UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI

XXXIV Ciclo
(Anni 2018-2021)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

BIOMARCATORI CIRCOLANTI INDICATIVI DI RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON IMMUNOTERAPIA IN PAZIENTI AFFETTI DA MELANOMA METASTATICO: RUOLO DEL CD73

TUTOR

Chiar.mo
Prof. Maria Rosaria Galdiero

CANDIDATO

Dott. Gabriele Madonna
Matr. DR994052

Alla mia Tribù

"We refuse to be
What you wanted us to be
We are what we are
That's the way it's going to be, if you don't know
You can't educate us
For no equal opportunity
Talking about my freedom
People freedom and liberty…"
(cit. Robert Nesta Marley)

INDICE

INTRODUZIONE **4**

1 MELANOMA CUTANEO **6**

1.1 *Epidemiologia - Incidenza, mortalità e sopravvivenza* *6*

1.2 *Caratteristiche delle lesioni e diagnosi* *7*

1.3 *Patogenesi clinica* *9*

1.4 *Classificazione Istopatologica* *10*

1.5 *Classificazione Molecolare* *11*

1.6 *Management e trattamento dei pazienti affetti da melanoma cutaneo* *12*

1.6.1 *Tumore primitivo: escissione chirurgica e biopsia linfonodale* *12*

1.6.2 *Trattamento adiuvante nel melanoma stadio IIB, IIC, III e IV operabile* *12*

1.6.3 *Trattamento del Melanoma Metastatico* *13*

1.6.3.1 *Targeted Therapy* *13*

1.6.3.2 *Immunoterapia* *14*

1.6.4 *Biomarcatori prognostici e predittivi di risposta ai trattamenti* *14*

1.6.4.1 *Pathway dell'adenosina e CD73* *15*

2 PATHWAY DELL'ADENOSINA **16**

2.1 *Pathway di produzione e catabolismo* 16

2.2 *Immunosoppressione indotta dall'eADO - linfociti e cellule mieloidi* *17*

2.3 *Segnalazione dell'adenosina nel cancro* *19*

2.3.1 *Produzione di eADO nei tumori* *19*

2.3.2 *Effetti di eADO sulle cellule tumorali* *19*

2.3.3 *Effetti di eADO sulle cellule stromali tumorali* *20*

2.3.4 *Effetti di eADO sulle cellule immunitarie infiltranti il tumore* *20*

2.3.5 *Espressione dei componenti del pathway adenosinergico nei tumori umani* *21*

3 SCOPO DELLA TESI **22**

4 MATERIALI E METODI **23**

4.1 *Pazienti arruolati e raccolta materiale biologico per indagini sieriche* *23*

4.2 *Pazienti arruolati e raccolta materiale biologico per valutazione popolazioni*

linfocitarie circolanti *24*
4.3 *Attività AMPasica* *26*
4.4 *Spettrometria di massa con monitoraggio di reazioni multiple* *26*
4.5 *ELISA* *27*
4.6 *Citrometria a Flusso* *28*
4.7 *Analisi Statistiche* *28*

5 RISULTATI **29**
5.1 *Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati per le indagini sierologiche* 29
5.2 *Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati per le indagini delle popolazioni linfocitarie circolanti* *29*
5.3 *L'attività e l'espressione basale di sCD73 sono elevate nei pazienti con melanoma* *30*
5.4 *I livelli di attività di sCD73 sono correlati alla risposta alla terapia* *32*
5.5 *Associazioni dell'attività basale di sCD73 con la sopravvivenza* *34*
5.6 *sCD73 è un biomarcatore prognostico nel melanoma* *36*
5.7 *Frequenza delle cellule T periferiche CD8+CD73+ nei pazienti con Melanoma e nei soggetti sani* *37*
5.8 *Valutazione dell'associazione della frequenza delle cellule T CD8+CD73+ pretrattamento con la Overall Survival in pazienti trattati con Nivolumab* *38*
5.9 *Associazione tra i livelli basali dei linfociti CD8+CD73+ circolanti e la risposta clinica al Nivolumab* *40*

6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI **42**

7 BIBLIOGRAFIA **46**

RINGRAZIAMENTI **61**

INTRODUZIONE

Le patologie neoplastiche, anche nel corso dell'anno 2020, restano malattie gravi e, seconde solo alle malattie cardiovascolari come causa di morte dell'uomo, sono responsabili di circa il 30% di tutti i decessi. Secondo i dati dell'Associazione Italiana Registri Tumori, ogni giorno in Italia si scoprono circa 1.000 nuovi casi di cancro, cifra che sembra essere in aumento e che fotografa tuttora una malattia socialmente importante (Figura 1). Tuttavia, la mortalità è in riduzione con i decessi ridotti circa ad un terzo rispetto a quelli registrati "solo" 30 anni fa. Il merito è della maggiore adesione alle campagne di screening, che consentono di individuare la malattia in uno stadio iniziale, ma è anche dovuto agli sviluppi delle terapie oncologiche, alla maggiore scelta ed efficacia terapeutica migliorata nel tempo grazie alla ricerca.

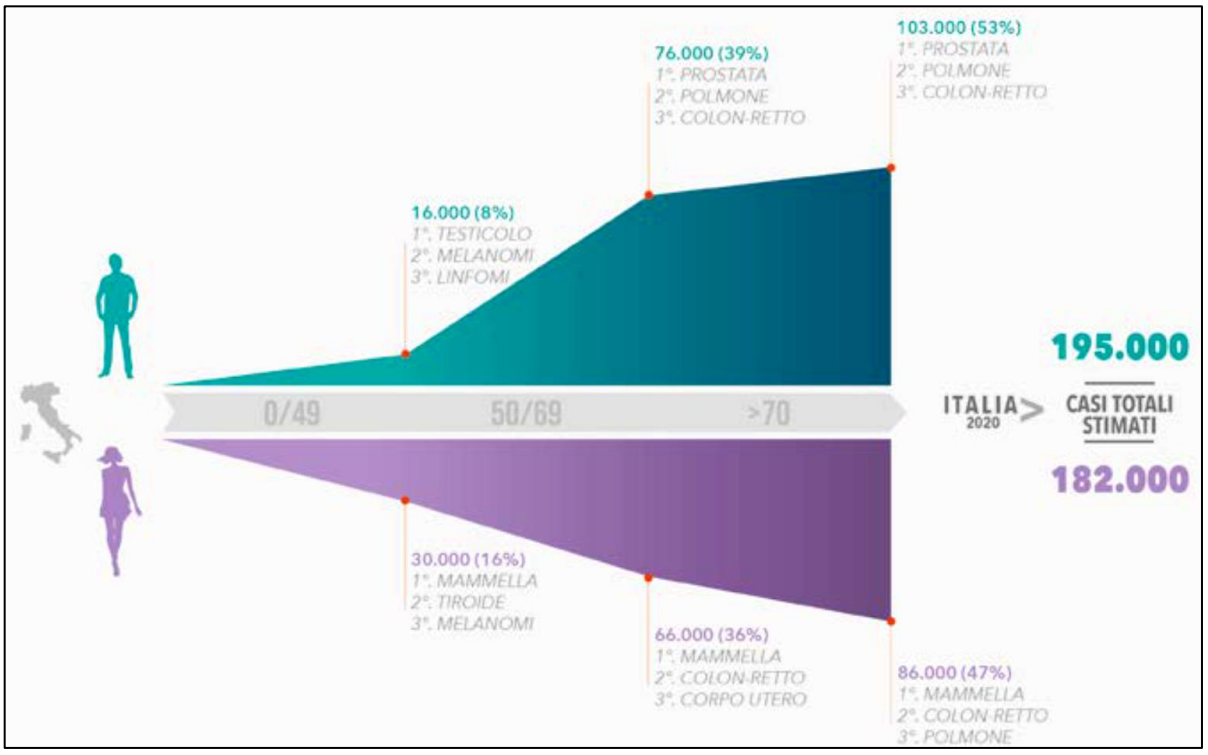

Figura 1: Nuovi casi di tumore maligno stimati nella popolazione italiana per l'anno 2020, per sesso e sedi prevalenti. L'incidenza stimata è pari a 377.000 nuovi casi, cresce all'aumentare con l'età (3 classi di età considerate 0-49; 50-69; >70 anni) ed è maggiore nei maschi rispetto alle femmine (195.000 vs 182.000).

Nonostante questi passi in avanti nel trattamento della patologia neoplastica, per alcune di esse, la prognosi rimane nefasta soprattutto nelle fasi avanzate. Esempio calzante è il melanoma maligno, il tumore più aggressivo della pelle, il cui tasso di sopravvivenza a 5 anni resta molto basso, compreso tra 5-19%. Inoltre, i melanomi sono i tumori che hanno registrato il maggior incremento medio annuale in tutte le fasce di età, sia negli uomini (+8,8%) che nelle donne

(+7,1%). A contrastare queste statistiche, negli ultimi anni ha contribuito l'ampliamento del panorama dei trattamenti terapeutici per il melanoma con l'introduzione di anticorpi immunomodulanti e di farmaci a bersaglio molecolare, che hanno mostrato una attività clinica obiettiva. Nonostante gli enormi progressi, lo sviluppo da parte delle cellule tumorali di meccanismi di resistenza ai trattamenti farmacologici e le eterogenee risposte cliniche ottenute dai pazienti sono tuttora grandissimi fattori limitanti il successo delle terapie. Nell'era della medicina personalizzata, al fine di superare questi ostacoli, è evidente la necessità di identificare marcatori prognostici e predittivi di risposta alle terapie, che permettano un'appropriata selezione dei pazienti che possano realmente beneficiare dal trattamento indirizzando in modo specifico le scelte terapeutiche.

1. Il MELANOMA CUTANEO

Il melanoma è un tumore maligno che deriva dalla trasformazione dei melanociti, cellule adibite alla produzione del pigmento melanina nello strato basale dell'epidermide. Nonostante rappresenti solo l'1% dei tumori della pelle, il melanoma è responsabile di oltre l'80% dei decessi per cancro della pelle [1]. Il melanoma può essere suddiviso in molti sottotipi clinici che differiscono per profilo molecolare, presentazione e demografia. Tra i melanomi cutanei, soprattutto tra gli individui di carnagione chiara, il melanoma a diffusione superficiale (SSM) è il tipo più comune e tende a essere associato ad una buona prognosi. Il melanoma lentigginoso acrale, che nasce dalla pelle glabra dei palmi delle mani, delle piante dei piedi e del letto ungueale, è più probabile che si manifesti nelle etnie dalla pelle più scura. Più raramente il melanoma può derivare da tessuto mucosale o dall'uvea [2]. Il melanoma uveale ha una prognosi particolarmente sfavorevole, con oltre il 50% dei pazienti che sviluppa una malattia in stadio IV [3].

1.1. Epidemiologia - Incidenza, mortalità e sopravvivenza

Con una stima di circa 325.000 nuovi casi nel 2020, il melanoma cutaneo rappresenta l'1,7% delle diagnosi globali di cancro secondo GLOBOCAN (Figura 2) [4]. Il tasso di Incidenza standardizzato per età, aumentato negli ultimi decenni nei paesi sviluppati, è di 3,8/100.000 per gli uomini e 3,0/100.000 per le donne, con un rischio cumulativo rispettivamente dello 0,42% e dello 0,33% [5]. Anche in Europa si assiste ad una rapida crescita del melanoma cutaneo, con oltre 100.000 nuovi casi e 22.000 decessi attribuibili all'anno [6,7,8]. Tragicamente, il melanoma colpisce spesso i pazienti giovani: è il secondo tumore più comune negli adolescenti e nei giovani adulti di età inferiore ai 30 anni e il tumore più comune nelle donne di età compresa tra 15 e 39 anni [9, 10]. Sebbene rappresenti meno del 5% di tutte le neoplasie cutanee, il melanoma rappresenta la maggior parte dei decessi per cancro della pelle [11]. Il melanoma è ben curabile se rilevato e trattato precocemente (guarito al 95%) mediante escissione chirurgica [12,13]. Tuttavia, se rilevato dopo la comparsa di metastasi regionali, una volta che il melanoma si è diffuso più in profondità nella pelle o in altre parti del corpo, la prognosi è triste. Prima dell'era della terapia mirata e dell'immunoterapia, la sopravvivenza dei pazienti dopo la diagnosi di malattia metastatica si attestava solo su 6-9 mesi [6,14,15]. Le principali scoperte della terapia mirata e dell'immunoterapia hanno migliorato significativamente le prospettive per questi pazienti, tuttavia, sulla base degli ultimi dati sulla sopravvivenza globale a 5 anni degli studi cardine di fase III, il 50-72% dei pazienti non sopravvive oltre i 5 anni [16,17,18]. La prognosi è sfavorevole soprattutto nei pazienti in stadio III e IV. Per lo stadio III, i tassi di

sopravvivenza a 5 anni variano dal 32% per lo stadio IIID al 93% per lo stadio IIIA [12,19], mentre per i pazienti in stadio IV i tassi di sopravvivenza a 5 anni sono del 34-50% [16,20]. Questi dati sottolineano l'urgenza di migliorare gli esiti della malattia.

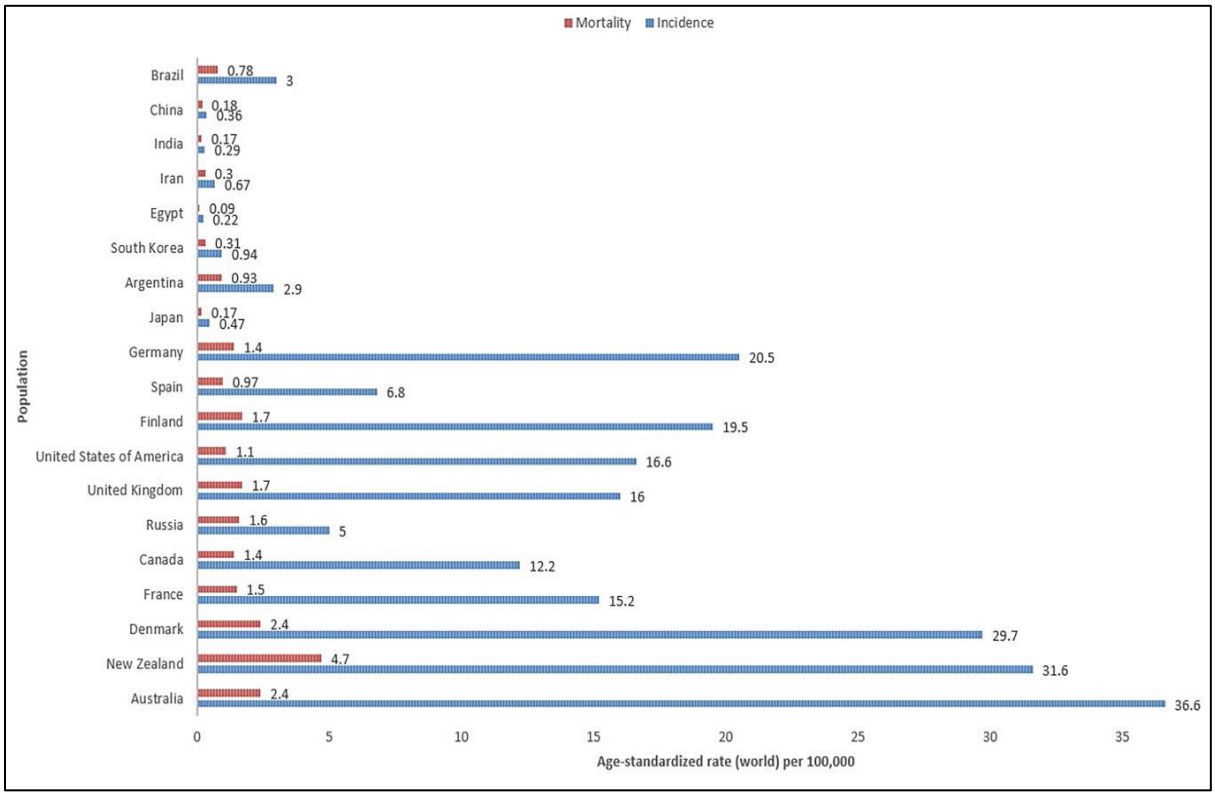

Figura 2. Grafico a barre che mostra i tassi globali di incidenza e mortalità del melanoma cutaneo stimati nel 2020, per entrambi i sessi ed ogni età.

1.2. Caratteristiche delle lesioni e diagnosi

Nella maggior parte dei casi, circa 70-80%, il melanoma insorge de novo su cute sana e si manifesta con una pigmentazione che si discosta in maniera sospetta da quella di tutte le altre lesioni melanocitarie benigne presenti nell'individuo. Tuttavia, con un tasso annuale di trasformazione di 1 su 200.000, può anche insorgere su una lesione pigmentata preesistente e manifestarsi sotto forme estremamente differenti, come variazione nel colore, nella dimensione o nella forma della lesione. La diagnosi può risultare difficoltosa, e per questo i clinici, nell'esame obbiettivo della lesione, si affidano a indicatori clinici imprescindibili, il noto sistema **ABCDE** del melanoma (Figura 3) [21]. Questo prevede l'identificazione di 5 elementi fondamentali, nello specifico:

- **A**simmetria della lesione, definita come la presenza di due metà non sovrapponibili in termini di forma, dimensioni o disposizione del pigmento;
- **B**ordi irregolari, che spesso si presentano frastagliati, sfumati e irregolari;

- **C**olore variegato, con aree ipercromiche e ipocromiche, aree rossastre, rosa o blu;
- **D**imensioni > 6 mm;
- **E**voluzione nel tempo, con crescita evidente e più o meno rapida.

Ulteriore caratteristica è il segno del "brutto anatroccolo", ossia la presenza di una lesione che non rispetta i criteri dell'ABCDE ma che si manifesta con una morfologia differente rispetto alle restanti lesioni melanocitarie benigne del soggetto [22].

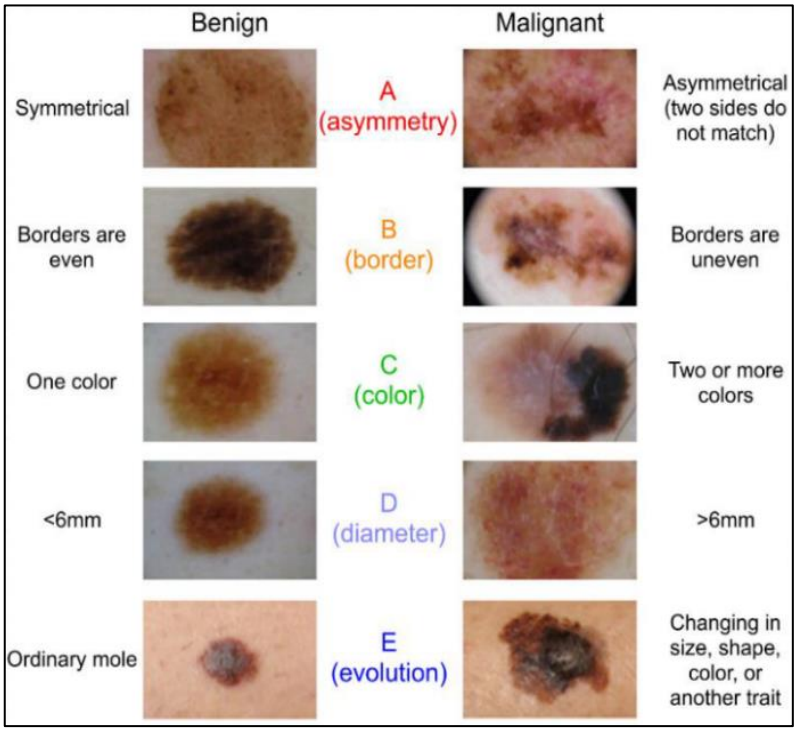

Figura 3: Sistema **ABCDE** del melanoma.

La maggior parte dei melanomi ad alto rischio viene diagnosticata mediante ispezione visiva da parte di un medico esperto a causa della loro pigmentazione prominente e del modello morfologico. Tuttavia, per i melanomi sottili o non pigmentati (amelanosi), è stato dimostrato che le tecniche di imaging di supporto migliorano l'accuratezza diagnostica. La tecnica più utilizzata è la dermoscopia o microscopia in epiluminescenza, un dispositivo ottico portatile con ingrandimento che utilizza una sorgente di luce per ispezionare le lesioni cutanee non oscurate dai riflessi della superficie cutanea. Questo metodo migliora sostanzialmente la diagnosi di lesioni poco chiare o dubbie che si sospetta siano melanoma. In genere, circa il 70% dei melanomi viene diagnosticato correttamente mediante l'ispezione clinica da parte di un dermatologo; con la dermoscopia, questa percentuale di rilevamento può essere aumentata fino al 90%. Tuttavia, circa il 10% dei melanomi non viene rilevato in modo affidabile con questi metodi [23].

