoma. They received a median of $14,5 \times 10^9$ cells

chimerismo nel sangue periferico mostrava che tutti i topi avevano il 100% di cellule T di origine del donatore e veniva trovato un numero significativo (dal 2 al 10%) di cellule CIK, 3 settimane dopo il trapianto. Questi risultati indicano che le cellule CIK hanno la capacità di determinare poca o nessuna GvHD grazie alla produzione di IFN- γ e conferiscono attività GvL *in vivo*. Inoltre, gli Autori hanno constatato che una singola iniezione di cellule CD8⁺NKT espanso era in grado di proteggere gli animali da una dose, altrimenti letale, di cellule leucemiche Bcl-1. Al tempo stesso, inducevano meno GvHD rispetto agli splenociti, oltre la barriera MHC, anche quando veniva iniettato un numero 10 volte maggiore di cellule CD8⁺NKT.

In conclusione, queste ricerche hanno dimostrato che le cellule CIK rappresentano una popolazione unica che produce citochine del tipo T_H1; possiedono un'immunità naturale contro una serie di cellule tumorali autologhe e allogene ma non sono pan-reattive agli alloantigeni. Sulla base di tali osservazioni sperimentali che dimostrano la loro potenziale utilità clinica, sono attualmente in studio sperimentazioni cliniche in fase I/II condotte con cellule CIK autologhe in pazienti affetti da linfomi in fase avanzata o da tumori solidi metastatici.

Sperimentazioni cliniche

Nel 1999, Schmidt-Wolf *et al.*⁴² hanno pubblicato i dati relativi al primo *trial* effettuato su 10 pazienti con malattia progressiva: 1 con carcinoma renale metastatico, 7 con cancro coloretale e 2 con linfoma follicolare. I pazienti avevano ricevuto da 1 a 5 infusions endovenose di cellule CIK trasfettate con il gene dell'IL-2 e 5 infusions di cellule CIK non trasfettate. La mediana di cellule CIK infuse era di 35×10^8 (*range* fra 2,2 e 125×10^8). Tre pazienti hanno accusato episodi febbrili (2^o WHO) risolti con o senza trattamento antibiotico. Non si sono evidenziati altri effetti sfavorevoli. I risultati clinici hanno evidenziato stabilizzazione di malattia in 3 pazienti, progressione in 6, mentre 1 paziente, affetto da linfoma follicolare, ha ottenuto una remissione completa pur in presenza di bassi livelli di IL-2. Questi dati appaiono promettenti in quanto si tratta di pazienti con malattia progressiva metastatica e resistente alla chemioterapia e dimostrano che la trasfezione con il gene dell'IL-2 non è assolutamente necessaria per l'efficacia delle cellule CIK *in vivo*.

(range: 6,4–30,7 $\times 10^9$) and the absolute number of CD3+CD56+ cells infused ranged from 2.5 $\times 10^9$ to 9.1 $\times 10^9$.

Our preliminary results showed that feasibility and protocol adherence were excellent and the toxicity profile was favourable.

Only 2 patients developed WHO grade 2 fever during the first cycle of infusions (5%), recovered without antibiotic treatment.

Final Consideration and Conclusion

Advances in cellular and molecular immunology in the last 20 years have provided to develop strategies that augment antitumor responses.

In order to fulfil this potential, there are several points to consider.

First, despite the success *in vitro* and in experimental animals, where adoptive immunotherapy exhibited a strong anti-tumor effect, clinical results in humans were disappointing.

Two major areas currently requiring investigation are the survival and localisation of adoptively transferred cells in the tumor-bearing host and the detailed mechanism of tumor regression. The ability of adoptive immunotherapy to eradicate an established tumor is quantitatively determined by the initial tumor burden, growth pattern and the immunologic response generated by cells infused. Thus, to achieve tumor eradication and minimise systemic toxicity, the explanation of the mechanisms underlying lymphocyte biodistribution and the factors governing effector cells uptake in tumor sites are critical, but unfortunately data about cell distribution in humans are scarce.

Clinical studies of adoptive transfer of activated lymphocytes have in many cases showed poor lymphocyte survival or function. An exception has been in patients after stem cells transplantation, where the proliferative environment favours expansion of infused lymphocytes.

Recently, Rosenberg's group described how a proliferative environment could be artificially induced by administration of fludarabine and cyclophosphamide. Selective expansion of infused T cells might also be obtained by using monoclonal antibodies to deplete the lymphoid compartment prior T cells infusion⁴⁵.

