

SVILUPPO VACCINI IDIOTIPICI PER STUDI DI FASE I-II DI IMMUNOTERAPIA “SUBSET SPECIFICA” PER PAZIENTI CON DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI A CELLULE B

Riccardo Dolcetti

Dipartimento di Oncologia Medica, Centro di Riferimento Oncologico, Aviano

Base di partenza e razionale

I linfomi non-Hodgkin (*Non-Hodgkin Lymphoma*, NHL) costituiscono un gruppo eterogeneo di tumori, la cui incidenza è aumentata nelle ultime decadi, rimanendo una significativa frazione di casi incurabile. Le forme a basso grado di malignità mostrano frequentemente recidive alla chemioterapia e una prognosi infausta. Queste evidenze, insieme alla tossicità dei trattamenti standard, stimolano lo sviluppo di nuove terapie per un miglior controllo di tali neoplasie.

Vaccini che abbiano come bersaglio l'idiotipo (Id) di linfomi/leucemie a cellule B rappresentano un approccio immunoterapeutico promettente che potrebbe consentire un miglior controllo clinico di tali neoplasie e con minore tossicità rispetto alle terapie convenzionali. Questa strategia è basata sull'osservazione che le immunoglobuline (Ig) clonotipiche espresse da linfociti B neoplastici presentano determinanti unici che possono fungere da antigeni tumore-specifici. In modelli murini, i vaccini idiotipici si sono dimostrati in grado di indurre risposte immuni protettive, mentre studi clinici condotti su pazienti con linfoma hanno dimostrato che vaccini idiotipici ricombinanti o cellule dendritiche pulsate con Id paziente-specifici possono indurre risposte citotossiche tumore-specifiche clinicamente significative, con tossicità contenuta. Tuttavia, il largo impiego di tali vaccinazioni è ostacolato dal fatto che i vaccini devono essere prodotti singolarmente e in maniera individualizzata per ciascun paziente, con una notevole complessità di produzione e costi difficilmente sostenibili. La caratterizzazione molecolare di vari istotipi di neoplasie linfoidi ha recentemente fornito evidenze che suggeriscono come tali limitazioni possano essere superate. Infatti, è stato dimostrato che vari istotipi di neoplasie a cellule B possono utilizzare gli stessi segmenti genici Ig, suggerendo che la condivisione di Id simili tra neoplasie di diversi pazienti sia più frequente di quanto ritenuto in passato. In particolare, circa il 20-25% delle leucemie linfatiche croniche (CLL) esprimono, sulla superficie cellulare della loro componente neoplastica, combinazioni “stereotipate” di IgH/IgL con sequenze omologhe anche a livello delle regioni ipervariabili (HCDR3) delle IgH. Studi precedenti del DI proponente hanno dimostrato che la proteina VK3-20, frequentemente espressa in B-NHL HCV-associati, è immunogenica in sistemi *ex vivo* ed è in grado di indurre risposte citotossiche specifiche nei riguardi di proteine VK correlate e utilizzate anche da altre forme di linfoma/leucemia a cellule B. Ciò fornisce un solido razionale per lo sviluppo di vaccini ricombinanti che utilizzino Id condivisi da differenti neoplasie a cellule B.

Oltre all'attivazione di uno studio di fase I-II basato sull'utilizzo della proteina VK3-20 quale vaccino per il trattamento di linfomi esprimenti catene leggere molecolarmente correlate, il progetto consentirà di identificare e caratterizzare dal punto di vista immunologico altre Ig idiotipiche condivise da sottogruppi di neoplasie linfoidi, particolarmente le forme indotte e/o sostenute da una stimolazione antigenica cronica. Ciò consentirà di definire lo spettro di neoplasie linfoidi per le quali disegnare e attivare strategie di immunoterapia “cross-reattiva”.