1.3. Patogenesi clinica

Il passaggio da una pelle normale e sana al melanoma, alla sua crescita e diffusione, è un argomento molto studiato e dibattuto da anni. La transizione è stata ben descritta e presenta una progressione istologica, molecolare e biologica che sembra essere correlata con la sua capacità di dare metastasi (Figura 4) [24]. Le tappe della trasformazione sono: melanoma primitivo invasivo senza capacità di diffusione metastatica o in fase di crescita radiale; melanoma primitivo invasivo o in fase di crescita verticale; melanoma metastatico [25].

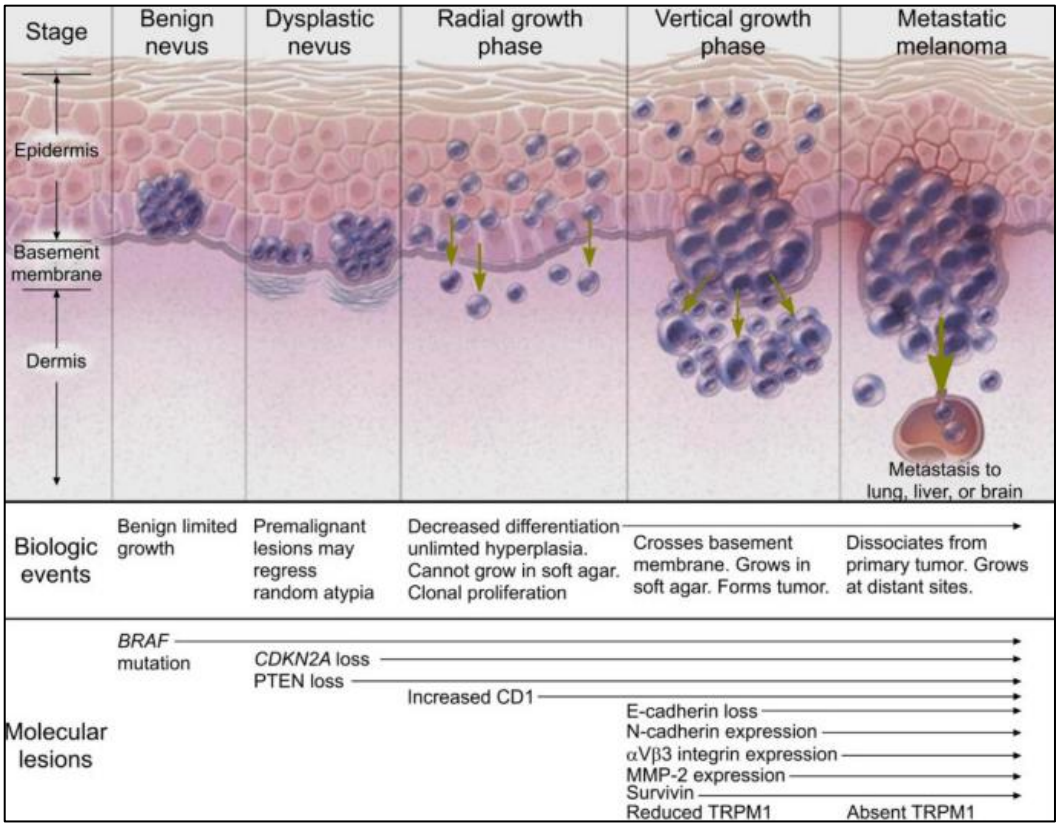

Figura 4: Tappe descrittive della trasformazione da pelle normale e sana al melanoma.

La fase di crescita radiale descrive la diffusione orizzontale del melanoma all'interno dell'epidermide e del derma superficiale. 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. 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, lo spessore di Breslow [26].

1.4. Classificazione Istopatologica

Il melanoma viene diagnosticato istopatologicamente e la classificazione istologica indirizzerà le successive decisioni terapeutiche e il calcolo del rischio. La classificazione è stabilita con lo spessore del tumore (stadio T; spessore di Breslow), coinvolgimento dei linfonodi (stadio N) e presenza di metastasi (stadio M) (Figura 5) [27]. La maggior parte dei melanomi vengono diagnosticati prima della comparsa di metastasi linfonodali o a distanza (stadio N0 e M0) [28,29]. Lo spessore del tumore Breslow è il criterio cruciale per valutare la prognosi e i margini invasivi della lesione indicativi per la biopsia del linfonodo sentinella [27]. L'ulcerazione è un altro marcatore istopatologico rilevante che è indipendente associato a prognosi sfavorevole ed è anche incorporato nella fase T [28,29]. La classificazione del melanoma è stata aggiornata dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC) con l'ottava edizione del manuale di stadiazione per il cancro, nella quale sono stati modificati/implementati alcuni aspetti aspetti relativi alla classificazione e alla stadiazione del melanoma [30,31]. Istopatologicamente, la conta mitotica non è più rilevante per la stadiazione e la profondità del tumore è arrotondata ai decimi di millimetri e i melanomi sono classificati meno frequentemente come stadio II e più frequentemente come stadio III [30,31].

In generale, la valutazione prognostica è basata su [32]:

- spessore di Breslow, ovvero la profondità di invasione della neoplasia;
- numero di mitosi, criterio escluso dall'ultima classificazione AJCC. Mitosi scarse 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, la cui presenza, densità e distribuzione interna alla lesione tumorale correlano con una prognosi più favorevole;
- genere, con una prognosi 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 [33].

	Definition
T classification	
T1	
A	<0·8 mm thickness, no ulceration
B	0·8–1 mm thickness (<0·8 mm with ulceration)
T2	
A	>1–2 mm thickness, no ulceration
B	>1–2 mm thickness with ulceration
T3	
A	>2–4 mm thickness, no ulceration
B	>2–4 mm thickness with ulceration
T4	
A	>4 mm thickness, no ulceration
B	>4 mm thickness with ulceration
N classification	
N0	No regional lymph nodes affected
N1a–c	One lymph node affected, micro-metastasis or macro-metastasis, or in-transit or satellite metastasis
N2a–c	Two to three lymph nodes affected, or at least one lymph node affected and in-transit or satellite metastasis
N3a–c	At least four lymph nodes affected or at least two lymph nodes affected and matted nodes
M classification	
M0	No evidence of distant metastasis
M1	
a	Distant metastasis to skin
b	Distant metastasis to lung
c	Distant non-CNS metastasis
d	CNS metastasis

Figura 5: Classificazione TNM basata sull'ottava edizione del manuale dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC).

1.5. Classificazione molecolare

L'ultimo decennio ha portato a una comprensione dettagliata delle basi genetiche del melanoma [34,35,36]. I nevi benigni spesso ospitano solo una mutazione attivante, principalmente BRAFV600E (vale a dire, Val600Glu), nelle lesioni borderline si osservano mutazioni del promotore TERT o perdite di CDKN2A, mentre nel melanoma si osservano molteplici alterazioni geniche [37]. L'analisi Cancer Genome Atlas ha introdotto la delineazione di quattro diversi sottotipi genetici di melanoma sulla base delle mutazioni geniche [34]. Questi sottotipi sono: melanomi BRAF mutanti (circa 50%); Melanomi N-Ras, K-Ras e H-Ras mutati (circa il 25%); melanomi con mutazione NF1 (circa 15%); melanomi non mutati in nessuno dei tre

precedent (10%) [34]. Altre alterazioni genetiche frequenti includono l'attivazione di mutazioni del promotore TERT (30-80%) e CDKN2A, PTEN, TP53 e ARID2 [24,35,38,39,40].

1.6. Management e trattamento dei pazienti affetti da melanoma cutaneo

1.6.1 Tumore primitivo: escissione chirurgica e biopsia linfonodale

Il trattamento primario della malattia localizzata consiste in un'ampia escissione locale con diversi margini di sicurezza, a seconda dello spessore di Breslow del melanoma [41]. Solitamente si consigliano margini di 0,5 cm per i melanomi in situ, margini di 1 cm per tumori con uno spessore fino a 2 mm e margini di 2 cm per tumori con spessore superiore a 2 mm. Diversi studi hanno analizzato i margini stretti rispetto a quelli ampi e, sebbene abbiano riscontrato una riduzione delle recidive locali per margini ampi, non hanno mostrato alcun successivo effetto di sopravvivenza globale [42,43,44,45]. La biopsia del linfonodo sentinella è raccomandata per i melanomi primari con uno spessore del tumore di almeno 1,0 mm. La stadiazione del nodo sentinella è considerata di grande rilevanza per un'adeguata stadiazione, valutazione del rischio e potenzialmente anche per la scelta della giusta strategia di follow-up e di trattamento adiuvante. La dissezione elettiva dei linfonodi non ha mostrato alcun beneficio significativo in termini di sopravvivenza e non è raccomandata [46,47,48,49]. Diversi studi in pazienti con melanoma intermedio e spesso, non hanno riscontrato alcun miglioramento significativo nella sopravvivenza specifica del melanoma quando hanno confrontato la dissezione completa dei linfonodi di routine con l'osservazione periodica ecografica del bacino del linfonodo sentinella [50,51,52]. La dissezione completa dei linfonodi ha senza dubbio migliorato la sopravvivenza libera da recidiva del nodo regionale (RFS), ma non ha migliorato la sopravvivenza libera da recidiva e globale. Pertanto, non dovrebbe essere eseguita la dissezione completa immediata del linfonodo per la malattia positiva alla biopsia del linfonodo sentinella [53]. Infine, in caso di malattia regionale clinicamente rilevabile (macroscopica, non sentinella), la dissezione linfonodale terapeutica è considerata lo standard di cura.

1.6.2 Trattamento adiuvante nel melanoma stadio IIB, IIC, III e IV operabile

La recidiva del melanoma dopo l'intervento chirurgico definitivo è un rischio sostanziale per i pazienti con melanoma in stadio IIB, IIC, III e stadio IV resecabile. In questi stadi tumorali, dovrebbe essere preso in considerazione un trattamento adiuvante, che fa uso di agenti già approvati o in studi clinici, per prevenire la ricaduta della malattia e la diffusione a distanza e, in definitiva, per migliorare la sopravvivenza globale. Lo studio EORTC-18071 sull'uso adiuvante dell'ipilimumab, anticorpo monoclonale anti-CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte

Antigen 4), in pazienti con melanoma in stadio 3 ha mostrato un netto miglioramento della RFS e della sopravvivenza globale [54,55] stabilendo un regime attivo per il trattamento adiuvante del melanoma in stadio 3. Un altro studio, il Checkmate-238, che ha confrontato ipilimumab con nivolumab, anticorpo monoclonale anti-PD1 (Programmed Cell Death Protein 1), in pazienti con melanoma in stadio IIIB, stadio IIIC e stadio IV resecato, ha mostrato una RFS significativamente migliorata con nivolumab (HR 0,65) in tutti sottogruppi analizzati [56]. I risultati di un altro studio randomizzato in pazienti con melanoma in stadio III (studio Keynote-054) hanno mostrato un chiaro beneficio RFS (HR 0,57) di un altro anticorpo anti-PD-1, il pembrolizumab [57]. Anche lo studio COMBI-AD in pazienti con mutazioni BRAFV600E/K ha mostrato che l'uso combinato di dabrafenib e trametinib, in pazienti con melanoma in stadio IIIA–C, ha avuto non solo un beneficio significativo in termini di RFS (HR 0,47) ma anche di sopravvivenza (HR 0,57) [58].

1.6.3 Trattamento del Melanoma Metastatico

1.6.3.1 Targeted Therapy

Per il melanoma con mutazione BRAFV600, piccole molecole inibitorie della chinasi sono state approvate per la terapia di prima linea della malattia localmente avanzata e metastatica. Una risposta rapida, dopo pochi giorni o poche settimane indipendentemente dal carico tumorale e dalla localizzazione delle metastasi, è una caratteristica tipica di tutte le terapie a base di inibitori di BRAF, che possono essere particolarmente utili per i pazienti con melanoma sintomatico con tumori a rapida progressione. Diversi studi clinici randomizzati di fase 3 hanno mostrato tassi di risposta obiettiva agli inibitori BRAF senza precedenti, circa il 50%, che potrebbero essere aumentati fino al 70% se combinati con inibitori di MEK [59,60,61,62,63,64]. Sebbene le risposte complete siano state riportate solo nel 16% dei pazienti, il tasso di controllo della malattia (risposta completa, risposta parziale o malattia stabile) ha superato il 90%, il che significa che tutti i pazienti beneficiano inizialmente di questo trattamento [59,60,61,62,63,64]. Inoltre, poiché la sopravvivenza mediana libera da progressione (PFS) è aumentata da 7-9 mesi con inibitori BRAF in monoterapia a 11-14.9 mesi con la terapia in combinazione degli inibitori BRAF e MEK, quest'ultima è diventata un regime standard consolidato [59,60,61,62,63,64]. La sopravvivenza globale mediana nei pazienti con melanoma in stadio 4 trattati con inibitore BRAF e inibitore MEK è compresa tra 22-25 mesi e la sopravvivenza globale a 3-5 anni ha raggiunto il 40% [65,66]. Per i pazienti con melanoma BRAF wild-type, le opzioni per terapie mirate sono scarse e la terapia mirata non è un'opzione

di prima linea e sono urgentemente necessari nuovi agenti o combinazioni per questa popolazione di pazienti, soprattutto se coloro che non rispondono all'immunoterapia.

1.6.3.2 Immunoterapia

Negli ultimi 10 anni, abbiamo assistito all'evoluzione del trattamento del melanoma attribuita allo sviluppo di nuovi agenti immunoterapici che prendono di mira specifici checkpoint immunitari, che hanno completamente cambiato la prospettiva per i pazienti con melanoma metastatico aumentando i tassi di sopravvivenza e migliorando la qualità della vita [67,68,69,70,71,72]. In questo contesto, sono state attivamente studiate due molecole inibitorie immunitarie coinvolte nella risposta immunosoppressiva: l'antigene citotossico associato ai linfociti T (CTLA-4), che aiuta a estinguere il segnale di attivazione immunitario, e la proteina della morte cellulare programmata (PD-1), che regola negativamente l'attivazione dei linfociti T e l'inibizione della funzione effettrice [73]. L'Ipilimumab, un anticorpo monoclonale (IgG1) diretto contro CTLA-4, è stato il primo immunoterapico per il melanoma metastatico ad aver mostrato un beneficio per la sopravvivenza globale (OS) in circa il 20% dei pazienti in uno studio randomizzato di fase III [74]. Nivolumab e pembrolizumab, anticorpi monoclonali diretti contro PD-1, sono altri agenti immunomodulatori in grado di riattivare l'immunità antitumorale innata, suscitando risposte obiettive in una percentuale sostanziale di pazienti affetti da melanoma e hanno mostrato un'efficacia superiore rispetto a ipilimumab e chemioterapia, raggiungendo un tasso di risposta complessivo superiore al 44% per Nivolumab e al 36% per Pembrolizumab [75,76,77,78]. L'efficacia dell'immunoterapia può essere aumentata utilizzando gli agenti immunoterapici come approccio combinatorio, raggiungendo un tasso di risposta globale fino al 58% [79,80,81,82,83].

1.6.4 Biomarcatori prognostici e predittivi di risposta ai trattamenti con anti-PD1

Nonostante i considerevoli progressi nella comprensione della fisiopatologia e delle basi genetiche del melanoma, nonchè nell'ampliamento delle possibilità terapeutiche guidato da immunoterapia e target therapy, solo una porzione di pazienti ottiene benefici a lungo termine. Sebbene siano stati condotti molti studi per identificare potenziali biomarcatori predittivi e/o prognostici utili per identificare i pazienti che rispondono alle terapie, ad oggi non sono disponibili biomarcatori universalmente riconosciuti. C'è una mancanza di biomarcatori prognostici, e questo è uno dei principali limiti all'uso delle nuove terapie, in particolare dell'immunoterapia. Con riferimento all'immunoterapia con anti-PD1, Circa il 60% dei pazienti mostra resistenza primaria alla terapia e circa il 20-30% dei pazienti inizialmente

rispondenti, svilupperà una resistenza secondaria [84]. Nonostante il considerevole dibattito, il test più utilizzato per predire la risposta all'immunoterapia con anticorpi anti-PD-1 è l'immunoistochimica per valutare l'espressione tumorale del PD-L1 (Programmed Death Ligand-1). L'espressione di PDL1 è chiaramente associata al tasso di risposta, alla sopravvivenza libera da progressione e alla sopravvivenza globale nel melanoma [85,86] tuttavia, questo test nella maggior parte dei casi non ha alcuna influenza sulle decisioni terapeutiche. Lo stesso vale per gli approcci genetici, neoepitopi o il carico mutazionale complessivo, che sono ancora sperimentali e non nell'uso clinico di routine [87,88].

1.6.4.1 Pathway dell'Adenosina e CD73

Negli ultimi anni, uno dei pathway di segnalazione studiato più a fondo e diventato argomento di grande interesse nella ricerca sul cancro, a causa di un numero crescente di evidenze che mostrano un suo coinvolgimento nella progressione tumorale e nelle metastasi, è il pathway dell'adenosina. In particolare, studi preclinici hanno studiato il ruolo del CD73, enzima coinvolto nella via di segnalazione dell'adenosina, nell'immunosoppressione e progressione tumorale, dimostrando che l'inibizione del CD73 è un efficace strategia immunoterapeutica per diversi tipi di cancro. Agenti che prendono di mira CD73, inclusi anticorpi monoclonali e piccole molecole, sono stati sviluppati e sono in fase di sperimentazione clinica, da sole o in combinazione con altri inibitori del checkpoint immunitario, e si sono dimostrati efficaci nel controllare la crescita tumorale e la risposta immunitaria [88,89,90,91]. Ad oggi, vari studi hanno anche esplorato il significato dell'espressione e dell'attività di CD73 in pazienti oncologici, valutando possibili correlazioni con la sopravvivenza e/o la risposta clinica. Il CD73 è espresso sulla superficie di molti tipi cellulari, comprese le cellule immunitarie e le cellule tumorali, e risulta sovraregolato in diversi tipi di tumori solidi umani [92]. Recentemente è stato dimostrato che l'aumentata espressione tumorale del CD73 è associata a una peggiore sopravvivenza globale e a una sopravvivenza libera da progressione [93]. Inoltre, dati recenti indicano che esiste anche una forma solubile di CD73 (sCD73) nel plasma, che i suoi livelli sono significativamente aumentati nel plasma dei pazienti oncologici rispetto agli individui sani e che esiste un'associazione tra l'attività del sCD73 nel sangue e l'esito clinico al trattamento con nivolumab in pazienti con melanoma metastatico [94,95,96].

2. PATHWAY DELL'ADENOSINA

2.1. Pathway di produzione e catabolismo

L'adenosina è un metabolita cellulare, un "secondo messaggero" coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale all'interno delle cellule viventi in risposta a vari stimoli. Un complesso sistema di enzimi e trasportatori cooperano in concerto per regolare i livelli di adenosina extracellulare (eADO) [97,98] (Figura 6) attraverso due percorsi principali. Il percorso canonico di produzione di eADO prevede l'idrolisi di eATP da parte di ectonucleotidasi come CD39 (noto anche come ectonucleoside trifosfato difosfoidrolasi 1) e CD73 (noto anche come 5'-nucleotidasi) [99]. CD39 è un enzima transmembrana che idrolizza l'eATP per produrre ADP e AMP [100] extracellulari mentre CD73 è in grado di convertire l'AMP extracellulare (eAMP) in eADO. Le concentrazioni di eAMP sono ulteriormente regolate attraverso fosforilazioni operate da adenilato chinasi (ecto-AK) e nucleoside difosfato chinasi (ecto-NDPK) generando eATP [99,101]. Nel secondo percorso, definito anche non canonico, la produzione di eADO avviene attraverso l'attività di due enzimi specifici, CD38 e CD203a che utilizzano come substrato NAD+ generando eAMP [102,103].