Nel 2000, al 42° Incontro Annuale della Società Americana di Ematologia, Leemhuis e Negrin hanno presentato i risultati preliminari di una sperimentazione in corso di fase I, ottenuti nei primi 9 pazienti affetti da forme in fase avanzata di linfomi Hodgkin e non-Hodgkin trattati con dosi scalari di cellule CIK. Alle dosi maggiori, i pazienti avevano ricevuto 9,4 $\times 10^9$ cellule CD3+ (120 $\times 10^6$ /Kg) e fra 3 e 5,8 $\times 10^8$ di cellule CD3+CD56+. La tossicità si è dimostrata minima e non si sono verificate reazioni sfavorevoli. I risultati clinici hanno testimoniato 2 risposte parziali e 2 stabilizzazioni di malattia, che rappresentano un risultato incoraggiante, ottenuto in pazienti pesantemente pretrattati e con malattie in fase avanzata. Wang *et al.*⁴³ hanno disegnato uno studio per verificare gli effetti del trasferimento adottivo di cellule CIK in 13 pazienti affetti da epatocarcinoma primario. I pazienti, ognuno dei quali con storia, da oltre 20 anni, di cirrosi epatica per infezione cronica da HBV, ha ricevuto una dose di 3-5 $\times 10^9$ cellule CIK. In seguito a tale trattamento, non si è avuto alcun effetto collaterale a carico di fegato e rene, il carico virale HBV è diminuito, la funzione epatica e la risposta immune migliorate.

È attualmente in corso all' Ospedale di Pescara una sperimentazione clinica in fase I con cellule CIK⁴⁴. Al momento, sono stati arruolati 8 pazienti: 6 con linfoma in fase avanzata e 2 con carcinoma renale. Essi hanno ricevuto una dose mediana di 14,5 $\times 10^9$ cellule (range: 6,4-30,7 $\times 10^9$) e il numero assoluto di cellule CD3+CD56+ variava fra 2,5 e 9,1 $\times 10^9$. I nostri risultati preliminari mostrano che la fattibilità e l'aderenza al protocollo sono stati eccellenti e la tossicità minima. Soltanto nel corso di 2 infusioni (5%) è insorta febbre di 2° WHO, risolta spontaneamente senza necessità di trattamento antibiotico.

Considerazioni finali e conclusioni

I progressi nell'immunologia cellulare e molecolare conseguiti negli ultimi 20 anni hanno permesso di sviluppare strategie per accrescere le risposte antitumorali. Al riguardo, sono da prendere in considerazione alcuni aspetti. In primo luogo, nonostante i successi ottenuti *in vitro* e negli esperimenti animali, nei quali l'immunoterapia adottiva ha testimoniato un forte effetto antitumore, i risultati clinici sull'uomo si sono dimostrati deludenti.

T cells biodistribution was studied in the early 90's years. Wong *et al.*⁴⁶ showed in a mouse model that TIL preferentially localize in the liver and lungs. In contrast, Fisher *et al.*, in trafficking studies employing TIL radiolabeled with ¹¹¹In, have shown that TIL do traffic to tumor sites, this homing property should produce high concentration of TIL and probably remain in the area of the tumor⁴⁷.

Hardy *et al.*⁴⁸ examined trafficking of CIK cells *in vivo* using a retroviral transduction system to label the cells with a gfp/luciferase fusion protein. Shortly, after i.v. injection transduced cells were detectable in the lungs, 16 hours later they were located in liver and spleen and infiltrated the tumor subcutaneously after 72 hours. They were detectable at this tumor site for the following 9 days until the tumor was finally eradicated.

Secondly, a potential factor in the limited success of immunotherapy has been the presence of large tumor burden at the time of treatment. Therefore, patients who have achieved a minimal residual disease state, such as that following autologous haemopoietic stem cell transplantation, may represent a more advantageous clinical setting.

Thirdly, another still unsolved problem is the definition of a critical threshold numbers of T cells transfused and duration of treatment. Clinical studies didn't show any correlation between larger numbers of T cells infused and better outcome, so large amounts of cells didn't seem to be crucial in order to obtain remarkable clinical responses; this suggesting an effect of immunomodulation partially influenced by microenvironment as well as by the cells with which they interact. Future studies should evaluate the reasons for and timing of discontinuation of therapy to maximize effects. In fact, there are no clear data and follow-up should be long because of late recurrence.