Il progetto prevede inoltre la definizione dell'entità delle risposte T memoria specifiche in donatori e pazienti con linfoma e l'identificazione/validazione degli epitopi CTL presentati dai più comuni alleli HLA di classe I, finalizzati allo sviluppo di saggi per un preciso monitoraggio delle risposte immuni epitopo-specifiche. Il potenziale terapeutico di tali vaccini e del trasferimento adottivo di CTL specifici verranno definiti in modelli animali. Gli approcci diagnostici e terapeutici innovativi derivanti dal trasferimento in campo clinico dei risultati ottenuti saranno rilevanti anche per quanto riguarda disordini linfoproliferativi monoclonali pre-linfomatosi (crioglobulinemia mista di tipo II). Infatti, la possibile applicazione di schemi di vaccinazione preventiva con Ig idiotipiche ricombinanti "subset-specifiche" potrebbe rivelarsi di notevole importanza al fine di impedire o ritardare l'evoluzione di tali forme verso il linfoma maligno conclamato.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi primari del progetto sono:

- attivazione di uno studio di fase I-II basato sull'utilizzo della proteina idiotipica VK3-20 quale vaccino per il trattamento di linfomi a basso grado di malignità esprimenti catene leggere molecolarmente correlate;
- sviluppo di nuovi vaccini idiotipici ricombinanti da applicarsi in schemi di immunoterapia "subset-specifica" per disordini linfoproliferativi.

Obiettivi secondari del progetto sono:

- identificazione di sottogruppi di neoplasie linfoidi caratterizzati dall'espressione di Ig clonotipiche ad elevata omologia di sequenza;
- definizione delle proprietà immunogeniche di Ig clonotipiche "subset-specifiche" sia *in vitro* che in modelli animali finalizzata allo sviluppo di vaccini terapeutici e preventivi;
- sviluppo di nuovi modelli preclinici atti alla valutazione della crescita *in vivo* di neoplasie linfoidi B mediante l'ingegnerizzazione di linee neoplastiche con proteine fluorescenti e monitoraggio mediante *optical imaging*;
- sviluppo di saggi per il monitoraggio di risposte immuni Id-specifiche in pazienti affetti da linfomi/leucemie di interesse, con particolare riferimento ai pazienti arruolati nello studio clinico;
- definizione del ruolo adiuvante di nuovi approcci con siRNA in grado di inibire hTERT allo scopo di potenziare l'attività apoptotica e incrementare l'effetto della immunoterapia;
- produzione GMP (*Good Manufacturing Practice*) di Ig clonotipiche ricombinanti e disegno di ulteriori studi clinici di fase I-II basati sull'utilizzo di tali proteine per scopi vaccinali;
- definizione della capacità di Ig clonotipiche ricombinanti di indurre risposte immuni specifiche *ex vivo* in pazienti con infezione da HCV;
- produzione di anticorpi monoclonali rivolti contro epitopi condivisi delle Ig clonotipiche "subset-specifiche" di possibile utilizzo in diagnostica e terapia;
- definizione delle modalità di elisione cellulare indotte dagli effettori immuni Id-specifici nei confronti di cellule di linfoma/leucemia;
- sviluppo di un sistema di valutazione morfo-fenotipico in cellule dendritiche per il monitoraggio dell'attivazione dell'immunità specifica acquisita;
- sviluppo di un gene-chip atto alla definizione della tipologia della risposta immunitaria indotta dal vaccino da applicarsi in campo clinico per valutarne il possibile valore predittivo della risposta clinica.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Sviluppo di vaccini idiotipici per studi di fase I-II di immunoterapia "subset-specifica" per pazienti con disordini linfoproliferativi a cellule B

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
CRO (Riccardo Dolcetti)	UO1 (CRO: Riccardo Dolcetti)	CRO	Riccardo Dolcetti
		CRO	Valli De Re
		CRO	Valter Gattei
		CRO	Roberta Maestro
		CRO	Umberto Tirelli
		CRO	Vincenzo Canzonieri
		CRO	Diego Serraino
		INT	Andrea Anichini
		ISS	Maria Ferrantini
	UO2 (IOV: Antonio Rosato)	IOV	Antonio Rosato
		IOV	Stefano Indraccolo
		IOV	Anita De Rossi
	UO3 (Pascale: Franco M. Buonaguro)	Pascale	Franco M. Buonaguro
		Pascale	Giuseppe Castello
		Pascale	Francesco Izzo
		Pascale	Gerardo Botti
		Pascale	Maurizio Montella
		NIH	Francesco M. Marincola
	Ospedale Cotugno, Napoli	Oreste Perrella	