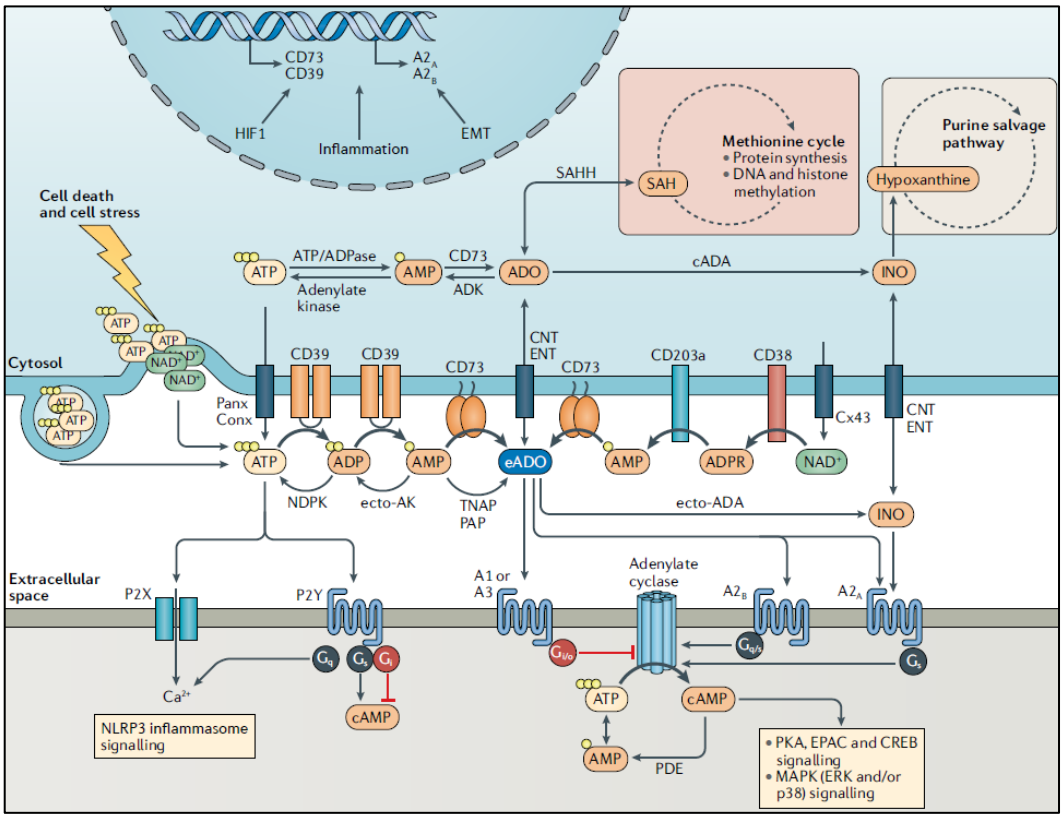

Figura 6: Pathways intracellulari ed extracellulari che regolano la produzione ed il catabolismo di eADO e vie di segnalazione indotte.

L’eAMP viene poi convertito in eADO attraverso CD73. Inoltre, altre fosfatasi legate alla membrana, come le fosfatasi alcaline tessuto-specifiche (come ad esempio prostatic acid phosphatase) e tessuto non specifico (TNAP) possono convertire eAMP in eADO [104]. L’eADO avvia i processi di segnalazione grazie al legame con i suoi recettori. Questi comprendono quattro recettori accoppiati a proteine G: A1, A2A, A2B e A3. I recettori A1, A2A e A3 lavorano a concentrazioni fisiologiche di eADO [105,106] mentre A2B lavora solo in condizioni patologiche. Nello spazio extracellulare, l’eADO ha una emivita molto breve [107]: può essere sia catabolizzato in inosina da adenosina-deaminasi associate alla membrana (ecto-ADA) e trasportato nelle cellule da trasportatori nucleosidici o catturato dai recettori purinergici di tipo 1 (P1) [98] (Figura 6). Il catabolismo ecto-ADA mediato probabilmente contribuisce a ridurre livelli eccessivi (associati a pattern patologici) di eADO ma non a mantenerne i livelli fisiologici [108].

2.2 Immunosoppressione indotta dall’eADO - linfociti e cellule mieloidi

In condizioni fisiologiche, i livelli di eATP ed eADO sono entrambi mantenuti nell'intervallo nanomolare. In seguito alla morte cellulare o allo stress cellulare innescato da ipossia, deprivazione di nutrienti o infiammazione, l'ATP viene rapidamente rilasciato nello spazio extracellulare (raggiungendo concentrazioni micromolari) [109,110] (Figura 6). Nello spazio extracellulare, l'ATP è un potente fattore chemiotattico e stimolatorio per le cellule immunitarie; tuttavia, l'idrolisi di eATP a eADO controbilancia questi effetti pro-infiammatori non solo riducendo i livelli di eATP, ma anche promuovendo la cascata immunosoppressiva del recettore dell'adenosina [111,109,110,112,113]. Il signalling del recettore delle cellule T upregola l'espressione di A2A e l'attivazione di A2A da parte di eADO smorza la segnalazione del recettore delle cellule T come pure la co-stimolazione di CD28 e la segnalazione di IL-2R, compromettendo così l'attivazione, la proliferazione, la sopravvivenza delle cellule T e la produzione di citochine [114,115,116,117,118]. L'attivazione di A2A nelle cellule T aumenta l'espressione dei recettori co-inibitori, come PD-1, CTLA4, LAG3, TIM3 e promuove la differenziazione delle cellule CD4+ in cellule T regolatorie (Treg) [119,120,121] (Figura 7). La co-espressione di CD39 e CD73 contribuisce ulteriormente alle funzioni soppressive delle cellule Treg promuovendo la generazione di eADO e quindi la stimolazione paracrina e/o autocrina della segnalazione A2A e A2B [120,122,123]. Nelle cellule B, l'attivazione di A2A interrompe la segnalazione a valle del recettore delle cellule B e del recettore Toll-like 4 sopprimendo il fattore di trascrizione nucleare NF-κB, compromettendo così l'attivazione e la sopravvivenza di queste cellule (Figura 7). La segnalazione A2A sopprime anche la

maturazione e la funzione delle cellule NK [124,125]. Nei macrofagi, il signalling dei Toll-like receptors upregola l'espressione sia di A2A che di A2B, la cui attivazione sposta la differenziazione di queste cellule verso un fenotipo pro-tumorale 'M2-like' associato a una maggiore produzione di IL-10 immunosoppressiva, VEGF e arginasi 1 [126,127,128,129] (Figura 7). Allo stesso modo, nelle cellule mieloidi dendritiche (DCs), le funzioni di CD39, A2A e A2B nel pathway di eADO promuovono l'espressione di IL-10, VEGF e TGFβ così come degli enzimi immunomodulatori IDO e la cicloossigenasi 2 (COX2), mentre sopprime l'espressione di IL-12 pro-infiammatoria e delle molecole co-stimolatorie CD80 e CD86 [130] (Figura 7).

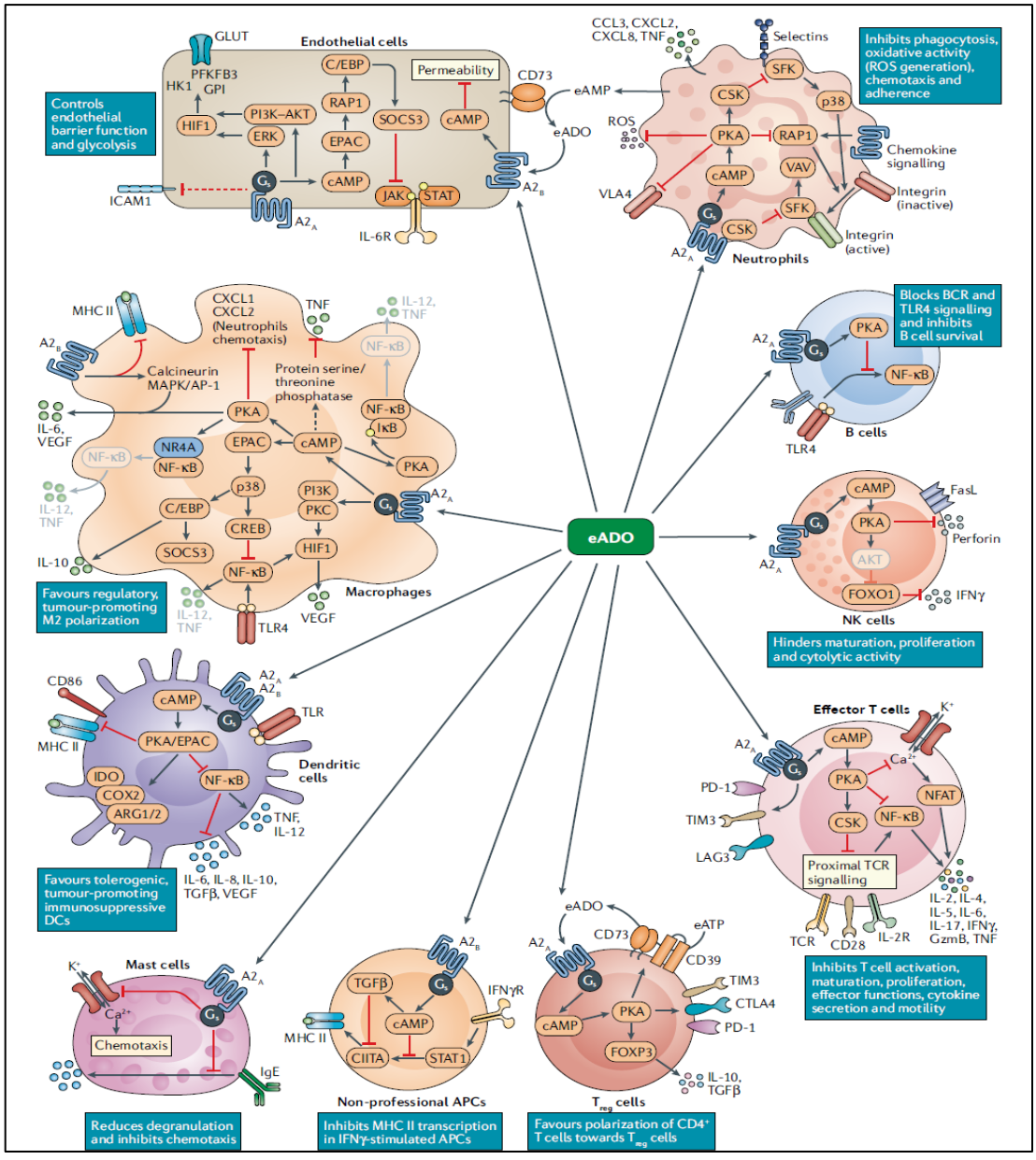

Figura 7: Effetti dell'adenosina.

2.3 Segnalazione dell'adenosina nel cancro

2.3.1 Produzione di eADO nei tumori.

Alte concentrazioni di ATP possono essere rinvenute nell'ambiente extracellulare dei tumori solidi [131] a causa non solo del rilascio passivo conseguente alla morte cellulare, ma anche della secrezione attiva di ATP da parte delle cellule tumorali e di altre cellule nella TME, innescata dall'ipossia, dall'infiammazione cronica, dalla deprivazione di nutrienti, dallo stress o dal trattamento con farmaci citotossici [109,113,132]. L'eATP attiva risposte infiammatorie, in particolare attraverso il purinocettore P2X7 espresso da macrofagi, dalle DC, dai granulociti, dalle cellule T e B. L'attivazione di P2X7 promuove in maniera indiretta il rilascio di IL-1β e IL-18, attivando così l'immunità antitumorale [109,113,132,133,134]. Tuttavia, i tumori solidi tipicamente hanno anche livelli più alti di ectonucleotidasi rispetto ai corrispondenti tessuti non maligni, favorendo così l'idrolisi di eATP a eADO [135,136,137]. Inoltre, l'espressione di CD39 e CD73 può essere aumentata nei tumori in risposta a vari fattori, principalmente in risposta all'ipossia (attraverso il fattore di trascrizione HIF1) [135,136]. Molti di questi fattori aumentano concomitantemente l'espressione di A2A e A2B, aumentando così la sensibilità delle cellule all'eADO in un ampio range di concentrazioni (sia fisiologico che patologico). Il TGFβ è un altro importante motore della produzione di eADO nei tumori. TGFβ upregola l'espressione di CD39 e CD73 nelle cellule T, cellule NK, cellule mieloidi, cellule tumorali, fibroblasti e cellule endoteliali [138,139]. Alti livelli di eADO nella TME possono anche risultare da alterazioni genetiche e dalla de-differenziazione delle cellule tumorali, in particolare la transizione da epiteliale a mesenchimale.

2.3.2 Effetti di eADO sulle cellule tumorali.

Il signalling di eADO non è solo immunosoppressivo, ma può anche promuovere la crescita e le metastasi tumorali in un modo autonomo. L'attivazione dei pathways PI3K-AKT A2A-mediato, ERK e JNK A2B-mediato e p38 MAPK [140,141,142,143] nelle cellule tumorali ha dimostrato di promuovere la loro proliferazione, sopravvivenza, adesività, invasività e la motilità in modelli preclinici di tumori [144,145]. Inoltre, CD73 potrebbe anche promuovere la crescita tumorale indipendentemente dalla sua funzione enzimatica (cioè, indipendentemente dal suo coinvolgimento nel pathway dell'eADO). Per esempio, è stato supposto che il CD73 possa aumentare l'adesività e l'invasività delle cellule tumorali legandosi direttamente alle proteine della matrice extracellulare, come la tenascina C, contribuendo così al potenziale metastatico di queste cellule [146]. Inoltre, i gruppi di CD7 sulla superficie cellulare potrebbero transattivare direttamente recettori tirosin-chinasi (come l'EGFR) e innescare vie di

segnalazione intracellulari che promuovono la crescita delle cellule tumorali, la loro sopravvivenza e invasività [147,148].

2.3.3 Effetti di eADO sulle cellule stromali tumorali

Le cellule che compongono lo stroma tumorale sono coinvolte in modo cruciale nella progressione del cancro. In diversi tipi di tumori, CD39 e CD73 sono abbondantemente espressi dai fibroblasti associati al cancro (CAF), permettendo a queste cellule di generare alti livelli di eADO con funzione immunosoppressiva [149,150,151]. Oltre alle CAF, la segnalazione adenosinergica influisce anche sulla funzione delle cellule endoteliali nei tumori. CD73 e i recettori dell'adenosina sono espressi ad alti livelli sulle cellule endoteliali vascolari e regolano la permeabilità vascolare, il traffico dei linfociti e la neoangiogenesi [152,153,154,155,156]. I risultati di studi preclinici suggeriscono che la produzione di eADO da parte del CD73 endoteliale può sopprimere l'homing delle cellule T verso i tumori attraverso la downregolazione dell'espressione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali [157]. È stato inoltre dimostrato che CD73 promuove l'angiogenesi del tumore stimolando la secrezione di VEGF [158]. Inoltre, il signalling A2A-mediato promuove la formazione di nuovi vasi linfatici nei tumori, contribuendo così alle metastasi nei linfonodi sentinella nei modelli murini [159].

2.3.4 Effetti di eADO sulle cellule immunitarie infiltranti il tumore.

Negli ultimi 10 anni, vari studi hanno ampiamente dimostrato che l'attivazione della segnalazione dell'adenosina nella TME sovverte l'immunità antitumorale [135,136,136,160,161]. Utilizzando vari modelli di topo trattati con bersaglio genico o con inibitori farmacologici selettivi, diversi gruppi indipendenti hanno stabilito che i pathway CD39/CD73 e A2A e/o A2B sopprimono l'attività antitumorale delle cellule T CD8+ e delle cellule NK [125,134,157,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173] e promuovono la produzione di fattori tollerogeni (come TGFβ e IL-10) dalle cellule mieloidi [130,174,175,176,177,178,179] (Figura 6 e Figura 7). Come dettagliato sopra, la segnalazione A2A nei linfociti inibisce la produzione di molecole effettrici chiave del sistema immunitario, tra cui IFNγ, TNF [180,181,182,183] (Figura 6 e Figura 7) Il signalling A2A-mediato nelle cellule NK compromette la loro maturazione mentre la sua attivazione sulle cellule mieloidi sopprime l'immunità antitumorale in modelli murini [125,174]. È stato dimostrato che il signalling A2A-mediato nelle cellule Treg ne promuove la proliferazione, la secrezione di fattori immunosoppressivi (compresi TGFβ e IL-10) e l'espressione dei recettori immuno-

checkpoint (come PD-1, CTLA4 e LAG3) [120,121] (Figura 6). Il signalling A2B-mediato, in particolare nelle cellule mieloidi, sta emergendo come un importante meccanismo attraverso il quale eADO è in grado di sopprimere l'immunità antitumorale. L'attivazione di A2B stimola l'espansione delle MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) [176,177]. La segnalazione A2B promuove anche l'espansione delle cellule Treg nei modelli murini [184].

2.3.5 Espressione dei componenti del pathway adenosinergico nei tumori umani.

Data la natura ipossica e infiammatoria di molti tumori solidi, non sorprende che più componenti della via adenosinergica siano sovraespressi nei tessuti tumorali rispetto ai rispettivi tessuti non maligni. In alcuni tumori, la sovraespressione dei componenti del percorso adenosinergico è particolarmente pronunciata e coinvolge sia gli ecto-enzimi CD73 e CD39 coinvolti nella formazione di eADo così come i recettori A2A e A2B. L'influenza prognostica dell'espressione di CD73 in pazienti con tumore è stata ampiamente studiata. In vari tipi di tumore, CD73 è upregolato a livello trascrizionale ed è correlato a un outcome non favorevole, in particolare nei pazienti con tumori con mutazioni KRAS, TP53 e/o mutazioni EGFR [185,186]. Il CD73 può essere scisso dalla superficie cellulare e rilasciato nello spazio extracellulare in una forma solubile ed enzimaticamente attiva. Alti livelli di CD73 solubile (sCD73) sono stati osservati nel sangue dei pazienti con melanoma e sono associati a scarse risposte alla terapia con anticorpi anti-PD-1 utilizzando nivolumab [187].

3 SCOPO DELLA TESI

In tale contesto, ho fissato come obiettivo del percorso di Dottorato di Ricerca la valutazione del ruolo delle molecole coinvolte nel pathway dell'Adenosina, con particolare attenzione al CD73, quali potenziali biomarcatori di risposta all'immunoterapia con anti-PD-1 (Pembrolizumab e Nivolumab) in pazienti affetti da melanoma metastatico e quindi determinarne il potenziale ruolo prognostico e predittivo.

A tal proposito, in questo lavoro sono state valutate l'attività basale ed eventuali oscillazioni in corso di trattamento del CD73 solubile (sCD73) e la sua espressione proteica nel sangue periferico, nonché l'analisi dell'espressione del CD73 sulle sottopopolazioni linfocitarie circolanti CD8+ (linfociti T) in pazienti trattati con anti-PD-1 al fine di correlare i risultati ottenuti alla risposta terapeutica.

Nello specifico, in pazienti affetti da melanoma metastatico sono stati valutati:

1. Attività basale del sCD73;
2. Espressione sierica del sCD73;
3. Frequenza dei linfociti CD8+ circolanti che esprimono CD73;
4. Frequenza dei linfociti CD8+ circolanti che esprimono PD-1;
5. Frequenza dei linfociti CD8+ circolanti che esprimono CD73 e PD1.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Pazienti arruolati e raccolta materiale biologico per indagini sieriche

Per le indagini sieriche sono stati inclusi un totale di 546 pazienti con melanoma in stadio III o stadio IV, trattati con pembrolizumab, nivolumab o nivolumab in combinazione con ipilimumab.

I pazienti sono stati arruolati in sei diversi centri:

- 100 pazienti dall'Istituto Nazionale Tumori IRCCS Fondazione "G. Pascale", Napoli (Italia);
- 53 pazienti dall'University Hospital Essen (Germania);
- 111 pazienti dall' University Hospital Tübingen (Germania);
- 88 pazienti dall'Hospital Saint Louis di Parigi (Francia);
- 144 pazienti dell'Università di Zurigo (Svizzera)
- 50 pazienti dell'Università di Chicago (USA).

Il sangue periferico (in provette contenenti gel per separazione del siero) di pazienti è stato raccolto presso i centri dopo aver ottenuto l'approvazione del Comitato Etico e aver ottenuto un consenso informato firmato dai pazienti al prelevamento e all'uso del materiale biologico. Il 91% dei pazienti (496/546) aveva una diagnosi di melanoma avanzato stadio IV, i restanti una diagnosi di stadio III secondo la VII edizione dell'American Joint Committee on Cancer [188]. La risposta alla terapia è stata valutato ogni 12 settimane secondo i criteri RECIST V.1.1 come risposta completa (CR), risposta parziale (PR), malattia stabile (SD) o malattia progressiva (PD) [189]. Il sangue periferico, circa 10 ml per paziente, è stato prelevato da tutti i pazienti prima (basale) dell'inizio della terapia. Per 41 pazienti dell'Istituto Nazionale Tumori IRCCS Fondazione "G. Pascale" di Napoli e per 19 pazienti dell'Università di Chicago sono stati raccolti campioni di siero anche in corso di trattamento con anti-PD1, circa a tre mesi dal primo ciclo di terapia. Mediante centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti si è separata la componente cellulare da quella sierica e successivamente si è proceduto alla raccolta e conservazione dei campioni di siero a -80°C fino al momento dell'uso, circa 2,5ml per soggetto. In aggiunta, campioni di siero ottenuti da 96 donatori sani (69 maschi e 27 femmine), di età >18 anni sono stati raccolti presso Istituto Nazionale Tumori IRCCS Fondazione "G. Pascale" e utilizzati come controlli. Le caratteristiche cliniche dei pazienti, tra cui sesso, età, presenza di metastasi cerebrali e ossee, lo status della mutazione BRAF, linea di terapia ed altro, sono riassunte in tabella 1.