Forthly, cellular therapy is a rapidly evolving field with incremental technological advances in cellular manipulation, *ex vivo* expansion, cell activation and genetic modification.

In recent years, techniques have grown dramatically in sophistication, requiring complex procedures that have led to a fundamental change in cell-therapy laboratory.

In fact, the development of cellular therapies has been accompanied by a parallel evolution in the regulations governing them. In the USA, the Food

Le principali aree di interesse, che richiedono, attualmente, ulteriori ricerche, riguardano la sopravvivenza e la localizzazione dei siti dove trasferire le cellule adottive nel soggetto colpito da tumore, nonché l'individuazione dei meccanismi che sovrintendono alla regressione del tumore. La capacità dell'immunoterapia adottiva di estirpare un tumore consolidato è determinata, dal punto di vista quantitativo, dalle sue dimensioni iniziali, dal ritmo di accrescimento e dalla risposta immune generata dalle cellule infuse. Quindi, per ottenere l'eradicazione del tumore e minimizzare la tossicità del trattamento, assume valore critico la comprensione dei meccanismi che sottendono alla biodistribuzione dei linfociti e dei fattori che governano l'attecchimento delle cellule effettrici ai siti tumorali, ma sfortunatamente i dati al riguardo nell'uomo sono scarsi.

Gli studi clinici sul trasferimento adottivo di linfociti attivati hanno dimostrato, in molti casi, modeste sopravvivenze e funzionalità dei linfociti. Un'eccezione si è avuta nei pazienti dopo trapianto di CSE, nei quali l'ambiente favorisce l'espansione proliferativa dei linfociti infusi. Recentemente, il gruppo di Rosenberg ha descritto come si possa indurre artificialmente un microambiente favorevole alla proliferazione, somministrando fludarabina e ciclofosfamide. Una selettiva espansione dei linfociti T infusi si può anche ottenere utilizzando anticorpi monoclonali per una deplezione del comparto linfoide, prima dell'infusione delle cellule T⁴⁵.

La distribuzione biologica delle cellule T è stata studiata nei primi anni 90. Wong *et al.*⁴⁵ hanno dimostrato, in un modello murino, che i TIL si localizzano, preferibilmente, nel fegato e nei polmoni. Fisher *et al.*⁴⁶, al contrario, in studi di traffico cellulare impiegando TIL radiomarcanti con ¹¹¹In, hanno dimostrato che i TIL si dirigono ai siti tumorali e che questa proprietà di *homing* (accasamento) può determinare un'alta concentrazione di TIL e, probabilmente, il loro permanere nell'area tumorale⁴⁷.

Hardy *et al.*⁴⁸ hanno esaminato il traffico delle cellule CIK *in vivo* utilizzando un sistema di trasduzione virale per marcare le cellule con la proteina di fusione gfp/luciferasi. In breve, dopo iniezione endovenosa, le cellule così trattate sono state ritrovate nei polmoni, 16 ore più tardi nel fegato e nella milza e dopo 72 ore hanno infiltrato il tumore a livello cutaneo. Le cellule sono rimaste nel sito del tumore per i 9 giorni seguenti finché la neoplasia non era del

and Drug Administration, which corresponds to the Italian Istituto Superiore di Sanità (ISS), is the principal agency with risk-based regulatory oversight over cellular manipulation. In 1993 they published a document⁴⁹ with the intent to regulate cell and gene therapy products, by preventing improper processing that could result in product contamination or other adverse effects, and to ensure clinical safety and effectiveness.

Manufactures belonging to a lower risk category are termed "*minimally manipulated products*" and are not obliged to operate under full Good Manufacturing Practices (GMPs), but must comply with Good Tissue Practice (GTPs) regulations.

Clinical trials of higher risk, "*more-than-minimally manipulated products*", that include *ex vivo* culture, cell activation, genetic modification, must comply with both GMPs and GTPs.

Nearly all advanced cellular therapy would be considered *more-than-minimally manipulated*. These guidelines are always difficult to apply and the scale-up phase introduces several variables affecting the outcome⁵⁰. In fact, GMP manufacturing includes validation, control, and documentation of reagents and equipment as well as the environment within which the manufacturing occurs. The manufacturing of each lot of product must be documented and each lot must be shown to have certain characteristics, should have clinical grade avoiding animal products and should be approved for human use.

Current facilities tend to be extremely expensive, time consuming and complex but as processes are becoming more reproducible, closed and possibly automated obtaining a final product of high quality and more safety.