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il presente progetto si prefigge quale obiettivo primario l'attivazione di uno studio di fase I/II basato sull'utilizzo della proteina idiotipica VK3-20 quale vaccino per il trattamento di linfomi a basso grado di malignità esprimenti catene leggere molecolarmente correlate. Nei primi 24 mesi, grazie all'attività integrata delle varie UO afferenti sono state ottenute evidenze pre-cliniche rilevanti a supporto dell'applicazione in campo clinico di tale approccio vaccinale. In particolare:

- L'immunogenicità *ex vivo* di VK3-20 e VK3-15 è stata confermata in un'ampia serie di donatori. È stato possibile ottenere sia cellule T CD4⁺ che CD8⁺ in grado di riconoscere e lisare specificamente le cellule bersaglio, un aspetto di notevole rilevanza applicativa.
- Una proteina VK3-20 prototipica induce risposte T cellulari cross-reattive rispetto a VK3-20 derivate da altri linfomi e anche nei confronti della proteina correlata VK3-15.
- CTL VK3-20-specifici uccidono in modo antigene-specifico e HLA-A*02-ristretto linee di linfoma sia VK3-20+ (DG75) che VK3-15+ (LCL SH9) indicando che tali proteine sono naturalmente processate in cellule linfoidi e in grado di produrre epitopi immunogenici "cross-reattivi".

- La proteina VK3-20 contiene almeno 25 epitopi in grado di legare i più comuni alleli HLA di Classe I. Sono stati validati 11 epitopi HLA-A*0201 ed è stato dimostrato che tali peptidi sono in grado di indurre CTL specifici *ex vivo* da donatori capaci di lisare anche linee di linfoma sia VK3-20+ che VK3-15+.
- Gli epitopi HLA-A*0201 di VK3-20 sono in gran parte condivisi con proteine VK/VJ espresse da numerose neoplasie linfoidi. CTL specifici per due di questi epitopi “nativi” di VK3-20 sono in grado di riconoscere e uccidere in modo specifico e HLA-ristretto bersagli autologhi caricati con versioni “cross-reattive” degli stessi peptidi, ma appartenenti a proteine idiotipiche non correlate. Ciò suggerisce come VK3-20 contenga versioni “naturalmente eteroclitiche” di diversi epitopi condivisi con altre proteine VK/VJ ampiamente espresse in diverse neoplasie linfoidi.
- Pazienti con linfoma HCV+ mostrano risposte T CD8+ specifiche per epitopi di VK3-20 in numero maggiore rispetto a donatori sani in saggi ELISPOT.
- Sono stati costruiti idonei vettori per l’espressione di VK3-20 e VK3-15 che sono stati trasferiti al Partner Industriale esterno che ha sviluppato un nuovo processo di produzione e purificazione “clinical-grade”.
- È stata valutata l’immunogenicità della proteina VK3-20 in topi BALB/c. I risultati dimostrano che tutti i topi immunizzati hanno sviluppato una risposta umorale con buoni titoli anticorpali. Inoltre, i sieri sono risultati in grado di riconoscere la proteina in immunoblotting, confermando l’immunogenicità per la branca umorale della la proteina VK3-20 ricombinante prototipo. Sono stati caratterizzati 2 anticorpi monoclonali specifici per VK3-20 e/o VK3-15.
- Sono stati ottimizzati i modelli animali basati sulla crescita *in vivo* delle linee DG-75 e SH9 impiantate s.c. in topi SCID. Al fine di poter monitorare la crescita e la diffusione tumorale, le cellule DG-75 sono state ingegnerizzate per esprimere EGFP o luciferasi. La down-regulation delle molecole MHC di classe I e II riscontrata nelle cellule DG-75 e SH9 in seguito all’inoculo *in vivo* è stata superata ingegnerizzando le cellule DG-75 con un plasmide esprimente HLA-A*0201. Tali cellule mantengono l’espressione di classe I e II a seguito del recupero dopo il trasferimento *in vivo*. I saggi (Winn Assay) eseguiti *in vivo* in topi SCID hanno confermato che le cellule tumorali mescolate a CTL VK3-20-specifici non sono in grado di produrre crescita neoplastica, a differenza di cellule DG-75 da sole.
- Nel modello Hu-PBL-SCID è stata dimostrata la capacità della vaccinazione con IFN-DC pulsate con VK3-20 di indurre una buona risposta di tipo cellulare sia per i CD8+ che per i CD4+, soprattutto a seguito dell’immunizzazione con VK3-20-KLH, che si è rivelato l’immunogeno più potente.
- È stata dimostrata la capacità del peptide VK3-20 di indurre l’attivazione delle cellule del sistema innato (monociti, mDC e pDC), sia in soggetti di controllo che HCV+, momento propedeutico essenziale per l’induzione a valle del sistema immunitario adattativo specifico.