Variables	Nivolumab or pembrolizumab		Nivolumab + ipilimumab		Total	
	Number	%	Number	%	Number	%
	453	100	93	100	546	100
Median age, years (range 19-94)	65		61		64,5	
Sex						
Male	271	59,8	53	57,0	324	59,3
Female	182	40,2	40	43,0	222	40,7
Disease Stage						
III	48	10,6	4	4,3	52	9,5
IV	402	88,7	89	95,7	491	89,9
unknown	3	0,66	0		3	0,5
LDH						
< ULN	308	74,0	51	54,8	359	65,8
≥ ULN	116	19,6	41	44,1	157	28,7
unknown	29	6,4	1	1,1	30	5,5
BRAF status						
wt	270	59,6	45	48,4	319	57,7
mut	147	32,5	33	35,5	180	33,0
unknown	36	7,9	15	16,1	51	9,3
Brain metastasis						
yes	78	17,2	9	9,7	87	15,9
no	307	67,8	41	44,1	348	63,7
unknown	68	15,0	43	46,2	111	20,3
Bone metastasis						
yes	80	17,6	13	14,0	93	17,0
no	302	66,7	37	39,8	339	62,1
unknown	71	15,7	43	46,2	114	20,9
Line of treatment						
1	218	48,1	38	40,9	256	46,9
2	134	29,6	27	29,0	161	29,4
≥ 3	101	22,3	28	30,1	129	23,6
LDH, Serum lactate dehydrogenase; ULN, upper normal limit; wt, wild type; mut, mutated.						

Tabella 1: Caratteristiche cliniche dei pazienti inclusi nelle indagini sieriche.

4.2 Pazienti arruolati e raccolta materiale biologico per analisi popolazioni linfocitarie

Per le indagini delle popolazioni linfocitarie circolanti sono stati inclusi un totale di 100 pazienti con melanoma trattati con nivolumab. Il 98% dei pazienti (98/100) aveva una diagnosi di melanoma avanzato stadio IV, i restanti una diagnosi di stadio III secondo la VII edizione dell'American Joint Committee on Cancer [188]. Il sangue periferico (in provette contenenti EDTA) dei pazienti con melanoma è stato raccolto presso l'Istituto Nazionale Tumori IRCCS Fondazione "G. Pascale", Napoli, Italia, dopo aver ottenuto l'approvazione del Comitato Etico e un consenso informato firmato dai pazienti. Inoltre, il sangue periferico di 20 soggetti sani è stato raccolto presso lo stesso Istituto. Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC)

sono state isolate dal sangue dei pazienti affetti da melanoma e dei soggetti sani mediante gradiente di densità Ficoll seguendo protocolli standardizzati e poi crioconservate a -80°C fino all'utilizzo. I campioni di sangue dei pazienti con melanoma sono stati raccolti prima di iniziare la terapia con nivolumab (al basale), somministrato al dosaggio di 3 mg/kg ogni 2 settimane fino alla progressione della malattia o alla comparsa di tossicità inaccettabile. Per tutti i pazienti, i dati clinici tra cui la lattato deidrogenasi sierica (LDH), l'emocromo completo, BRAF, le metastasi cerebrali, trattamenti precedenti) sono stati raccolti prima di iniziare il trattamento con nivolumab e fino all'ultimo follow-up. La valutazione del tumore è stata eseguita al basale, e ogni tre mesi. La risposta alla terapia è stata valutato ogni 12 settimane secondo i criteri RECIST V.1.1 come risposta completa (CR), risposta parziale (PR), malattia stabile (SD) o malattia progressiva (PD) [189]. Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riassunte in tabella 2.

Variables	**Number**	**%**
Total	100	100
Median age, year (range 28-90)	62	
Sex		
Male	53	53
Female	47	47
Disease Stage		
III	2	2
IV	98	98
M Category		
M0	2	2
M1	8	8
M1b	12	12
M1c	78	78
LDH		
< ULN	60	60
≥ ULN	34	34
unknown	6	6
BRAF status		
wt	54	54
mut	43	43
unknown	3	3
Brain metastasis		
yes	28	28
no	72	72
unknown	68	15,0
Line of treatment		
1	27	27
≥ 2	73	73
LDH, Serum lactate dehydrogenase; ULN, upper normal limit; wt, wild type; mut, mutated.		

Tabella 2: Caratteristiche dei pazienti inclusi nelle indagini delle popolazioni linfocitarie circolanti.

4.3 Attività AMPasica

L'attività dell'AMPasi è stata misurata mediante un test colorimetrico basato sulla quantizzazione del fosfato inorganico (Pi), come descritto in precedenza [190] in tutti i campioni di siero di pazienti con melanoma e soggetti sani. In breve, i campioni di siero sono stati scongelati e la concentrazione proteica è stata determinata mediante il saggio Bradford. Per ogni campione, 100 μg di proteine sono stati incubati per 10 minuti a 37°C in 100 μL di tampone di reazione (10 mM MgCl2, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucosio, 50 mM Tris–HCl, pH 7,4; Sigma -Aldrich). Come substrato è stato utilizzato AMP (2 mM; Sigma-Aldrich). Dopo 40 minuti di incubazione a 37°C la reazione è stata interrotta aggiungendo acido tricloroacetico ghiacciato (TCA, concentrazione finale 5%; Sigma-Aldrich) e i campioni sono stati centrifugati (3000 g, 10 minuti, 4°C). 50 μL di ciascun campione (surnatante) sono stati utilizzati per misurare i livelli di Pi prodotti durante l'idrolisi dell'AMP. I livelli di Pi prodotti durante l'idrolisi dell'AMP sono stati misurati mediante il kit per il dosaggio del fosfato "Malachite Green Phosphate Assay Kit" (8118, ScienCell Research Laboratories). A ciascun pozzetto è stato aggiunto il reagente Malachite Green Reagent A (10 μL). Dopo 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente (RT), sono stati aggiunti 10μL di Malachite Green Reagent B e la piastra è stata incubata per 20 minuti a RT. La quantità del complesso verde formatosi come prodotto della reazione è direttamente correlata alla concentrazione di Pi nei campioni e la sua assorbanza è stata letta allo spettrofotometro a 630 nm. Per quantificare i livelli di Pi di base, ogni campione è stato testato anche senza substrato (AMP). Il valore netto di Pi è stato ottenuto sottraendo la quantità di Pi di base dal Pi rilasciato dopo l'idrolisi dell'AMP. I risultati sono mostrati come Pi pmol /min/mg di proteine. Per confermare che la reazione dell'AMPasi dipendeva dall'attività del CD73, 71 campioni scelti a caso sono stati testati anche in presenza di adenosina 5'-α,β-metilen difosfato (APCP; 100 μM, Sigma-Aldrich), un potente inibitore chimico competitivo di CD73. APCP è stato aggiunto ai campioni 30 minuti prima di aggiungere il substrato a 37°C. Il test di attività CD73 è stato quindi eseguito come descritto sopra.

4.4 Spettrometria di massa con monitoraggio di reazioni multiple

L'attività dell'AMPasi è stata anche valutata mediante la spettrometria di massa con monitoraggio di reazioni multiple (MRM-MS) in campioni scelti casualmente, sia pazienti che donatori sani. Il volume dei campioni contenente 100 μg di proteine è stato equilibrato nel tampone di reazione, come descritto sopra, a 37°C per 10 min; quindi i campioni sono stati trattati o meno con l'inibitore APCP (100 μM) o con l'antiumano CD73 mAb (Clone 7G2)

(5μg/ml), che inibisce l'attività enzimatica del CD73 come precedentemente descritto [191] per 30 min a 37° C. Quindi è stato aggiunto 15N-AMP (25μM; Sigma–Aldrich) e la reazione è proseguita per 120 minuti a 37°C. Infine, 25μL di ciascun campione sono stati trattati con TCA (5% di concentrazione finale; Sigma–Aldrich) per estinguere la reazione e successivamente sono stati quindi centrifugati (3000 g, 10 minuti a 4°C). I surnatanti sono stati essiccati all'aria e poi disciolti in 50 μL di acetato di ammonio 10 mM (AmAC, Sigma – Aldrich) contenente lo 0, 1% di acido acetico (AA; Sigma – Aldrich). I campioni ottenuti sono stati sottoposti all'analisi UPLC-ESI-MRM-MS per quantificare il 15N-AMP. Le analisi UPLC-ESI-MRM-MS sono state eseguite su un Q-TRAP 6500 di AB Sciex dotato di sistemi Shimadzu LC-20A e Auto Sampler, iniettando 2μL di ciascun campione. La separazione UPLC è stata eseguita su una colonna Luna Omega Polar 1,6μm C18 100 Å (50 × 2,10 mm, Phenomenex, Torrance, USA) a una portata di 400 μL/min. Come fasi mobili sono stati utilizzati 10 mM AmAc/0,1% AA in H_2O (fase A) e 0,1% AA in MeOH (fase B) ed è stato sfruttato il seguente gradiente: 0% B da 0 a 0,5 min, da 0% a 5% B oltre 2,5 min, dal 5% al 95% B in 2 min, quindi mantenuto al 95% B per 2 min e riequilibrato allo 0% B in 5 min. Q-TRAP 6500 è stato utilizzato in modalità di scansione MRM positiva, con potenziale di de-clustering (DP) impostato a 80 V, potenziale di ingresso (EP) a 10 V, energia di collisione (CE) a 30 V e potenziale di uscita della cella (CXP) a 12 V. 15N-AMP è stato monitorato attraverso la transizione 353.19/140.00: l'area del relativo picco in ciascun campione è stata misurata utilizzando il software Analyst di AB Sciex. I dati sono riportati come percentuale della diminuzione di 15N-AMP.

4.5 ELISA

sCD73 è stato quantificato nei sieri selezionati casualmente di 84 pazienti con melanoma e 38 soggetti sani, utilizzando un kit ELISA disponibile in commercio (Human CD73 ELISA Kit NT5E, ab213761, Abcam), seguendo le istruzioni del produttore. L'assorbanza è stata letta a 450 nm utilizzando un lettore di micropiastre. I dati vengono visualizzati come ng/ml.

4.6 Citometria a flusso

I PBMC congelati sono stati scongelati, fatti riposare brevemente e poi incubati con gli anticorpi. Le sottopopolazioni di PBMC sono state analizzate utilizzando i seguenti anticorpi: CD3-V500, CD8-APC clone BW135/80, PD-1-PE clone PD1.3.1.3 (tutti della Miltenyi Biotec S.r.l.) e CD73 PE-Cy7 clone AD2 (BioLegend UK Ltd). I dati dei campioni sono stati acquisiti utilizzando un FACS Aria II (Becton-Dickinson, USA). La vitalità delle cellule è stata valutata mediante colorazione 7-AAD. Le cellule morte sono state escluse selezionando solo le cellule

7-AAD-negative. La popolazione di linfociti è stata identificata usando una classificazione morfologica sul forward/side light scatters (FSC-A e SSC-A, rispettivamente) e ulteriormente classificati in base all'espressione di CD3 e CD8. L'espressione di CD73 e/o PD-1 è stata determinata sulle cellule di interesse T CD3+CD8+. I dati sono stati analizzati utilizzando il software Kaluza 1.2 (Beckman Coulter).

4.7 Analisi statistiche

Le caratteristiche di base dei pazienti sono state descritte utilizzando statistiche descrittive. I dati di questo studio sono presentati utilizzando frequenze e percentuali assolute quando si fa riferimento a variabili categoriali, mentre con mediana e range quando si considerano variabili quantitative. Il metodo Kaplan-Meier è stato utilizzato per stimare le probabilità di sopravvivenza associate alla malattia dei pazienti e il log-rank test è stato utilizzato per verificare le differenze a valori di cut-off identificati con la mediana. Il tempo di OS è stato calcolato dalla data della prima dose di nivolumab alla data del decesso (dovuto al melanoma) o censurato alla data dell'ultimo follow-up. L'analisi di regressione di Cox per la sopravvivenza è stata eseguita e riportata come hazard ratio (HR). L'analisi multivariata è stata eseguita utilizzando un metodo basato sulle statistiche Wald con p= 0, 05 e p= 0, 10 come immissione e rimozione del limite. Per queste analisi è stato utilizzato il software statistico IBM SPSS v. 21.0. Tutte le altre analisi sono state eseguite utilizzando GraphPad Prism v.7.0. Il test di Mann-Whitney o il test ANOVA sono stati utilizzati rispettivamente per il confronto di due gruppi o per il confronto di tre o più gruppi. Il numero di campioni per ogni sottogruppo è indicato nelle legende delle figure. Valori di $p<0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

5 Risultati

5.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati per le indagini sierologiche

Un totale di 546 pazienti con melanoma metastatico sono stati analizzati per le indagini sierologiche. (Figura 8). L'età mediana era di 64 anni; 324 pazienti (59,3%) erano maschi e 222 (40,7%) erano femmine. BRAF era mutato in 180 pazienti, 315 pazienti erano wild-type per BRAF; mentre per 51 pazienti lo stato mutazionale era sconosciuto. Le metastasi cerebrali erano presenti in 87/435 pazienti, mentre le metastasi ossee erano presenti in 93/432. I livelli sierici di lattato deidrogenasi (LDH) erano elevati in 157 pazienti. Per quanto riguarda i regimi di trattamento, 182 pazienti hanno ricevuto nivolumab e 271 pazienti hanno ricevuto pembrolizumab; nivolumab in combinazione con ipilimumab è stato somministrato a 93 pazienti. Pertanto, un totale di 453/546 pazienti (83%) ha ricevuto un inibitore anti-PD-1 (nivolumab o pembrolizumab) (218 pazienti in prima linea di trattamento, 134 in seconda linea e 101 in trattamento ≥3 linee); e 93/546 pazienti (17%) sono stati trattati con inibitori anti-PD-1 più CTLA-4 (gruppo di terapia nivolumab più ipilimumab) (38 pazienti in prima linea, 27 in seconda linea e 28 pazienti in terza o più linee). Le caratteristiche clinico-patologiche di base di tutti i pazienti, raggruppati secondo il regime di trattamento, sono riassunte in tabella 1. Le caratteristiche basali dei gruppi di pazienti erano comparabili (Figura 8). La sopravvivenza mediana libera da progressione (PFS) era di 7,1 mesi (95% intervallo di confidenza (CI): 5,3-8,8) e la sopravvivenza globale mediana (OS) era di 27,0 mesi (95% CI: 22,7-31,3). Escludendo i pazienti che sono stati persi al follow-up e hanno interrotto la terapia, 154 pazienti (35%) che hanno ricevuto agenti anti-PD-1 in monoterapia (n=447) hanno avuto una risposta favorevole alla terapia [risposta completa (CR) o risposta parziale (PR)], mentre gli altri 293 (65%) hanno mostrato malattia progressiva (PD) o malattia stabile (SD). Nel gruppo di pazienti in trattamento con nivolumab somministrato in combinazione con ipilimumab (n=90), 28 pazienti (32%) hanno mostrato una risposta favorevole, mentre 62 pazienti (68%) hanno mostrato progressione o stabilità di malattia in seguito al trattamento.

5.2 Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati per le indagini delle popolazioni linfocitarie circolanti

Sono stati inclusi un totale di 100 pazienti con melanoma trattati con nivolumab. Le caratteristiche di base dei pazienti sono mostrate in tabella 2. L'età mediana era di 62 anni; 53 pazienti erano maschi e 47 femmine. Lo stato mutazionale di BRAF era noto per 97 pazienti: 43 pazienti (43%) avevano un melanoma BRAF-mutato, 54 pazienti (54%) erano wild-type per

BRAF. Metastasi cerebrali erano presenti in 28/100 pazienti (28%). 27 pazienti hanno ricevuto nivolumab come terapia di prima linea; mentre 73 pazienti avevano precedentemente ricevuto ipilimumab da solo o in combinazione con un inibitore BRAF. Su 100 pazienti, 58 pazienti (58%) hanno mostrato PD, 22 pazienti (22%) hanno mostrato SD, 20 pazienti (20%) hanno mostrato PR o CR. Per definire quali sottoinsiemi della popolazione di cellule erano associati alla risposta clinica, i pazienti con CR, PR o SD per più di 6 mesi (39/100 pazienti) sono stati arbitrariamente raggruppati in pazienti con beneficio clinico (CB) mentre il gruppo senza beneficio clinico (NCB) mostra PD o SD per meno di 6 mesi (61/100 pazienti). La durata media della SD per i pazienti con beneficio clinico prima della progressione è stata di 16,4 mesi. Il follow-up mediano per questo studio è stato di 11 mesi. Anche un totale di 20 soggetti sani (maschio, n=15; femmina, n=5), di età >18 anni, sono stati analizzati.

5.3 L'attività e l'espressione basale di sCD73 sono elevate nel siero dei pazienti con melanoma

Abbiamo valutato l'idrolisi dell'AMP per azione del sCD73 in campioni di siero di pazienti con melanoma prima di iniziare il trattamento con agenti anti-PD-1 (basale) e in donatori sani. L'attività dell'AMPasi era significativamente più alta nei pazienti con melanoma metastatico (37,85 ± 44,31 pmol/min/mg di proteina) che nei donatori sani (7,88 ± 15,84 pmol/min/mg di proteina) ($p<0,0001$) (Figura 8a). Per valutare se il CD73 fosse responsabile dell'idrolisi dell'AMP, i campioni dei pazienti sono stati pre-incubati con il più potente inibitore noto del CD73, l'APCP, ottenendo una marcata riduzione dei livelli di fosfato inorganico ($p<0,0001$) (Figura 8b). Per scoprire se le fosfatasi alcaline potrebbero contribuire a defosforilare l'AMP in adenosina e fosfato inorganico [188], abbiamo valutato l'attività della fosfatasi alcalina tessuto-non specifica (TNAP) presente nel sangue in forma solubile [192]. L'attività di questi enzimi, valutata misurando l'idrolisi del substrato bis(p-nitrofenil)fosfato, è stata osservata solo a pH 9,8 (dati non mostrati) che è la condizione ottimale per la loro attività catalitica [193], ma non a pH fisiologico 7,4 (dati non mostrati). Questi risultati suggeriscono che le fosfatasi non specifiche non contribuiscono a idrolizzare il substrato AMP alle condizioni sperimentali in cui abbiamo misurato l'attività di CD73. Per verificare ulteriormente se l'attività dell'AMPasi era dipendente da CD73 abbiamo valutato la riduzione di 15N AMP come substrato tramite MRM-MS in presenza e assenza di APCP o anticorpo monoclonale anti-CD73 umano (clone 7G2) in un sottogruppo di pazienti con melanoma. La percentuale di diminuzione del 15N AMP nei campioni di pazienti con melanoma era significativamente ridotta in presenza dell'inibitore di CD73 APCP così come in presenza dell'anticorpo specifico anti-CD73 rispetto al controllo

(Figura 8c). Nei campioni di siero di donatori sani, la percentuale di idrolisi del 15N AMP era molto bassa o quasi assente (dati non mostrati). Complessivamente questi risultati indicano che l'idrolisi dell'AMP esogeno nel siero dei pazienti con melanoma dipende dal CD73. L'espressione di CD73 è stata determinata tramite ELISA in campioni di siero. Il livello di espressione del CD73 nel siero era significativamente più alto nei pazienti con melanoma che nei donatori sani (p=0,0369) (Figura 8d). L'analisi dei risultati e la curva ROC (receiving operating characteristic) per l'attività e l'espressione di CD73, indica che i livelli di attività di CD73 stratificavano meglio i pazienti con melanoma dai soggetti sani (Figura 8e).