In conclusion, current studies, designed to augment immunologic activity, involve a combination of both dendritic cell and T-cell manipulations; they are aimed at the discovery of tumor antigens that focus the specificity of the immune system on cancer cells and understanding the mechanisms of tumor escape. One of several approaches currently being pursued is targeting universal human tumor-associated Ags and clinical studies are now underway. The identification of widely applicable immunological targets in cancer might eventually open the road to truly prevent strategy.

Finally, cellular therapy represents an exciting therapeutic approach that might have a favourable

tutto eradicata. In secondo luogo, uno dei fattori che può limitare il successo dell'immunoterapia è rappresentato dalle dimensioni della massa tumorale al momento del trattamento. Quindi, i pazienti con minima malattia residua, come quella riscontrabile dopo trapianto autologo di CSE, possono rappresentare la situazione clinica più vantaggiosa.

Per terza cosa, un problema ancora irrisolto è definire il numero-soglia critico di cellule T da trasfondere e la durata del trattamento. Gli studi clinici non hanno mostrato una correlazione fra un maggior numero di T infuse e migliore risultato, così che una gran quantità di cellule non è sembrata essere cruciale per ottenere risposte cliniche rilevanti. Ciò suggerisce un effetto immunomodulativo parzialmente influenzato dal microambiente e dalle cellule che vi interagiscono. Studi futuri dovranno valutare il momento e i motivi per sospendere la terapia, al fine di ottenere il massimo risultato. Non vi sono, infatti, dati chiari e il *follow-up* dovrebbe essere più lungo in caso di ricadute tardive. In quarto luogo, la terapia cellulare rappresenta un campo in rapido sviluppo, con progressi tecnologici in continua evoluzione riguardanti la manipolazione delle cellule, l'espansione *ex vivo*, l'attivazione e le modificazioni genetiche.

Negli anni recenti, le tecniche si sono evolute verso livelli di estrema sofisticazione, coinvolgendo procedure complesse, che hanno determinato mutamenti fondamentali nel laboratorio di terapia cellulare. Lo sviluppo della terapia cellulare si è accompagnato, anche, ad un'evoluzione parallela delle normative che la regolano. Negli Stati Uniti, l'FDA (*Food and Drug Administration*), che corrisponde all'Istituto Superiore di Sanità in Italia, è la principale agenzia che sovrintende alle norme sul rischio per la manipolazione cellulare. Nel 1993, l'FDA ha pubblicato un documento⁴⁹ per regolamentare i prodotti delle terapie cellulari e geniche, al fine di prevenire procedimenti impropri che potrebbero condurre alla contaminazione dei prodotti o ad altri effetti sfavorevoli e per assicurare sicurezza ed efficacia clinica. I prodotti a più basso rischio vengono definiti *prodotti di minima manipolazione* e non sono obbligati a rispettare completamente le norme GMP (*Good Manufacturing Practices*), ma debbono uniformarsi alle regole GTP (*Good Tissue Practice*).

Gli esperimenti clinici a più alto rischio (*prodotti di manipolazione più che minima*), cioè le colture *ex vivo*, l'attivazione cellulare, e le modificazioni geniche

impact on conventional treatment strategy of malignancies becoming a remarkable part of the therapeutic arsenal utilised to prevent or cure cancer in a more efficient way.

debbono conformarsi sia a GMP che a GTP.

Praticamente, tutte le più avanzate forme di terapia cellulare si debbono considerare prodotti di manipolazione più che minima. Le linee-guida al proposito sono sempre difficili da applicare e gli sviluppi progressivi introducono numerose variabili in grado di modificare i risultati⁵⁰. Infatti, le GMP richiedono validazioni, controlli e documentazioni di reagenti e attrezzature e anche dell'ambiente, all'interno del quale vengono preparati i prodotti. La preparazione di ogni lotto di prodotto deve essere documentato e ogni lotto deve dimostrare di possedere certe caratteristiche, non contenere prodotti animali ed essere approvato per uso umano. Le presenti strutture e strumentazioni tendono a essere estremamente costose, dispersive e complesse, ma, quando le procedure diverranno più riproducibili, più semplici e possibilmente automatizzate, potremmo ottenere prodotti finali di alta qualità e più sicuri.