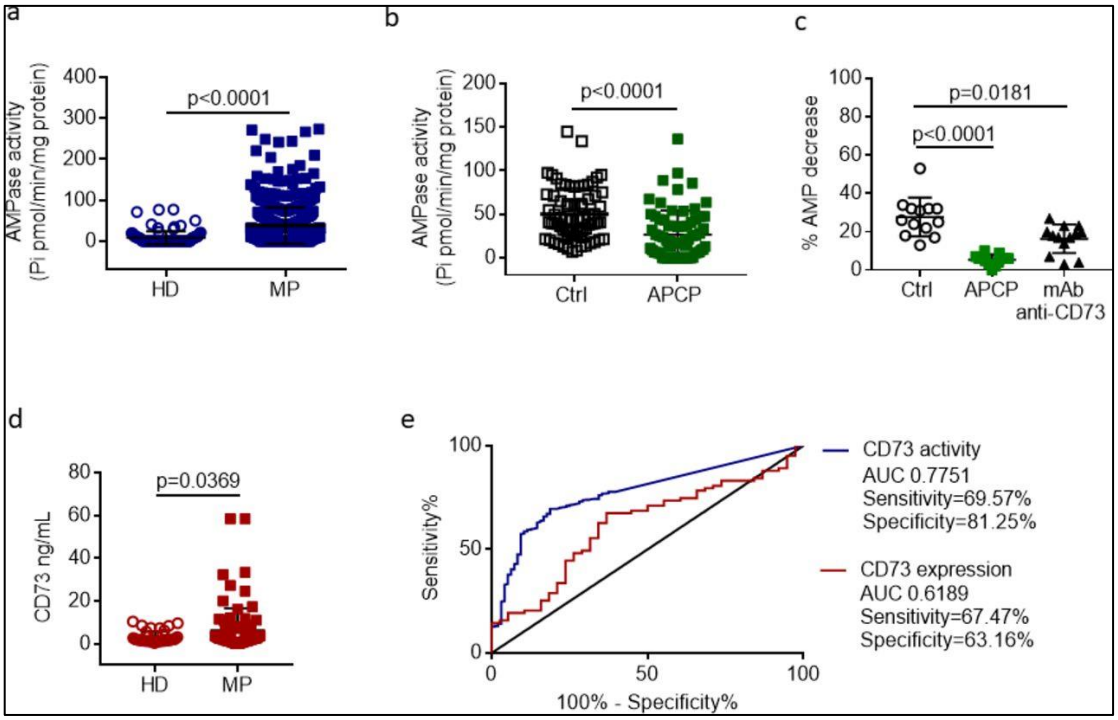

Figura 8: Il livello di attività enzimatica di sCD73 discrimina i pazienti con melanoma metastatico da donatori sani. **a)** Attività AMPasica in campioni di siero di pazienti affetti da melanoma (MP, n=546) e donatori sani (HD; n=96), misurata con il kit Malachite Green Assay. **b)** L'idrolisi dell'AMP nei campioni di pazienti affetti da melanoma è significativamente ridotta in presenza dell'inibitore selettivo del CD73, APCP (100µM) (n=71). **c)** Percentuale di idrolisi dell'AMP 15N mediante MRM-MS in campioni di pazienti affetti da melanoma (n=13) in presenza di APCP (100 µM) o anticorpo monoclonale anti-CD73 umano (Clone 7G2) (5 µg/ml) o veicolo (Ctrl). **d**) ELISA di CD73 nel siero di pazienti affetti da melanoma (MP, n=83) e donatori sani (HD, n=38). **e**) analisi della curva ROC per l'espressione della proteina CD73 e l'attività enzimatica CD73 nei pazienti con melanoma rispetto ai donatori sani. Media ± sd è mostrata. I valori di p-value provengono dal test di Mann-Whitney (a, b, d) o dal test ANOVA (c).

Il CD73 è l'enzima chiave nella generazione di adenosina extracellulare da AMP. L'AMP è a sua volta prodotto da ADP/ATP attraverso l'attività enzimatica dell'ectonucleotidasi CD39. Pertanto, sia il CD39 che il CD73, in reazioni sequenziali, sono coinvolti in modo critico nella regolazione dei livelli di adenosina extracellulare nei tumori solidi [190, 194]. A questo

proposito, abbiamo anche valutato l'attività dell'ATPasi CD39 in campioni di siero di pazienti con melanoma usando ATP come substrato. Abbiamo osservato che la percentuale di riduzione dell'ATP nei campioni di siero dei pazienti, anche in presenza dell'inibitore di CD39 ARL 67156, era trascurabile (Figura 9). Questi risultati escludono qualsiasi attività rilevante del CD39 nel siero dei pazienti con melanoma, in accordo con precedenti rapporti che mostrano che le attività ATPasica e ADPasica nel sangue umano sono principalmente mediate da enzimi legati alle cellule [195]. L'espressione di CD39 è stata valutata anche in campioni di siero di soggetti sani e di pazienti con melanoma. Nessuna differenza è stata osservata nell'espressione di CD39 tra i due gruppi (Figura 9).

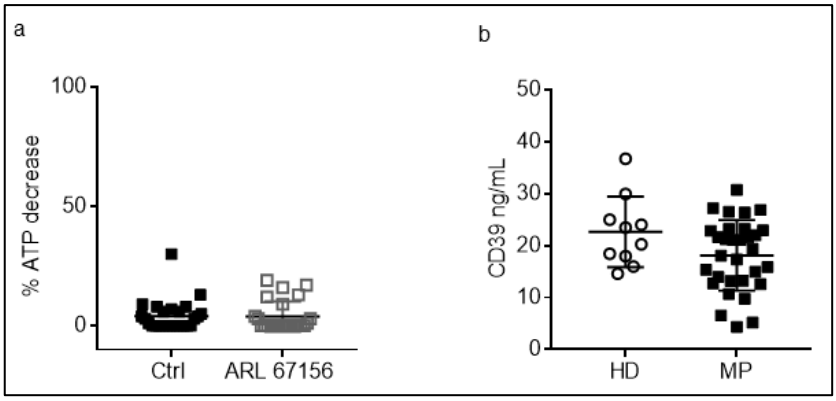

Figura 9: Riduzione dell'ATP ed espressione sierica del CD39. **a)** L'attività ATPasica del CD39è stata valutata in presenza di ATP (2nM) in 26 pazienti con melanoma. La reazione è stata bloccata con TCA (5%) dopo 40 minuti di incubazione. I livelli di ATP sono stati determinati usando ATP assay Kit (ab83355, Abcam). La percentuale di idrolisi dell'ATP è stata anche valutata in presenza di un inibitore selettivo del CD39, ARL67156 (100nM, Sigma-Aldrich) o di un controllo (Ctrl). **b)** L'espressione del CD39 è stata valutata nel siero di 31 pazienti affetti da melanoma e 10 soggetti sani mediante un kit ELISA commerciale seguendo le istruzioni del produttore (Human CD39 ELISA Kit, LS-F25268, Life Span BioSciences inc).

5.4 I livelli di attività di sCD73 sono correlati alla risposta alla terapia

Abbiamo precedentemente riportato che l'attività di CD73 del siero nei pazienti con melanoma è correlata alla risposta al trattamento con nivolumab [194]. Qui, abbiamo esteso questa evidenza ad un maggior numero di pazienti di diversi centri, che hanno ricevuto una terapia con anticorpi anti-PD-1 (nivolumab o pembrolizumab) da soli o in combinazione con ipilimumab. L'attività pre-trattamento di CD73 è risultata significativamente più alta nei pazienti che non hanno risposto alla terapia anti-PD-1 (monoterapia +/- anti-CTLA-4) ($p<0,0001$; Figura 10a). È stata eseguita un'analisi dettagliata di CD73 rispetto ai pazienti trattati con nivolumab o pembrolizumab da soli o con nivolumab più ipilimumab. L'attività basale di CD73 nei pazienti con melanoma trattati con nivolumab o pembrolizumab da soli è risultata significativamente

aumentata nei pazienti con progressione o malattia stabile (PD/SD) rispetto ai pazienti con risposta completa o parziale (CR/PR) (p=0,0013; Figura 10b). L'attività di CD73 al basale era significativamente diversa anche tra i pazienti che rispondevano (CR/PR) o non riuscivano (PD/SD) al trattamento combinato nivolumab più ipilimumab (p=0,0052; Figura 10c). Inoltre, i livelli pre-trattamento dell'attività di CD73 erano più alti nei pazienti con PD/SD rispetto ai pazienti con CR/PR che avevano ricevuto un inibitore anti-PD-1 in monoterapia come prima linea o seconda linea di trattamento (Figura 11a e 11b, rispettivamente).

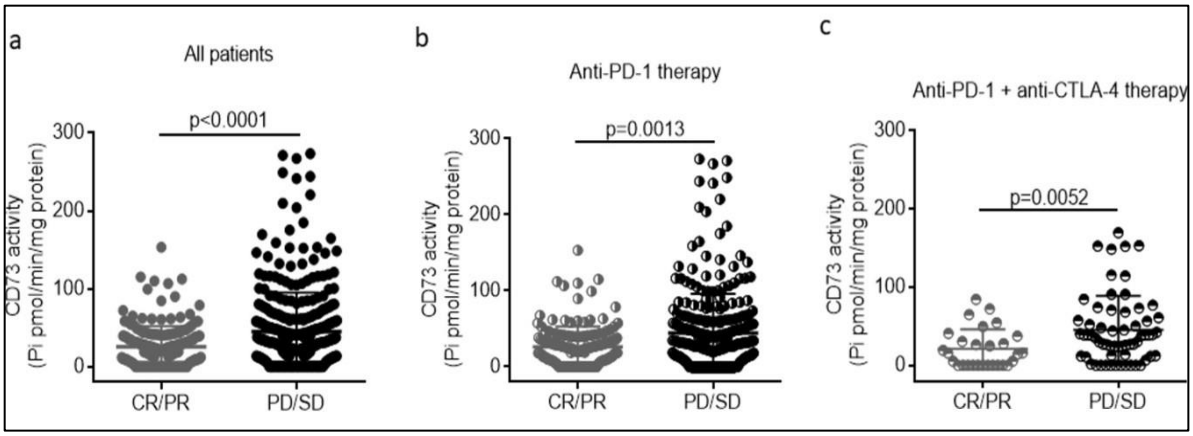

Figura 10: L'attività sierica basale del CD73 predice la risposta alla terapia anti-PD-1. **a)** attività CD73 al basale in tutti i pazienti, che hanno ricevuto agenti anti PD-1 da soli (n=447) o in combinazione con anti-CTLA-4 (n=90), con risposta clinica (CR, risposta completa/PR, risposta parziale; n=183) o senza risposta clinica (PD, malattia progressiva/DS, malattia stabile; n=354). **b)** Attività CD73 al basale in pazienti con o senza risposta clinica a nivolumab o pembrolizumab da soli (CR/PR, n=154; PD/SD, n=293) o a nivolumab più ipilimumab (CR/PR, n=28; PD/SD, n=62) (**c**). Media ± sd è mostrata. I valori di p-value provengono dal test di Mann-Whitney.

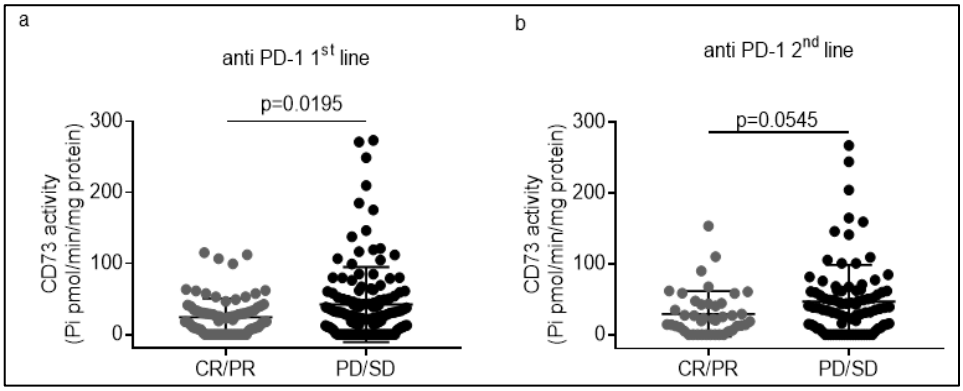

Figura 11: L'attività sierica basale del CD73 e beneficio clinico alla terapia in prima linea o seconda lineamento per malattia metastatica. I livelli pre-trattamento dell'attività di CD73 erano più alti nei pazienti con PD/SD rispetto ai pazienti con CR/PR a terapia con anti-PD1 sia come prima linea che seconda linea di trattamento (Figura 11a e 11b, rispettivamente). I valori di p-value provengono dal test di Mann-Whitney.

Successivamente, abbiamo valutato l'attività del CD73 sierico nei pazienti sottoposti a terapia anti-PD-1 entro 3 mesi dalla terapia. I cambiamenti nell'attività di CD73 non erano evidenti al mese 3 (quando l'intero gruppo di pazienti è stato valutato) rispetto al basale (Figura 12a). In particolare, nei pazienti che non hanno risposto alla terapia con nivolumab o pembrolizumab i livelli di attività di CD73 sono rimasti più alti di quelli con benefici clinici al mese 3 di trattamento e invariati rispetto al basale (Figura 12b). Le analisi non sono state eseguite nel gruppo di pazienti in trattamento con nivolumab più ipilimumab a causa del piccolo numero di campioni disponibili.

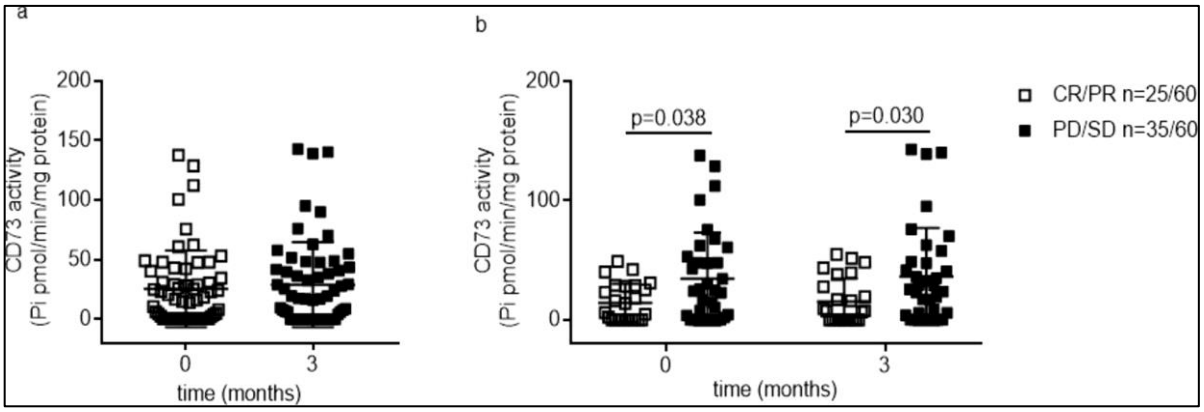

Figura 12: Livelli di attività sierica del CD73 entro 3 mesi di terapia con agenti anti-PD-1. **a)** Livelli di attività sierica del CD73 ai punti temporali prima (0) e durante il trattamento (3 mesi) in tutti i pazienti analizzati (n=60). **b**) Confronto dell'attività sierica del CD73 in pazienti con o senza benefici clinici rispetto a nivolumab o pembrolizumab nei momenti pre (0) e durante il trattamento (3 mesi). Media ± sd è mostrata. I valori di p-value sono stati calcolati con il test ANOVA (b).

5.5 Associazioni dell'attività basale di sCD73 con la sopravvivenza

Essendo l'attività enzimatica basale di CD73 correlata all'esito della terapia con anti-PD-1, abbiamo successivamente valutato le possibili associazioni tra l'attività enzimatica di CD73 e la sopravvivenza globale (OS). Il miglior cut-off discriminativo di CD73 per la progressione precoce è stato fissato come media dell'attività di CD73 nei soggetti sani ± 2 volte la deviazione standard (attività di CD73 nei soggetti sani è uguale a 7,9 ± 15,8 pmol/min/mg di proteina): 38,8 pmol/min/mg di proteina. Abbiamo trovato che alti livelli di attività enzimatica di CD73 nel siero si associano a una peggiore OS (HR=1,36; 95% CI 1,03-1,78; p=0,03) (Figura 13a) e PFS (HR=1,42; 95% CI 1,13-1,79; p=0,003) in pazienti trattati con nivolumab o pembrolizumab da soli. Nessuna associazione è stata trovata per la OS (Figura 13b) e la PFS con la terapia nivolumab più ipilimumab (p=0,23 e p=0,31, rispettivamente). Tra i pazienti trattati con nivolumab o pembrolizumab da soli sono state eseguite ulteriori analisi in base a età, sesso, livelli di lattato deidrogenasi (LDH), metastasi cerebrali o ossee e stato della

mutazione BRAF. Nei pazienti di età <65 anni abbiamo trovato una correlazione negativa con la OS per alti livelli di attività di CD73 rispetto ai pazienti con bassa attività CD73 (HR= 1,87; 95% CI 1,26-2,78; p=0,002) (Figura 14a), ma non nei pazienti anziani (dati non mostrati). Una correlazione negativa con l'OS per alti livelli di attività di CD73 è stata osservata anche nel gruppo di pazienti femmine (HR= 1,69; 95% CI 1,11-2,59; p=0,01) (Figura 14b), ma non nel gruppo di pazienti maschi (dati non mostrati). Tra i pazienti con elevati livelli di LDH, l'attività del CD73 permette una buona stratificazione tra un gruppo con una maggiore sopravvivenza (CD73 basso) e uno con una minore sopravvivenza (CD73 alto) (HR= 2,94; 95% CI 1,86-4,64; p<0,0001) (Figura 14c), ma non nel gruppo di pazienti con livelli sierici di LDH inferiori a ULN. Tra i pazienti con tumori con mutazioni in BRAF abbiamo osservato che l'OS è peggiore nei pazienti che hanno sia livelli elevati di CD73 che BRAF mutato rispetto ai pazienti con BRAF mutato ma CD73 basso (HR= 1,85; 95% CI 1,11-3,08; p=0,02) (Figura 14d); nessuna differenza è stata osservata nel sottogruppo di pazienti con tumori senza mutazioni BRAF. Abbiamo osservato che l'OS è peggiore nei pazienti che hanno sia livelli elevati di CD73 che metastasi ossee (HR= 2,41; 95% CI 1,27-4,57; p=0,006) rispetto ai pazienti con metastasi ossee ma CD73 basso (Figura 14e). Abbiamo osservato una tendenza simile anche nel sottogruppo di pazienti con metastasi cerebrali e CD73 alto rispetto ai pazienti con metastasi cerebrali ma CD73 basso (HR=1,74; 95% CI 0,96-3015; p=0,066) (Figura 14f).

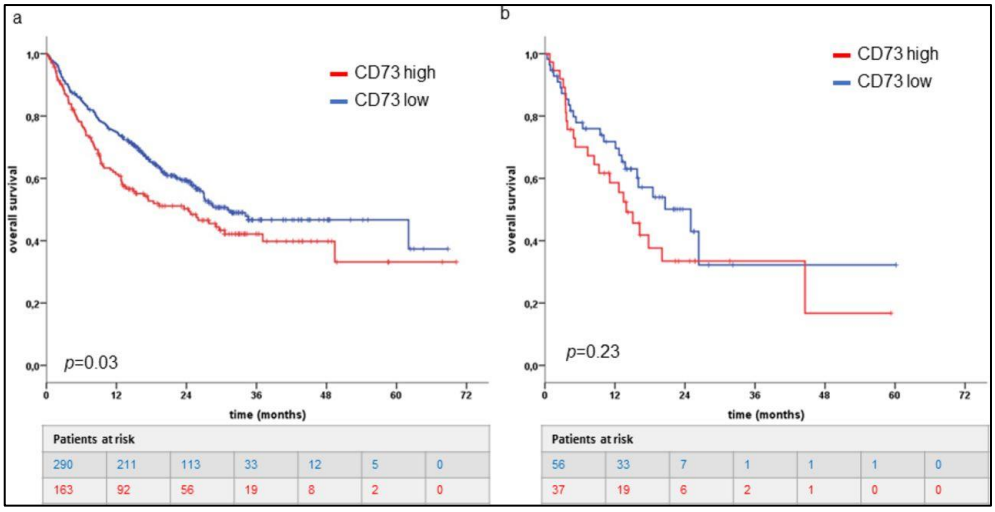

Figura 13: Valore prognostico del CD73 solubile in pazienti con melanoma metastatico. **a)** Le curve di Kaplan-Meier stimano la sopravvivenza globale di tutti i pazienti trattati con nivolumab o pembrolizumab o **(b)** nivolumab più ipilimumab in base all'attività sierica basale di CD73. CD73 alto (linea rossa) è >38,8 pmol/min/mg di proteina e CD73 basso è < 38,8 pmol/min/mg di proteina (linea blu). I valori di p-value sono stati calcolati utilizzando il log-rank test.

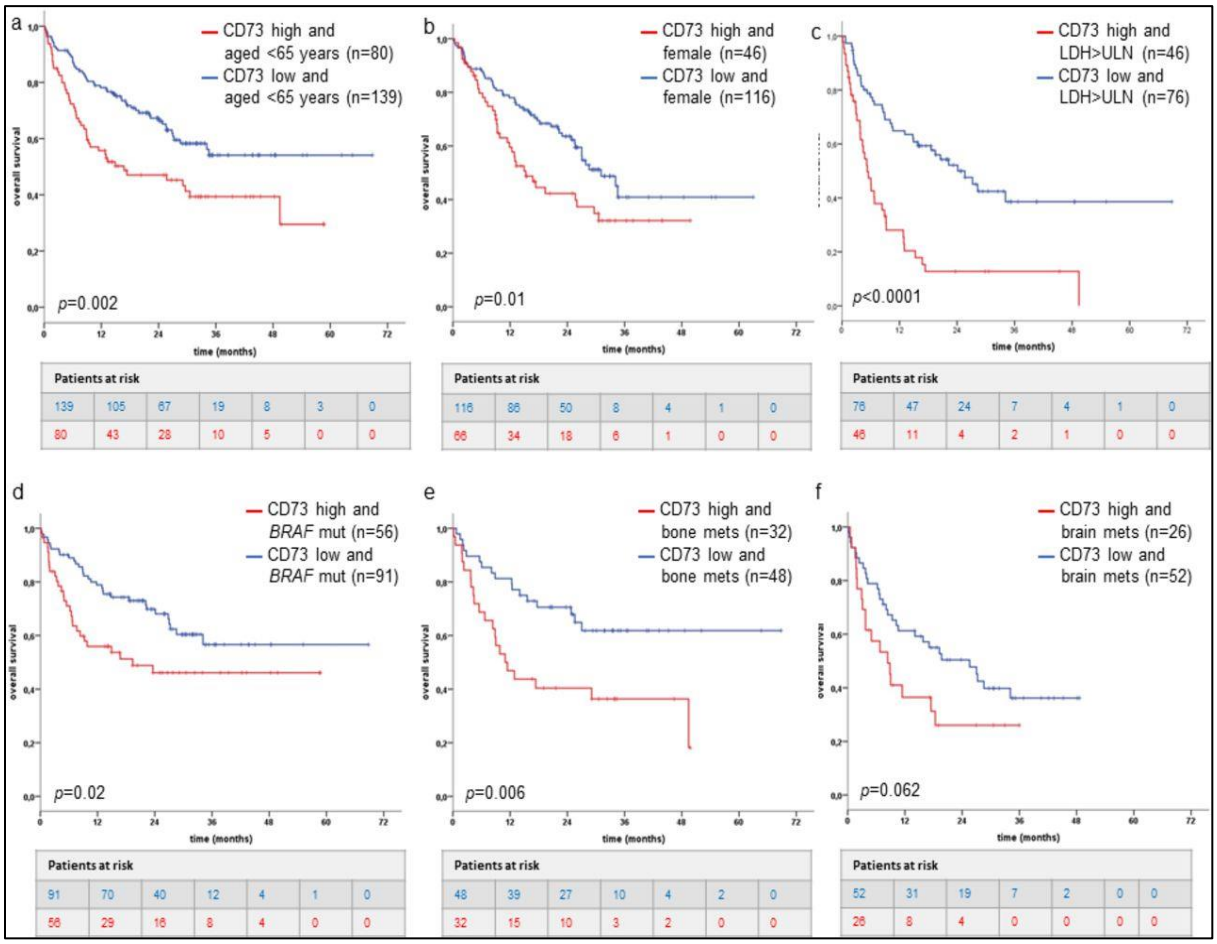

Figura 14: Valore prognostico del CD73 solubile nei sottogruppi di pazienti con melanoma metastatico che ricevono monoterapia con anti-PD-1. I Gruppi di pazienti di età <65 anni (**a**) o di sesso femminile (**b**) o con livelli elevati di lattato deidrogenasi sierica (LDH) (**c**) o con mutazioni BRAF (**d**) o con metastasi ossee (**e**) o con metastasi cerebrali (**f**) e elevata attività CD73 (>38,8 pmol/min/mg di proteine) (linea rossa) hanno una sopravvivenza globale peggiore rispetto ai pazienti con bassa attività CD73 (<38,8 pmol/min/mg di proteine). I valori di p-value sono stati calcolati utilizzando il log-rank test.

5.6 sCD73 è un biomarcatore prognostico nel melanoma

Infine, i pazienti che hanno ricevuto nivolumab o pembrolizumab in monoterapia sono stati analizzati mediante analisi di regressione Cox univariata e multivariata per valutare l'impatto di sesso, età, stato di mutazione di BRAF, livelli sierici di LDH, linea di trattamento, metastasi e attività sierica basale di CD73. L'analisi univariata ha mostrato che alti livelli di LDH, la presenza di metastasi cerebrali e alti livelli di attività enzimatica di CD73 nel siero erano significativamente associati a una più breve OS e PFS (Tabella 3). Questi fattori sono stati anche analizzati in un modello di analisi multivariata: oltre alla LDH sierica e alle metastasi cerebrali, l'attività di CD73 sierica sembrava essere un fattore prognostico indipendente (OS: HR=1,52, 95% CI 1,11-2,08; p=0,009; PFS: HR=1,58 95% CI 1,22-2,05, p=0,001) (Tabella 3).

Variables	Overall survival		Progression free survival	
	Univariate HR (95% CI)	Multivariate HR (95% CI)	Univariate HR (95% CI)	Multivariate HR (95% CI)
Age (≥65 vs <65)	1.18 (0.90-1.54) p=0.23		1.01 (0.81-1.26) p=0.41	
Disease stage (IV vs III)	1.86 (1.10 to 3.14) P=0.02		1.36 (0.92 to 2.00) p=0.12	
Sex (male vs female)	0.95 (0.72-1.25) p=0.72		1.01 (0.80-1.27) p=0.95	
LDH (>UNL vs <UNL)	2.22 (1.67-2.95) p<0.0001	2.40 (1.74-3.31) p<0.0001	1.46 (1.14-1.88) p=0.003	1.61 (1.21-2.14) p=0.001
BRAF status (mut vs wt)	0.79 (0.58-1.07) p=0.12		1.18 (0.93-1.52) p=0.16	
Brain metastasis (yes vs no)	1.78 (1.28-2.48) p=0.001	1.79 (1.27-2.53) p=0.001	1.62 (1.21-2.15) p=0.001	1.76 (1.31-2.36) p<0.0001
Bone metastasis (yes vs no)	0.96 (0.67-1.37) p=0.81		0.99 (0.74-1.34) p=0.97	
Line of treatment (1 vs >1)	1.06 (0.81-1.38) p=0.69		0.97 (0.77-1.21) p=0.77	
sCD73 activity (>38.9 vs <38.9)	1.36 (1.03-1.78) p=0.03	1.52 (1.11-2.08) p=0.009	1.42 (1.13-1.79) p=0.003	1.58 (1.22-2.05) p=0.001
LDH, Serum lactate dehydrogenase; ULN, upper normal limit; wt, wild type; mut, mutated.				

Tabella 3: Analisi dei pazienti che hanno ricevuto nivolumab o pembrolizumab in monoterapia mediante regressione Cox univariata e multivariata.

5.7 Frequenza delle cellule T periferiche CD8+CD73+ nei pazienti con melanoma e nei soggetti sani

Abbiamo studiato la frequenza dei sottoinsiemi di linfociti CD8+ periferici CD73+ e/o PD-1+ mediante analisi di citometria a flusso. La caratterizzazione di queste cellule è stata eseguita in campioni di sangue di pazienti con melanoma prima di iniziare la terapia con nivolumab, come indicato sopra, e in soggetti sani. I pazienti con melanoma hanno presentato una frequenza ridotta di cellule T CD8+ totali rispetto ai soggetti di controllo (25,1% vs 33,28%, rispettivamente; p=0,008) (Figura 15a). I linfociti CD8+PD-1+ erano presenti con una frequenza mediana del 9,8% nei pazienti con melanoma e dell'11,0% nei soggetti sani (Figura 15b). La frequenza del sottogruppo di linfociti CD8+ che esprimeva il CD73 era del 5,8 % e del 7,7 % nei pazienti con melanoma e nei donatori sani, rispettivamente (Figura 15c). Le cellule CD73+ tra le cellule CD8+PD-1+ erano il 2,3% nei pazienti con melanoma e l'1,97% nei donatori sani (Figura 15d).

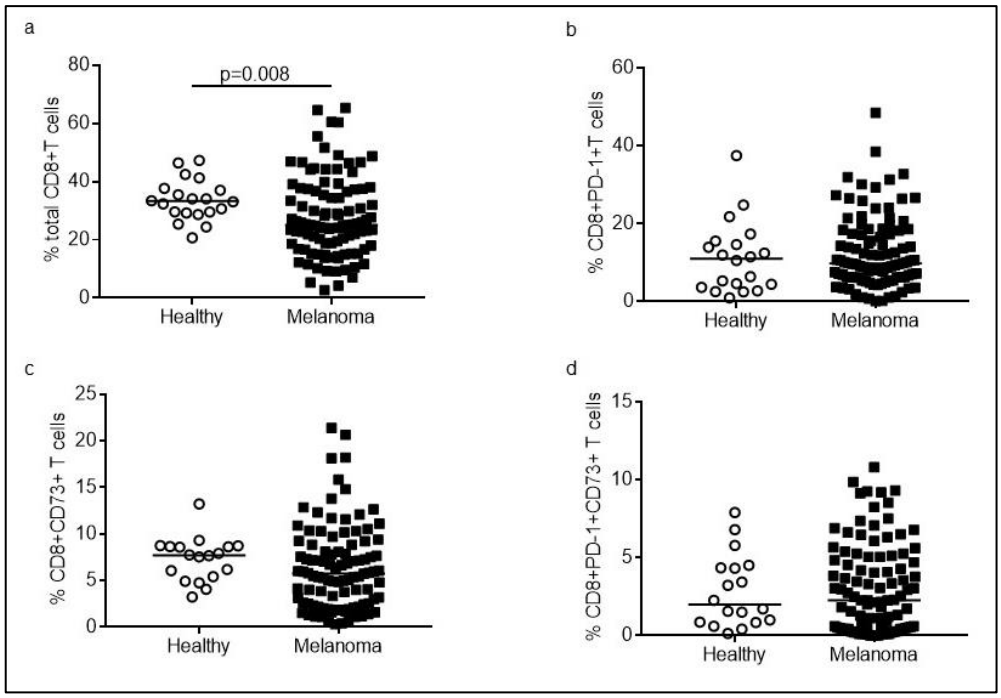

Figura 15: Analisi delle cellule T CD3+CD8+ su PBMC. (**a**) Percentuale di cellule CD8+ totali, (**b**) percentuale di cellule CD8+PD-1+, (**c**) percentuale di cellule CD8+CD73+ e (**d**) percentuale di cellule CD8+PD-1+CD73+ nei pazienti con melanoma (n=100) rispetto a sani soggetti (n=20). L'analisi statistica è stata eseguita con il test di Mann-Whitney. La linea indica la mediana.

5.8 Valutazione dell'associazione della frequenza delle cellule T CD8+CD73+ pre-trattamento con la overall survival in pazienti trattati con nivolumab

La frequenza delle cellule CD8+ del sangue periferico nei pazienti affetti da melanoma, insieme all'emocromo disponibile e alle caratteristiche cliniche, sono state analizzate per identificare i fattori pre-trattamento associati all'OS mediante Cox regression analisys. Abbiamo trovato correlazioni negative significative con l'OS per livelli di LDH molto alti (rapporto valore LDH/LDH normale >2) ($p<0,0001$), metastasi cerebrali ($p<0,008$), bassa conta relativa dei linfociti ($p=0,001$), bassa conta relativa degli eosinofili ($p=0,006$), alta conta assoluta e relativa dei neutrofili (entrambi, $p=0,001$) (Tabella 4), confermando il potenziale di questi parametri derivati dal sangue come biomarcatori nelle terapie di inibizione del checkpoint immunitario [196]. Anche un basso rapporto neutrofili-linfociti (NLR) e un basso NLR derivato (dNLR) sono risultati significativamente associati all'OS nei pazienti trattati con nivolumab (Tabella 4), in accordo con i dati recentemente pubblicati [197]. Concentrandosi sui sottoinsiemi di cellule CD8+, i linfociti CD8+PD-1+ con frequenza mediana <9,8% ($p<0,009$) e i linfociti CD8+PD-1+ CD73+ con frequenza mediana <2,3% ($p<0,001$) erano significativamente associati alla OS, mentre la percentuale di cellule T CD8+ positive solo a CD73 non risultava significativamente associata alla OS (Tabella 4). In un modello multivariato, la frequenza mediana di linfociti

CD8+PD-1+CD73+<2,3% era anche associata a una sopravvivenza globale più lunga [HR 2,17 (1,34-3,51); p=0,002].

Variables	HR (95%CI)
Sex (male vs female)	0.92 (0.58-1.46) p=0.73
Age (>62 vs < 62)	0.70 (0.44-1.12) p=0.13
BRAF (mut vs wt)	1.06 (0.66-1.70) p=0.81
Brain metastasis (yes vs no)	1.92 (1.18-3.11) p=0.008
LDH **(High vs normal)** **(Very high vs normal)**	 1.62 (0.86-3.04) p=0.13 4.64 (2.52-8.54) p<0.0001
Previous lines of treatment **(2 vs 1)** **(≥3 vs 1)**	 1.12 (0.62-2.02) p=0.69 1.38 (0.75-2.54) p=0.30
Metastatic site **(lung vs soft tissue)** **(visceral vs soft tissue)**	 0.76 (0.30-1.87) p=0.54 1.85 (0.93-3.65) p=0.08
Absolute lymphocyte count	0.87 (0.60-1.25) p=0.45
Relative lymphocyte count (≥20 vs <20)	0.96 (0.93-0.98) p=0.001
Relative monocyte count	0.94 (0.82-1.06) p=0.32
Relative eosinophil count (≥1.5 vs <1.5)	0.75 (0.62-0.92) p=0.006
Absolute neutrophil count (≥8 vs < 8)	1.11 (1.04-1.17) p=0.001
Relative neutrophil count (≥70 vs <70)	1.04 (1.01-1.06) p=0.001
NLR	1.04 (1.02-1.06) p<0.0001
dNLR	1.09 (1.04-1.14) p<0.0001
Total CD8+ cells (≥25.1 vs <25.1)	1.37 (0.86-2.18) p=0.18
CD8+CD73+ cells (≥5.8 vs <5.8)	1.55 (0.97-2.48) p=0.07
CD8+PD-1+ cells (≥9.8 vs <9.8)	1.86 (1.17-2.98) p=0.009
CD8+ PD-1+CD73+cells (≥2.3 vs <2.3)	2.25 (1.39-3.63) p=0.001
HR, hazard ratio; CI, confidence interval; LDH, lactate dehydrogenase; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; dNLR, derived NLR.	

Tabella 4. Cox regression analysis.

La OS mediana dei pazienti, basata sui sottoinsiemi di linfociti CD8+ circolanti al valore di cut-off identificato con la mediana, è riportata nella tabella 5. La frequenza delle cellule T CD8+ circolanti positive a PD-1 era inversamente associata alla sopravvivenza (p=0,008) (Tabella 5 e Figura 16a). In particolare, i pazienti con basse percentuali di linfociti CD8+PD-1+CD73+ (<2,3%) (n=52/100) hanno avuto una maggiore OS (22,4 mesi) rispetto ai pazienti con una maggiore frequenza di linfociti CD8+PD-1+CD73+ (6,9 mesi) (n=48/100) (Tabella 5 e Figura 16b). La frequenza dei linfociti CD8+PD-1+CD73+ è risultata anche significativamente associata alla sopravvivenza libera da progressione (PFS) in questi pazienti (Tabella 5).

Variables	Cut-off (median frequency)	Median OS (months) (95% CI)	p value	Median PFS (months) (95% CI)	p value
CD8+ lymphocytes	<25.1% >25.1%	15.4 (5.8-25.0) 6.9 (0.1-13.7)	0.18	3.9 (0.8-7.0) 3.2 (1.1-5.3)	0.24
CD8+CD73+ lymphocytes	<5.8% >5.8%	17.9 (4.9-30.9) 8.0 (0.8-15.2)	0.06	3.9 (0-10.1) 3.1 (0.9-5.3)	0.22
CD8+PD-1+ lymphocytes	<9.8% >9.8%	19.2 (10.1-28.3) 6.0 (0-12.8)	0.008	5.9 (0.4-11.4) 2.6 (1.7-3.5)	0.02
CD8+PD-1+CD73+ lymphocytes	<2.3% >2.3%	22.4 (13.6-31.2) 6.9 (0.8-13.0)	0.001	9.0 (0-19.9) 2.7 (2.1-3.3)	<0.0001

Tabella 5. OS e PFS in funzione della frequenza delle popolazioni cellulari riportate.

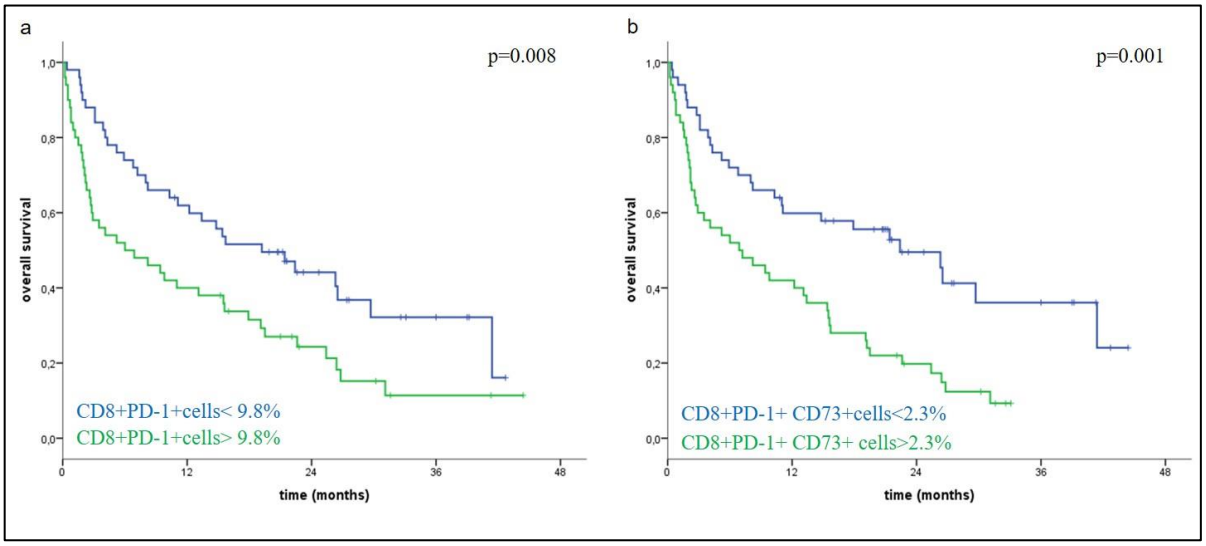

Figura 16. Curve di Kaplan-Meier che mostrano la relazione tra OS e la sottopopolazione di linfociti CD8+PD-1+ (**a**) e CD8+PD-1+CD73+ (**b**) prima del trattamento con nivolumab. I valori di p-value sono stati calcolati mediante log-rank test.

5.9 Associazione tra i livelli basali dei linfociti CD8+CD73+ circolanti e la risposta clinica al nivolumab.

Poiché i nostri dati indicano un'associazione tra la proporzione di linfociti CD8+PD-1+CD73+ e la sopravvivenza, abbiamo studiato se ci fosse una correlazione tra queste cellule e il beneficio clinico al nivolumab. I pazienti sono stati arbitrariamente stratificati in due gruppi in base alla risposta clinica alla terapia con nivolumab, come dettagliato nella sezione Materiale e metodi. Non sono stati osservati cambiamenti significativi nelle frequenze dei linfociti CD8+PD-1+ tra i pazienti con beneficio clinico al nivolumab (gruppo CB) e quelli senza beneficio clinico (gruppo NCB) (p=0,07; Figura 17a). Invece, i pazienti che hanno avuto un beneficio clinico al trattamento con nivolumab (gruppo CB) hanno mostrato una frequenza mediana pre-trattamento più bassa di linfociti CD8+PD-1+CD73+ circolanti (0,85%) rispetto ai pazienti che

sono andati in progressione al trattamento con nivolumab (gruppo NCB) (3,02%) (p=0,02) (Figura 17b). Inoltre, abbiamo anche valutato se c'era una correlazione tra queste cellule e il beneficio clinico nei pazienti trattati con nivolumab di prima linea rispetto al nivolumab di seconda/terza linea. La proporzione di linfociti CD8+PD-1+CD73+ nei pazienti trattati con nivolumab di prima linea (27/100 pazienti) è risultata inferiore a quella osservata nei pazienti trattati con nivolumab di seconda/terza linea (73/100 pazienti) (1,8% di frequenza mediana contro 2,26% di frequenza mediana, rispettivamente), sebbene la differenza non fosse statisticamente significativa. In particolare, tra i pazienti trattati con nivolumab di 1a linea abbiamo osservato che la frequenza dei linfociti CD8+PD-1+CD73+ (0,65% frequenza mediana) era significativamente più bassa nei pazienti con beneficio clinico (13/27 pazienti) rispetto a quelli senza beneficio clinico (5,24% frequenza mediana; 14/27 pazienti) (p=0,049) (Figura 17c). Tra il gruppo di pazienti trattati con nivolumab di seconda/terza linea, la frequenza di linfociti CD8+PD-1+CD73+ nei pazienti con beneficio clinico (26/73 pazienti) era dell'1,0% rispetto al 2,75% osservato nei pazienti senza beneficio clinico (47/63 pazienti) (Figura 17d). Questi risultati indicano che la risposta clinica al trattamento con nivolumab è significativamente associata a bassi livelli di linfociti CD8+PD-1+CD73+ pre-trattamento e in base al numero di trattamenti precedenti la frequenza di queste cellule era significativamente alta nei pazienti senza beneficio clinico trattati con nivolumab di prima linea.