In conclusione, gli studi attuali, progettati per accrescere l'attività immunologica, coinvolgono la manipolazione di cellule dendritiche e cellule T; essi tendono alla individuazione di antigeni tumorali in grado di focalizzare la risposta specifica del sistema immune sulle cellule tumorali e alla comprensione dei meccanismi di elusione messi in atto dal tumore. Uno, fra i molti nuovi approcci che vengono perseguiti, è targare tutti gli antigeni tumorali umani e sono attualmente in atto studi clinici al riguardo. L'identificazione di *target* immunologici applicabili in clinica potrebbe, alla fine, aprire la strada a strategie di sicura prevenzione. Infine, la terapia cellulare rappresenta un eccitante approccio terapeutico che può avere un impatto positivo nei confronti della chemioterapia convenzionale, diventando una parte importante dell'arsenale terapeutico per prevenire e/o curare i tumori con modalità più efficaci.

References

- 1) Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893; **105**: 487-511.
- 2) Rosenberg SA, Terry WD. Passive immunotherapy of cancer in animals and man. *Adv Cancer Res* 1977; **25**: 323-88.
- 3) Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; **274**: 94-6.
- 4) Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* 1985; **75**: 595-603.
- 5) Heslop HE, Stevenson FK, Mollrem JJ. Immunotherapy of hematologic malignancy. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003; 331-49.
- 6) Lowdell MW. Non-MHC-restricted cytotoxic cells: their roles in the control. *Br J Haematol* 2001; **114**: 11-24.
- 7) Costello RT, Fauriat C, Rey J, et al. Immunobiology of haematological malignant disorders: the basis for novel immunotherapy protocols. *Lancet Oncol* 2004; **5**: 47-55.
- 8) Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004; **305**: 200-5.
- 9) Klingemann HG. Cellular therapy of cancer with natural killer cells: will it ever work? *J Hematother Stem Cell Res* 2001; **10**: 23-6.
- 10) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant IL-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med* 1985; **313**: 1485-92.
- 11) Fisher RI, Coltman CA Jr, Doroshow JH, et al. Metastatic renal cancer treated with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. A phase II clinical trial. *Ann Intern Med* 1988; **108**: 518-23.
- 12) Dutcher JP, Creekmore S, Weiss GR, et al. A phase II study of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in patients with metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 1989; **7**: 477-85.
- 13) Paciucci PA, Holland JF, Glidewell O, Odchimar R. Recombinant interleukin-2 by continuous infusion and adoptive transfer of recombinant interleukin-2-activated cells in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1989; **7**: 869-78.
- 14) Stahel RA, Sculier JP, Jost LM, et al. Tolerance and effectiveness of recombinant interleukin-2 (r-met Hu IL-2 [ala-125]) and lymphokine-activated killer cells in patients with metastatic solid tumors. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; **25**: 965-72.
- 15) Negrier S, Philip T, Stoter G, et al. IL-2 with or without LAK cells in metastatic renal cell carcinoma: a report of a European multicentre study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; **25** Suppl 3: 21-8.
- 16) McCabe MC, Stablein D, Hawkins MJ. The modified group C experience-phase III randomized trials of IL-2 vs IL-2/LAK cells in advanced renal cell carcinoma and advanced melanoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1991; **10**: 213a.
- 17) Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Prospective randomized trial of high dose IL-2 alone or in conjunction with LAK cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 622-32.
- 18) Keilholtz U, Scheibenbogen C, Brado M, et al. Regional adoptive immunotherapy with Interleukin 2 and lymphokine-activated killer (LAK) cells for liver metastases. *Eur J Cancer* 1994; **30**: 103-5.
- 19) Murray Law T, Motzer RJ, Mazumdar M, et al. Phase III randomized trial of Interleukin 2 with or without lymphokine-activated killer cells in the treatment of patients with advanced metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 1995; **76**: 824-32.
- 20) Kimura H, Yamaguchi Y. A Phase III randomised study of IL-2 lymphokine-activated killer cell immunotherapy combined with chemotherapy or radiotherapy after curative or non curative resection of primary lung carcinoma. *Cancer* 1997; **80**: 42-9.
- 21) Pizza G, De Vinci C, Lo Conte G, et al. Immunotherapy of metastatic kidney cancer. *Int J Cancer* 2001; **94**: 109-20.
- 22) Dillman RO, Duma CM, Schiltz PM, et al. Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma. *J Immunother* 2004; **27**: 398-404.
- 23) Alexander RB, Rosenberg SA. Adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocytes can cure established metastatic tumor in mice and persist long-term in vivo as functional memory T lymphocytes. *J Immunother* 1991; **10**: 389-97.
- 24) Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumour-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986; **233**: 1318-21.
- 25) Topalian SL, Solomon D, Avis FP. Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant IL-2: a pilot study. *J Clin Oncol* 1988; **6**: 839-53.
- 26) Rosenberg SA, Packard BS, Aebbersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and IL-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med* 1988; **319**: 1676-80.
- 27) Arienti F, Belli F, Rivoltini L, et al. Adoptive immunotherapy of advanced melanoma patients with interleukin-2 (IL-2) and tumor-infiltrating lymphocytes selected in vitro with low doses of IL-2. *Cancer Immunol Immunother.* 1993; **36**: 315-22.
- 28) Goedegebuure PS, Douville LM, Li H. Adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes and IL-2 in patients with metastatic malignant melanoma and renal cell carcinoma: a pilot study. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 1939-49.
- 29) Ratto GB, Zino P, Mirabelli S, et al. A randomized trial of adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 versus standard therapy in the postoperative treatment of resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 1996; **78**: 244-51.