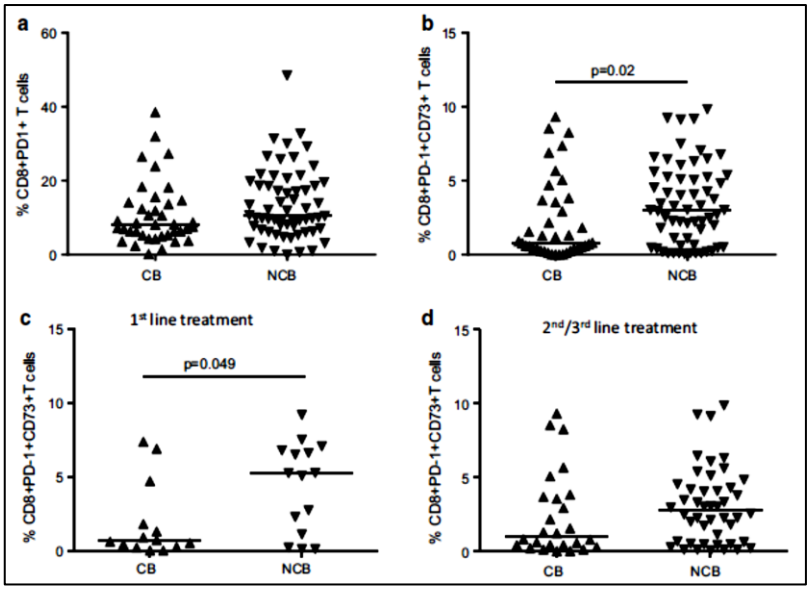

Figura 17. Frequenze basali dei linfociti CD8+PD-1+ (**a**) e CD8+PD-1+CD73+ (**b**) nei gruppi di pazienti suddivisi in base al beneficio clinico del trattamento con nivolumab. Frequenze basali dei linfociti CD8+PD-1+CD73+ nei sottogruppi di pazienti con trattamento di 1a linea (**c**) e 2a/3a linea (**d**) in base al beneficio clinico della terapia con nivolumab. CB, beneficio clinico, n=39/100; BCN, non beneficio clinico, n=61/100. L'analisi statistica è stata eseguita con il test di Mann-Whitney. La linea indica la mediana.

6 Discussione e Conclusioni

Il melanoma è un tumore maligno che, nonostante rappresenti solo l'1% dei tumori della pelle, è responsabile di oltre l'80% dei decessi per cancro della pelle [1]. Prima dell'era della terapia mirata e dell'immunoterapia, la sopravvivenza dei pazienti dopo la diagnosi di malattia metastatica si attestava solo su 6-9 mesi [6,14,15]. Le principali scoperte della terapia mirata e dell'immunoterapia hanno migliorato significativamente le prospettive per i pazienti, tuttavia, sulla base degli ultimi dati sulla sopravvivenza globale a 5 anni, il 50-72% dei pazienti non sopravvive oltre i 5 anni [16,17,18]. La prognosi è sfavorevole soprattutto nei pazienti in stadio IV, i cui tassi di sopravvivenza a 5 anni sono del 34-50% [16,20]. Nonostante i progressi nella comprensione della fisiopatologia e delle basi genetiche del melanoma, nonché nell'ampliamento delle possibilità terapeutiche, solo una porzione di pazienti ottiene benefici a lungo termine. Sebbene siano stati condotti molti studi per identificare potenziali biomarcatori predittivi e/o prognostici utili per identificare i pazienti che rispondono alle terapie, ad oggi non sono disponibili biomarcatori universalmente riconosciuti. C'è una mancanza di biomarcatori prognostici, e questo è uno dei principali limiti all'uso delle nuove terapie, in particolare dell'immunoterapia. Nell'era della medicina personalizzata, al fine di superare questi ostacoli, è evidente la necessità di identificare biomarcatori che permettano un'appropriata selezione dei pazienti che possano realmente beneficiare dal trattamento, indirizzando in modo specifico le scelte terapeutiche. Negli ultimi anni, uno dei pathway di segnalazione diventato argomento di grande interesse nella ricerca sul cancro, a causa di un numero crescente di evidenze che mostrano un suo coinvolgimento nella progressione tumorale e nelle metastasi, è il pathway dell'adenosina. Esiste una bibliografia consolidata in cui è stato ampiamente valutato il potenziale valore prognostico di un'alta espressione di CD73 all'interno di varie lesioni tumorali [198,199]. Nel melanoma, CD73 è regolato epigeneticamente nelle cellule maligne e i pazienti con melanoma mostrano un'alta frequenza di metilazione dell'isola CpG di CD73 sia nella malattia primaria che metastatica [200]. Livelli elevati di CD73 sono stati trovati in pazienti con melanoma all'ultimo stadio [201] e l'alta espressione di CD73 in cellule di lesioni metastatiche è risultata associata a una ridotta OS [202]. Tuttavia, la rilevanza dell'espressione di CD73 nel melanoma come fattore prognostico è debole a causa dell'espressione eterogenea di CD73 nel melanoma primario rispetto al melanoma metastatico. Abbiamo dunque spostato la nostra attenzione sulla forma solubile di CD73 rilevabile nel siero dei pazienti. La forma solubile di CD73 (sCD73) nel sangue periferico è stata studiata in diversi tipi di tumore. Studi precedenti nei tumori testa/collo hanno dimostrato che l'espressione sierica di CD73 era

aumentata nei pazienti con tumore rispetto ai soggetti sani e la sua attività enzimatica era associata alla stadiazione [203]. Inoltre, molto recentemente sono stati pubblicati dati ottenuti da pazienti con metastasi epatiche di tumore colon-rettale che mostrano che alti livelli di espressione di sCD73 sono associati a una sopravvivenza più breve [204]. Questi risultati indicano che il sCD73 può servire come biomarcatore ematico non invasivo per l'esito della patologia tumorale. Tuttavia, non è chiaro se il sCD73 sia un biomarcatore clinicamente utile per la prognosi e la risposta all'immunoterapia nei pazienti con melanoma. Nel presente studio abbiamo cercato di approfondire questo aspetto e abbiamo innanzitutto osservato che i pazienti con melanoma avevano elevati livelli di CD73 solubile nel sangue periferico e l'attività enzimatica di CD73 ha ben stratificato i pazienti con melanoma dai soggetti sani. Livelli elevati di attività enzimatica del CD73 nel sangue periferico possono probabilmente riflettere un'elevata espressione del CD73 tissutale. Tuttavia, in questo studio retrospettivo che include pazienti con melanoma metastatico non possiamo esplorare il livello di CD73 nelle lesioni tumorali, quindi non sappiamo se esiste una correlazione tra i livelli circolanti di CD73 solubile e quelli espressi sulle lesioni tumorali e questo aspetto potrebbe costituire un goal dei nostri studi futuri. Nel melanoma, è stata precedentemente proposta la valutazione dell'attività del sCD73 nel sangue come biomarcatore di risposta all'immunoterapia con nivolumab [205]. I risultati del presente lavoro estendono ulteriormente quelli già in nostro possesso e supportano l'associazione tra l'attività di CD73 nel siero e gli esiti clinici della terapia con inibitori dei checkpoints immunitari. Infatti, è stato osservato che i pazienti con alti livelli basali di attività enzimatica di CD73 hanno presentato una OS più breve rispetto ai pazienti con bassa attività basale di CD73 al trattamento con nivolumab o pembrolizumab. Questo risultato supporta la nozione che l'attività di sCD73 è un fattore associato a una prognosi negativa nei pazienti con melanoma, che potrebbe integrare il valore prognostico di altre caratteristiche utili per dirigere la terapia del paziente. Inoltre, l'attività basale di sCD73 sembra predire la risposta all'immunoterapia con agenti anti-PD-1. Abbiamo osservato, infatti, che dopo 3 mesi di trattamento, l'attività di sCD73 non è cambiata rispetto al livello basale e, soprattutto, che i pazienti non rispondenti avevano livelli più elevati di sCD73 rispetto ai rispondenti. Questo suggerisce che l'attività del sCD73 nel sangue periferico non è cambiata durante il trattamento, almeno nei primi tre mesi e fino quindi alla prima rivalutazione clinica. In alternativa, l'alta attività di sCD73 può rappresentare un meccanismo di resistenza all'immunoterapia. Poiché sCD73 è il principale enzima responsabile della produzione di adenosina extracellulare, nota per essere un potente soppressore della risposta immunitaria antitumorale mediata dalle cellule T, i nostri risultati sollevano la possibilità che l'adenosina derivata da CD73 potrebbe

contrastare l'immunità antitumorale, limitando a sua volta l'efficacia degli agenti anti-PD-1. Sono sicuramente auspicabili ulteriori indagini per stabilire la rilevanza funzionale del sCD73 nel sangue periferico come markers di meccanismo di evasione immunitaria del tumore. A nostro parere, questi risultati rafforzano il potenziale terapeutico del targeting di sCD73 in combinazione con agenti anti PD-1 per migliorare le risposte e i tassi di sopravvivenza nei pazienti con melanoma. In conclusione, abbiamo rilevato livelli elevati di attività di sCD73 nel siero nei pazienti con melanoma rispetto ai donatori sani. Un'elevata attività basale di sCD73 è fortemente associata a una peggiore risposta e sopravvivenza nei pazienti sottoposti a terapia anti-PD-1. I nostri risultati offrono la possibilità di utilizzare il sCD73 solubile nel sangue come un biomarcatore predittivo per gli esiti clinici della terapia anti-PD-1.

In un'altra coorte di pazienti, abbiamo analizzato i linfociti CD8+PD-1+ periferici nei pazienti con melanoma prima del trattamento con nivolumab, esplorando la proporzione di cellule positive al CD73. Abbiamo scoperto che le frequenze basali dei linfociti CD8+PD-1+CD73+ nel sangue periferico dei pazienti trattati con nivolumab erano associate al beneficio clinico. In particolare, i pazienti con alte frequenze basali di linfociti CD8+PD-1+CD73+ circolanti hanno avuto scarsi risultati dal trattamento con nivolumab. Questi risultati suggeriscono quindi un ruolo potenziale dei linfociti CD8+ periferici positivi a CD73 nel predire la risposta terapeutica anti-PD-1 nei pazienti con melanoma. Gli agenti anti-PD-1, prevenendo l'inattivazione delle cellule T nel microambiente tumorale, aumentano la risposta antitumorale nei pazienti con cancro migliorando significativamente la sopravvivenza globale. Tuttavia, la maggior parte dei pazienti non risponde agli anticorpi monoclonali anti-PD-1, evidenziando la necessità di comprendere i potenziali meccanismi di resistenza alla terapia checkpoint, utili sia per migliorare l'efficacia del trattamento che per prevedere la risposta dei pazienti. Ad oggi, sono stati identificati alcuni fattori che correlano con la risposta clinica agli agenti anti-PD-1. Un certo numero di fattori derivati dal sangue, tra cui un'alta conta relativa degli eosinofili e dei linfociti, un basso dNLR, un basso LDH e l'assenza di metastasi diverse dai tessuti molli/polmone sono stati associati a una migliore OS nei pazienti con melanoma trattati con agenti anti-PD-1 [206,207]. Inoltre, un elevato carico mutazionale nei tumori umani, compreso il melanoma, è correlato alla risposta clinica agli inibitori PD-1 [208]. Tuttavia l'eterogeneità del tessuto tumorale e la natura dinamica del microambiente tumorale, hanno spinto i ricercatori a valutare più fattori che possono contribuire a fornire una caratterizzazione dettagliata dello stato del sistema immunitario dei pazienti. È stata anche studiata la correlazione di diversi sottoinsiemi di cellule T con gli esiti dei pazienti oncologici trattati con inibitori del checkpoint immunitario. La presenza di cellule T CD8+PD-1+ nelle lesioni tumorali (associate

all'espressione PD-L1 del tumore) [209,210,211] è stata associata all'efficacia terapeutica degli agenti anti-PD-1. Nei pazienti con melanoma l'espressione di PD-1 sulle cellule CD8+T infiltranti il tumore o sulle cellule T circolanti è stata considerata come un marcatore di cellule T reattive al tumore [212,213,214,215]. Qui abbiamo esaminato la correlazione dei linfociti del sangue che esprimono CD73, insieme a PD-1, con OS e PFS in pazienti con melanoma trattati con nivolumab. Abbiamo osservato che la frequenza di cellule T CD8+PD-1+CD73+ è significativamente associata all'OS dei pazienti con melanoma metastatico. Una bassa frequenza pre-trattamento di cellule T CD8+PD-1+CD73+ nel sangue periferico dei pazienti con melanoma è stata associata al beneficio clinico di nivolumab, indicando che l'analisi di CD73 sulle cellule T circolanti al basale può aiutare a identificare sottoinsiemi di pazienti che più probabilmente beneficeranno del trattamento con nivolumab.

Questo studio rafforza ulteriormente il potenziale valore prognostico di CD73 e incoraggia ad esplorare agenti anti-CD73 in combinazione con farmaci anti-PD-1 per migliorare ulteriormente la risposta immunitaria nei pazienti con melanoma.

7 Bibliografia

1. National Cancer Institute Melanoma of the Skin-Cancer Stat Facts. Available online: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ melan.html.
2. Ferlay J et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. Available online: https://gco.iarc.fr/today.
3. Rabbie R et al. Melanoma subtypes: Genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. J. Pathol. **2019**, 247, 539–551.
4. Yang J et al. Treatment of uveal melanoma: Where are we now? Ther. Adv. Med. Oncol. **2018**, 10, 1758834018757175.
5. Sung H et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA. Cancer J. Clin. 2021, 71, 209–249.
6. 'Melanoma', Melanoma Patient Network Europe. http://melanomapatientnetworkeu.org/melanoma.html.
7. M. Arnold et al. 'Trends in incidence and predictions of cutaneous melanoma across Europe up to 2015', J Eur Acad Dermatol Venereol, vol. 28, no. 9, pp. 1170–1178, Sep. 2014.
8. Hollestein LM et al. Trends of cutaneous melanoma in The Netherlands: increasing incidence rates among all Breslow thickness categories and rising mortality rates since 1989. Ann. Oncol., vol. 23, no. 2, pp. 524–530, Feb. 2012.
9. Bleyer A et al. Cancer in 15- to 29-year-olds by primary site. Oncologist, vol. 11, no. 6, pp. 590–601, Jun. 2006.
10. Aben KK et al. Cancer in adolescents and young adults (15-29 years): a population-based study in the Netherlands 1989-2009. Acta Oncol, vol. 51, no. 7, pp. 922–933, Sep. 2012.
11. 'Cancer Statistics Review, 1975-2013 - Previous Version - SEER Cancer Statistics Review', SEER. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/index.html.
12. Gershenwald JE et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual.CA: A Cancer Journal for Clinicians, vol. 67, no. 6, pp. 472–492, 2017.
13. Schadendorf D et al. Melanoma. Lancet, vol. 392, no. 10151, pp. 971–984, 15 2018.
14. Abbasi NR et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. JAMA, vol. 292, no. 22, pp. 2771–2776, Dec. 2004.

15. Eigentler TK et al. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. Lancet Oncol. vol. 4, no. 12, pp. 748–759, Dec. 2003.
16. Long GVet al. Long-Term Outcomes in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Who Received Dabrafenib Combined With Trametinib. J. Clin. Oncol., vol. 36, no. 7, pp. 667–673, 01 2018.
17. Hodi FS 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., vol. 19, no. 11, pp. 1480–1492, 2018.
18. C. Robert et al., 'Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study', Lancet Oncol., vol. 20, no. 9, pp. 1239–1251, Sep. 2019.
19. A. M. M. Eggermont et al., 'Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma', N. Engl. J. Med., vol. 378, no. 19, pp. 1789–1801, May 2018.
20. J. Larkin et al., 'Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma', N. Engl. J. Med., vol. 381, no. 16, pp. 1535–1546, 17 2019.
21. Hessler M, Jalilian E, Xu Q, et al. Melanoma Biomarkers and Their Potential Application for In Vivo Diagnostic Imaging Modalities. Int J Mol Sci. 2020 Dec 16;21(24):9583.
22. Grob JJ & Bonerandi JJ. 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).
23. Schadendorf D et al Melanoma Biomarkers and Their Potential Application for In Vivo Diagnostic Imaging Modalities. Int J Mol Sci. 2020 Dec 16;21(24):9583.
24. Melanoma - Pathology - Orthobullets. (https://www.orthobullets.com/pathology/6093/melanoma).
25. Breslow A. Prognosis in cutaneous melanoma: tumor thickness as a guide to treatment. Pathol. Annu. 15, 1–22 (1980).
26. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 1970;172: 902−08.
27. Balch CM et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol 2009;27: 6199−206.
28. Gershenwald JE et al. Melanoma staging: evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin 2017; 67: 472−93.

29. Grob JJ et al. Eighth American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma classification: let us reconsider stage III. Eur J Cancer 2018; 91: 168−70.
30. de Vries E BF et al. Malignant melanoma: introduction. Lyon: IARC Press, 2006.
31. Hessler M et al. Melanoma Biomarkers and Their Potential Application for In Vivo Diagnostic Imaging Modalities. Int J Mol Sci. 2020 Dec 16;21(24):9583.
32. Grob JJ & Bonerandi JJ. 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).
33. Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. Cell 2015; 161: 1681−96.
34. Hayward NK et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. Nature 2017; 545: 175−80.
35. Lawrence MS et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature 2013; 499: 214−18.
36. Shain AH et al. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. N Engl J Med 2015; 373: 1926−36.
37. Huang FW et al. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. Science 2013; 339: 957−59.
38. Horn S et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. Science 2013; 339: 959−61.
39. Griewank KG et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. J Nat Can Inst 2014; 106 pii:dju246.
40. Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. Cell 2015; 161: 1681−96.
41. Bono A et al. Ambulatory narrow excision for thin melanoma (< or = 2 mm): results of a prospective study. Eur J Cancer 1997; 33: 1330−32.
42. Cohn-Cedermark G, et al. Long term results of a prospective randomized study by the Swedish Melanoma Study Group on 2-cm versus 5-cm resection margins for patients with cutaneous melanoma with a tumor thickness of 0.8−2.0 mm. Cancer 2000; 89: 1495−501.
43. Thomas JM et al. Excision margins in high-risk malignant melanoma. N Engl J Med 2004; 350: 757−66.
44. Hayes AJ et al. Wide versus narrow excision margins for high-risk, primary cutaneous melanomas: long-term follow-up of survival in a randomised trial. Lancet Oncol 2016; 17: 184−92.

45. Veronesi U et al. Inefficacy of immediate node dissection in stage 1 melanoma of the limbs. N Engl J Med 1977; 297: 627−30.
46. Sim FH et al. A prospective randomized study of the efficacy of routine elective lymphadenectomy in management of malignant melanoma. Preliminary results. Cancer 1978; 41: 948−56.
47. Balch CM et al. Efficacy of an elective regionale lymph node dissection of 1 to 4 mm thick melanomas for patients 60 years of age and younger. Ann Surg 1996; 224: 255−63.
48. Cascinelli N et al. Immediate or delayed dissection of regional nodes in patients with melanoma of the trunk: a randomized trial. WHO Melanoma Programme. Lancet 1998; 351: 793−96.
49. Morton DL et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. N Engl J Med 2014; 370: 599−609.
50. Leiter U et al. Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymphnode biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 2016; 17: 757−67.
51. Faries M et al. Completion dissection or observation for sentinel-node metastasis in melanoma. N Engl J Med 2017; 376: 2211−22.
52. Coit D. The enigma of regional lymph nodes in melanoma. N Engl J Med 2017; 376: 2280−81.
53. Eggermont AMM et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. Lancet Oncol 2015; 16: 522−30.
54. Eggermont AMM et al. Prolonged survival in stage III melanoma with ipilimumab adjuvant therapy. N Engl J Med 2016; 375: 1845−55.
55. Weber J et al. Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage III or IV melanoma. N Engl J Med 2017; 377: 1824−35.
56. Eggermont AMM et al. Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage III melanoma. N Engl J Med 2018; 378: 1789−801.
57. Long GV et al. Adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III BRAF-mutated melanoma. N Engl J Med 2017; 377: 1813−23.
58. Larkin J et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in braf-mutated melanoma. N Engl J Med 2014; 371: 1867−76.
59. Long GV et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. N Engl J Med 2014; 371: 1867−76.

60. Long GV et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. Lancet 2015; 386: 444−51.
61. Robert C et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. N Engl J Med 2015; 372: 30−39.
62. 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 2018; 19: 603−15.
63. Dummer R et al. Results of COLUMBUS part 2: a phase 3 trial of encorafenib plus binimetinib versus encorafenib in BRAF-mutant melanoma. ESMO 2017 Congress; Madrid, Spain; Sept 8–12, 2017. 12150.
64. Ascierto PA et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. Lancet Oncol 2016; 17: 1248–60.
65. Long GV et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. Ann Oncol 2017; 28: 1631–39.
66. Larkin J et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in braf-mutated melanoma. N Engl J Med 2014; 371: 1867−76.
67. Ascierto PA, Marincola FM. What have we learned from cancer immunotherapy in the last 3 years? *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 141–141.
68. Schadendorf D et al. Health-related quality of life in the randomised KEYNOTE-002 study of pembrolizumab versus chemotherapy in patients with ipilimumab-refractory melanoma. *Eur. J. Cancer* **2016**, *67*, 46–54.
69. Schadendorf D et al. Health-related quality of life results from the phase III CheckMate 067 study. *Eur. J. Cancer* **2017**, *82*, 80–91.
70. Petrella TM et al. Patient-reported outcomes in KEYNOTE-006, a randomised study of pembrolizumab versus ipilimumab in patients with advanced melanoma. *Eur. J. Cancer* **2017**, *86*, 115–124.
71. Mamoor M et al. Quality of life in long-term survivors of advanced melanoma treated with checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *8*, e000260.
72. Rogiers A et al. Long-Term Survival, Quality of Life, and Psychosocial Outcomes in Advanced Melanoma Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *J. Oncol.* **2019**, *2019*, 1–17.

73. Madonna G et al. PD-L1 expression with immune-infiltrate evaluation and outcome prediction in melanoma patients treated with ipilimumab. OncoImmunology **2018**, 7, e1405206.
74. Hodi FS et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. N. Engl. J. Med. **2010**, 363, 711–723.
75. Larkin J et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N. Engl. J. Med. **2015**, 373, 23–34.
76. Balar A Weber JS. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: Current status and future directions. Cancer Immunol. Immunother. **2017**, 66, 551–564.
77. Larkin J et al. Overall Survival in Patients With Advanced Melanoma Who Received Nivolumab Versus Investigator's Choice Chemotherapy in CheckMate 037: A Randomized, Controlled, Open-Label Phase III Trial. J. Clin. Oncol. **2018**, 36, 383–390.
78. 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 **2017**, 390, 1853–1862.
79. Larkin J et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. N Engl J Med 2015; 373: 23−34.
80. Postow MA et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. N Engl J Med 2015; 372: 2006−17.
81. Weber JS et al. Sequential administration of nivolumab and ipilimumab with a planned switch in patients with advanced melanoma (CheckMate 064): an open-label, randomised, phase 2 trial. Lancet Oncol 2016; 17: 943−55.
82. Wolchok JD et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. N Engl J Med 2017; 377: 1345−56.
83. Hodi FS et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. Lancet Oncol 2016; 17: 1558−68.
84. Schadendorf D et al. Melanoma. Lancet. 2018 Sep 15;392(10151):971-984.
85. Sunshine JC et al. PD-L1 expression in melanoma: a quantitative immunohistochemical antibody comparison. Clin Can Res 2017; 23: 4938−44.
86. Zhao T et al. Prognostic value of PD-L1 expression in tumor infiltrating immune cells in cancers: a meta-analysis. PLoS One 2017; 12: e0176822.
87. Byrne EH, Fisher DE. Immune and molecular correlates in melanoma treated with immune checkpoint blockade. Cancer 2017; 123 (suppl 11): 2143−53.

88. Allard B et al. The adenosine pathway in immuno-oncology. Nat Rev Clin Oncol. 2020 Oct;17(10):611-629.
89. Thompson EA, Powell JD. Inhibition of the Adenosine Pathway to Potentiate Cancer Immunotherapy: Potential for Combinatorial Approaches. Annu Rev Med. 2021 Jan 27;72:331-348.
90. Jin R et al. Dual Mechanisms of Novel CD73-Targeted Antibody and Antibody-Drug Conjugate in Inhibiting Lung Tumor Growth and Promoting Antitumor Immune-Effector Function. Mol Cancer Ther. 2020 Nov;19(11):2340-2352.
91. Schäkel L et al. Nucleotide Analog ARL67156 as a Lead Structure for the Development of CD39 and Dual CD39/CD73 Ectonucleotidase Inhibitors. Front Pharmacol. 2020 Sep 8;11:1294.
92. Allard D et al. CD73-adenosine: a next-generation target in immuno-oncology. Immunotherapy. 2016;8(2):145–63.
93. Wang R et al. Prognostic value of CD73-adenosinergic pathway in solid tumor: a meta-analysis and systematic review. Oncotarget. 2017;8(34):57327–36.
94. Huang Q et al. Levels and enzyme activity of CD73 in primary samples from cancer patients. Philadelphia. AACR; Cancer Res 2015;75 (15 Suppl): p. 1538.
95. Hay C et al. MEDI9447: enhancing anti-tumor immunity by targeting CD73 In the tumor microenvironment. Philadelphia: AACR; Cancer 2015;75(15 Suppl): p. 285.
96. Morello S et al. Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. J Transl Med. 2017 Dec 4;15(1):244.
97. Boison D & Yegutkin GG. Adenosine metabolism: emerging concepts for cancer therapy. Cancer Cell 36, 582–596 (2019).
98. Boison D. in The Adenosine Receptors 13–32 (Humana Press, 2018).
99. Yegutkin GG et al. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. Biochemical J. 367, 121–128 (2002).
100. Kaczmarek E et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. J. Biol. Chem. 271, 33116–33122 (1996).
101. Donaldson SH et al. Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 26, 209–215 (2002).

102. Deterre P et al. Coordinated regulation in human T cells of nucleotide-hydrolyzing ecto-enzymatic activities, including CD38 and PC-1. Possible role in the recycling of nicotinamide adenine dinucleotide metabolites. J. Immunol. 157, 1381–1388 (1996).
103. Horenstein AL et al. A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. Oncoimmunology 2, e26246 (2013).
104. Street SE et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase acts redundantly with PAP and NT5E to generate adenosine in the dorsal spinal cord. J. Neurosci. 33, 11314–11322 (2013).
105. Müller CE & Jacobson KA. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. Biochim. Biophys. Acta 1808, 1290–1308 (2011).
106. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. Cell Death Differ. 14, 1315–1323 (2007).
107. Moser GH et al. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. Am. J. Physiol. 256, C799–C806 (1989).
108. Latini S & Pedata F Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. J. Neurochem. 79, 463–484 (2001).
109. Di Virgilio F et al. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. Nat. Rev. Cancer 18, 601–618 (2018).
110. Cekic C & Linden J. Purinergic regulation of the immune system. Nat. Rev. Immunol. 16, 177–192 (2016).
111. Ohta A & Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. Nature 414, 916–920 (2001).
112. Chen Y et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. Science 314, 1792–1795 (2006).
113. Aymeric L et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. Cancer Res. 70, 855–858 (2010).
114. Lappas CM et al. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-γ production in murine CD4+ T cells. J. Immunol. 174, 1073–1080 (2005).
115. Linnemann C et al. Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. Immunology 128, e728–e737 (2009).
116. Bjørgo E & Taskén K. Novel mechanism of signaling by CD28. Immunol. Lett. 129, 1–6 (2010).

117. Zhang H et al. Adenosine acts through A2 receptors to inhibit IL-2-induced tyrosine phosphorylation of STAT5 in T lymphocytes: role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and phosphatases. J. Immunol. 173, 932–944 (2004).
118. Csóka, B et al. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. FASEB J. 22, 3491–3499 (2008).
119. Leone RD et al. Inhibition of the adenosine A2a receptor modulates expression of T cell coinhibitory receptors and improves effector function for enhanced checkpoint blockade and ACT in murine cancer models. Cancer Immunol. Immunother. 67, 1271–1284 (2018).
120. Ohta A et al. The development and immunosuppressive functions of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. Front. Immunol. 3, 190 (2012).
121. Zarek PE et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. Blood 111, 251–259 (2008).
122. Deaglio S et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J. Exp. Med. 204, 1257–1265 (2007).
123. Kinsey GR et al. Autocrine adenosine signaling promotes regulatory T cell-mediated renal protection. J. Am. Soc. Nephrol. 23, 1528–1537 (2012).
124. Minguet S et al. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-κB pathway downstream of immunoreceptors. Eur. J. Immunol. 35, 31–41 (2005).
125. Young A et al. A2AR adenosine signaling suppresses natural killer cell maturation in the tumor microenvironment. Cancer Res. 78, 1003–1016 (2018).
126. Cohen HB et al. IFN-γ prevents adenosine receptor (A2bR) upregulation to sustain the macrophage activation response. J. Immunol. 195, 3828–3837 (2015).
127. Ramanathan M et al. Differential regulation of HIF-1α isoforms in murine macrophages by TLR4 and adenosine A2A receptor agonists. J. Leukoc. Biol. 86, 681–689 (2009).
128. Csóka B et al. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. FASEB J. 26, 376–386 (2012).
129. Ferrante CJ et al. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Ralpha) signaling. Inflammation 36, 921–931 (2013).
130. Novitskiy SV et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. Blood 112, 1822–1831 (2008).

131. Pellegatti P et al. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. PLoS One 3, e2599 (2008).
132. Kroemer G et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. Annu. Rev. Immunol. 31, 51–72 (2013).
133. Ghiringhelli F et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1β– dependent adaptive immunity against tumors. Nat. Med. 15, 1170–1178 (2009).
134. Yan J et al. Control of metastases via myeloid CD39 and NK cell effector function. Cancer Immunol. Res. 8, 356–367 (2020).
135. Allard B et al. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. Curr. Opin. Pharmacol. 29, 7–16 (2016).
136. Allard B et al. The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. Immunol. Rev. 276, 121–144 (2017).
137. Vijayan D et al. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. Nat. Rev. Cancer 17, 765 (2017)
138. Ryzhov SV et al. Role of TGF-β signaling in generation of CD39+ CD73+ myeloid cells in tumors. J. Immunol. 193, 3155–3164 (2014)
139. Li J et al. CD39/CD73 upregulation on myeloidderived suppressor cells via TGF-β-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. Oncoimmunology 6, e1320011 (2017).
140. Ma X-L et al. CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110β and predicts poor prognosis. J. Hematol. Oncol. 12, 37 (2019).
141. Shi L et al. Adenosine interaction with adenosine receptor A2a promotes gastric cancer metastasis by enhancing PI3K-AKT-mTOR signaling. Mol. Biol. Cell 30, 2527–2534 (2019).
142. Mittal D et al. Adenosine 2B receptor expression on cancer cells promotes metastasis. Cancer Res. 76, 4372–4382 (2016).
143. Zhou Y et al. The adenosine A2b receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway. Oncotarget 8, 48755–48768 (2017).
144. Zhi X et al. RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells. Cancer Sci. 101, 2561–2569 (2010).
145. Ntantie E et al. An adenosine-mediated signaling pathway suppresses prenylation of the GTPase Rap1B and promotes cell scattering. Sci. Signal. 6, ra39 (2013).

146. Sadej R & Skladanowskic AC. Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. Acta Biochim. Pol. 59, 647–652 (2012).
147. Zhu J et al. CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. Mol. Cancer 16, 34 (2017)
148. Gao Z et al. CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. BMC Cancer 17, 135 (2017).
149. Turcotte M et al. CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. Cancer Res. 75, 4494–4503 (2015)
150. Yu M et al. CD73 on cancer-associated fibroblasts enhanced by the A2B-mediated feedforward circuit enforces an immune checkpoint. Nat. Commun. 11, 515 (2020).
151. Costa A et al. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. Cancer Cell 33, 463–479.e10 (2018).
152. Thompson LF et al. Crucial role for Ecto- 5′-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. J. Exp. Med. 200, 1395–1405 (2004).
153. Airas,L et al. CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells Via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. J. Immunol. 165, 5411–5417 (2000).
154. Takedachi M et al. CD73-generated adenosine restricts lymphocyte migration into draining lymph nodes. J. Immunol. 180, 6288–6296 (2008).
155. Liu Z et al. Endothelial adenosine A2a receptormediated glycolysis is essential for pathological retinal angiogenesis. Nat. Commun. 8, 584 (2017).
156. Desai A. Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin. Mol. Pharmacol. 67, 1406–1413 (2005).
157. Wang L et al. CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. The Journal of clinical investigation vol. 121,6 (2011): 2371-82.
158. Wang L et al. Ecto-5′-nucleotidase (CD73) promotes tumor angiogenesis. Clin. Exp. Metastasis 30, 671–680 (2013).
159. Allard B et al. Adenosine A2a receptor promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. Oncoimmunology 8, 1601481 (2019).
160. Hammami A et al. Targeting the adenosine pathway for cancer immunotherapy. Semin. Immunol. 42, 101304 (2019).

161. Vigano S et al. Targeting adenosine in cancer immunotherapy to enhance T-cell function. Front. Immunol. 10, 925 (2019).
162. Ohta A et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA 103, 13132–13137 (2006).
163. Sun X et al. CD39/ENTPD1 expression by CD4+ Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. Gastroenterology 139, 1030–1040 (2010).
164. Stagg J et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. Proc. Natl Acad. Sci. USA 107, 1547–1552 (2010).
165. Stagg J et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. Cancer Res. 71, 2892–2900 (2011).
166. Stagg J et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. Cancer Res. 72, 2190–2196 (2012).
167. Yegutkin GG et al. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. Eur. J. Immunol. 41, 1231–1241 (2011).
168. Jin D et al. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. Cancer Res. 70, 2245–2255 (2010).
169. Li XY et al. Targeting CD39 in cancer reveals an extracellular ATP- and inflammasome-driven tumor immunity. Cancer Discov. 9, 1754–1773 (2019).
170. Beavis PA et al. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73+ tumors. Proc. Natl Acad. Sci. USA 110, 14711–14716 (2013).
171. Mittal D et al. Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor. Cancer Res. 74, 3652–3658 (2014).
172. Zhang H et al. The role of NK cells and CD39 in the immunological control of tumor metastases. Oncoimmunology 8, e1593809 (2019).
173. Perrot I et al. Blocking antibodies targeting the CD39/CD73 immunosuppressive pathway unleash immune responses in combination cancer therapies. Cell Rep. 27, 2411–2425.e9 (2019).
174. Cekic C et al. Myeloid expression of adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. Cancer Res. 74, 7250–7259 (2014).
175. Cekic C et al. Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. J. Immunol. 188, 198–205 (2012).
176. Ryzhov S et al. Host A2B adenosine receptors promote carcinoma growth. Neoplasia 10, 987–995 (2008).

177. Ryzhov S et al. Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+ Gr1+ cells. J. Immunol. 187, 6120–6129 (2011).
178. Sorrentino C et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to A2B adenosine receptor-induced VEGF production and angiogenesis in a mouse melanoma model. Oncotarget 6, 27478–27489 (2015).
179. Iannone R et al. Blockade of A2b adenosine receptor reduces tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of melanoma. Neoplasia 15, 1400–1409 (2013).
180. Sorrentino C et al. Adenosine A2A receptor stimulation inhibits TCR-induced Notch1 activation in CD8+ T-cells. Front. Immunol. 10, (2019).
181. Mastelic-Gavillet B et al. Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8+ T cells. J. Immunother. Cancer 7, 257 (2019).
182. Romio M et al. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. Am. J. Physiol. 301, C530–C539 (2011).
183. Gourdin N et al. Autocrine adenosine regulates tumor polyfunctional CD73+ CD4+ effector T cells devoid of immune checkpoints. Cancer Res. 78, 3604–3618 (2018).
184. Ehrentraut H et al. Adora2b adenosine receptor engagement enhances regulatory T cell abundance during endotoxin-induced pulmonary inflammation. PLoS One 7, e32416 (2012).
185. Udyavar AR et al. Altered pan-Ras pathway and activating mutations in EGFR result in elevated CD73 in multiple cancers [abstract 4980]. Cancer Res. 79 (Suppl.), 4980–4980 (2019).
186. Allard D et al. Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. Immunol. Lett. 205, 31–39 (2019).
187. Morello S et al. Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. J. Transl. Med. 15, 244 (2017).
188. Balch CM et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol 2009;27:6199–206.
189. Eisenhauer EA et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer 2009;45:228–47.
190. Morello S et al. Enzyme activity of circulating CD73 in human serum. Methods Enzymol 2019;629:257–67.
191. Goueli SA, Hsiao K. Monitoring and characterizing soluble and membrane-bound ectonucleotidases CD73 and CD39. PLoS One 2019;14:e0220094.

192. Monteiro I et al. Cd73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. Oncotarget 2018;9:26659–69.
193. Reinhardt J et al. Mapk signaling and inflammation link melanoma phenotype switching to induction of CD73 during immunotherapy. Cancer Res 2017;77:4697–709.
194. Morello S et al. Enzyme activity of circulating CD73 in human serum. Methods in enzymology 2019;629:257-67.
195. Lal H et al. Serum enzymes in head and neck cancer. IV: 5-nucleotidase. J Laryngol Otol 1989;103:200–2.
196. Weide B et al. Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. Clin Cancer Res. 2016;22(22):5487-96.
197. Capone M et al. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and derived NLR could predict overall survival in patients with advanced melanoma treated with nivolumab. J Immunother Cancer. 2018;6(1):74.
198. Jiang T et al. Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. BMC cancer 2018;18(1):267.
199. Messaoudi N et al. Prognostic value of CD73 expression in resected colorectal cancer liver metastasis. Oncoimmunology 2020;9(1):1746138.
200. Wang H et al. NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. British journal of cancer 2012;106(8):1446-52
201. Young A et al. Targeting Adenosine in BRAF-Mutant Melanoma Reduces Tumor Growth and Metastasis. 2017;77(17):4684-96.
202. Monteiro I et al. CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. Oncotarget 2018;9(42):26659-69.
203. Reinhardt J et al. MAPK Signaling and Inflammation Link Melanoma Phenotype Switching to Induction of CD73 during Immunotherapy. 2017;77(17):4697-709.
204. Lal H et al. Serum enzymes in head and neck cancer. IV: 5-nucleotidase. The Journal of laryngology and otology 1989;103(2):200-2.
205. Morello S et al. Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. J Transl Med 2017;15(1):244.
206. Weide B et al. Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. Clin Cancer Res. 2016;22(22):5487-96.
207. Capone M et al. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and derived NLR could predict overall survival in patients with advanced melanoma treated with nivolumab. J Immunother Cancer. 2018;6(1):74.

208. Hodi FS et al. Genomic analyses and immunotherapy in advanced melanoma [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019; Cancer Res 2019;79(13 Suppl):Abstract nr CT037.
209. Tumeh PC et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 2014;515(7528):568-71.
210. Daud AI et al. Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. J Clin Invest. 2016;126(9):3447-52.
211. Ngiow SF et al. A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. Cancer Res. 2015;75(18):3800-11.
212. Inozume T et al. Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. J Immunother. 2010;33(9):956-64.
213. Gros A et al. PD-1 identifies the patient-specific $CD8^{+}$ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. J Clin Invest. 2014;124(5):2246-59.
214. Gros A et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. Nat Med. 2016;22(4):433-8.
215. Simon S et al. PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire. Oncoimmunology. 2015;5(1):e1104448. eCollection 2016.

Ringraziamenti

Arrivato in fondo, non posso che esprimere la mia riconoscenza a tutte le persone che, in modi diversi e personali, mi sono state vicine.

Non posso fare altro che iniziare dalla mia Tutor Universitaria, la Prof.ssa Maria Rosaria Galdiero. Grazie per la fiducia dimostratami, per la tua continua disponibilità, per non aver mai negato consigli e confronti che mi hanno aiutato nell'intraprendere le scelte più appropriate. Ringraziamenti sentiti li porto in dote al Coordinatore Prof. Francesco Beguinot, per aver creduto in me ed avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso, ed al Dott. Francescopaolo Granata, per aver saputo indicare con pazienza ed estrema disponibilità la via più corretta.

Un ringraziamento speciale va al Prof. Paolo Antonio Ascierto, Direttore del Dipartimento CORP-S di Ricerca ed Assistenziale Cute e Melanoma, Immunologia Oncologica Sperimentale e Terapie Innovative dell'Istituto Nazionale Tumori IRCCS Fondazione G. Pascale, dove ho avuto la fortuna di poter iniziare e concludere il percorso di Dottorato. Grazie per aver contribuito alla mia formazione e crescita professionale. Non scorderò facilmente gli incoraggiamenti, i consigli e al tempo stesso gli apprezzamenti per quanto realizzato.

Chiaramente, mi preme ringraziare tutti i colleghi di Laboratorio e di Reparto, perché il risultato ottenuto dal singolo, è sempre frutto del lavoro di squadra. Ragion per cui, ho immenso piacere di condividere con tutti voi gli onori del risultato e, ancor di più, voglio ringraziarvi per aver contribuito a vario titolo al raggiungimento di questo obiettivo.

In ultimo, ma di certo non per importanza, ringrazio la mia famiglia allargata, che amo chiamare la mia tribù. Pur se ormai da anni fuori dal nido, il mio primo pensiero va ai miei genitori e ai miei fratelli, grazie per quell'aiuto tacito o esplicito che è venuto dal vostro cuore. Menzione speciale va alla mia nuova famiglia, si, proprio a voi mie piccole "Moon and Stars". Carla, Greta e Clara, avete riempito la mia vita e avete saputo trasmettermi la vostra energia per portare a compimento questa esperienza. Grazie, Grazie, Grazie!