- 30) Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM, et al. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 2521-9
- 31) Dreno B, Nguyen JM, Khammari A, et al. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2002; **51**: 539-46.
- 32) Ridolfi L, Ridolfi R, Riccobon A, Amadori D. Adjuvant immunotherapy with tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in patients with resected stage III and IV melanoma. *J Immunother*. 2003; **26**: 156-62.
- 33) Ikarashi H, Fujita F, Takakuwa K. Immunomodulation in patients with epithelial ovarian cancer after adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Res* 1994; **54**: 190-196.
- 34) Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, et al. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 1986; **137**: 2735-9.
- 35) Schmidt-Wolf IGH, Negrin RS. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J. Exp. Med.* 1991; **174**: 139-49.
- 36) Ma X, Chow JM, Grig G, et al. The IL-12 p40 gene promoter is primed by IFN- γ in monocytic cells. *J of Exp Med* 1996; **183**: 147-57.
- 37) Lu PH, Negrin RS: A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo anti-tumor activity in SCID mouse. *J of Immunol* 1994; **153**: 1687-96.
- 38) Verneris MR, Kornacker M, Mailänder V, et al. Resistance of ex vivo expanded CD3+CD56+ T cells to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 2000; **49**: 335-45.
- 39) Hoyle C, Bangs CD, Chang P, et al. Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3+CD56+ cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: In vitro and In vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice. *Blood* 1998; **92**: 3318-27.
- 40) Olioso P, Giancola R, Di Riti M, et al. Cytokine induced killer cells expansion from leukemic samples. *Haematologica* 2002, **87** Suppl 1: 135-6.
- 41) Baker J, Verneris MR, Ito M, et al. Expansion of cytolytic CD8+ NK-T cells with limited capacity for Graf versus Host Disease induction due to IFN- γ production. *Blood* 2001; **97**: 2923-31.
- 42) Schmidt-Wolf IGH, Finke S, Trojaneck B, et al. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma. *Br J Cancer* 1999; **81**: 1009-16.
- 43) Wang FS, Liu MX, Zhang B, et al. Antitumor activities of human autologous CIK cells against hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002; **8**: 464-8.
- 44) Olioso P, Giancola R, Di Riti M, et al. Preliminary data of Phase I Clinical Trial with autologous Cytokine Induced Killer cells in patients with advanced malignancies. *Blood* 2003; **102** Suppl: 57 (Proc Am Soc Hematol 2003).
- 45) Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002; **298**: 850-4.
- 46) Wong RA, Alexander RB, Puri RK, Rosenberg SA. In vivo proliferation of adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocytes in mice. *J Immunother* 1991; **10**: 120-30.
- 47) Fisher B, Packard BS, Read EJ, et al. Tumor localization of adoptively transferred indium-¹¹¹ labeled tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1989; **7**: 250-61.
- 48) Hardy J, Edinger M, Bachmann MH, et al. Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. *Exp Hematology* 2001; **29**: 1353-60.
- 49) Kessler DA, Siegel JP, Noguchi PD et al. Regulation of somatic cell therapy and gene therapy by the Food and Drug Administration. *N Engl J Med* 1993; **329**: 1169-73.
- 50) Gastineau DA. Will regulation be the death of cell therapy in the USA. *Bone Marrow Transplant* 2004; **33**: 777-80.