Il progetto prevede inoltre l’identificazione di sottogruppi di neoplasie linfoidi caratterizzate dall’espressione di Id ad elevata omologia di sequenza, finalizzata allo sviluppo di vaccini “subset-specifici”. La caratterizzazione delle sequenze dei geni IgVH e IgVL inserite nel database dedicato supporta il ruolo di proteine idiotipiche VKIII quali bersagli immunologici di rilevanza terapeutica per diversi disordini linfoproliferativi quali: crioglobulinemia e NHL HCV+, NHL associati ad autoimmunità, NHL della zona marginale non associati ad HCV.

L’analisi di una casistica di leucemie linfatiche croniche (CLL) comprendente più di 1500 casi ha mostrato come il gene IGV1-69 sia il più frequentemente utilizzato suggerendo come tale proteina idiotipica sia di potenziale rilevanza immunoterapeutica in quanto utilizzabile per

scopi vaccinali in un numero relativamente ampio di pazienti. Gli esperimenti finora eseguiti hanno dimostrato che anche IGV1-69 è in grado di indurre CTL specifici *ex vivo* da donatori sani. Sono stati inoltre identificati preliminarmente 21 putativi epitopi CTL di IGV1-69 e sono in corso esperimenti tesi ad effettuarne la validazione. È stata disegnata una sequenza “consensus” di IGV1-69 sulla base delle variazioni interpaziente e tenendo conto degli epitopi CTL identificati. Tale sequenza non comprende il CDR3 che mostra maggiore variabilità. Sono stati costruiti vettori per l’espressione della consensus di IGV1-69 in associazione o meno al CDR3 derivato da un NHL HCV+, che sono stati trasferiti al Partner Industriale esterno per produzione e purificazione delle proteine ricombinanti.

Il database disponibile ha inoltre consentito l’individuazione di nuovi marcatori prognostici per le CLL, ad esempio immunofenotipici (es. CD49d), citogenetici (es. coinvolgenti il gene p53), ecc. Sono stati inoltre affrontati i seguenti argomenti: i) caratterizzazione molecolare del sottogruppo di CLL a cattiva prognosi caratterizzato dall’espressione del gene IGHV3-21; ii) identificazione dell’impatto prognostico e caratterizzazione molecolare del sottogruppo esprimente il gene IGHV3-23; nell’ambito di tale progetto, è stato definito come il profilo genico globale delle CLL IGHV3-23 sia legato alla modulazione dell’espressione di specifici miR; la messa a punto di “miR profile” rappresenterà un obiettivo futuro per questa progettualità; iii) caratterizzazione dei profili di espressione genica associati a resistenza delle cellule di CLL ad attivatori non genotossici di p53 (es. Nutlin-3).

Al fine di valutare se l’inibizione di hTERT è in grado di sensibilizzare cellule di linfoma all’effetto litico di effettori immuni specifici per antigeni idiotipici, sono stati sviluppati e validati siRNA costituiti da oligonucleotidi anti-hTERT e vettori retrovirali esprimenti short hairpin contro hTERT mRNA.

Nell’ambito di questo progetto è stato pubblicato l’opuscolo per i pazienti “Crioglobulinemia mista”, a cura del GISC (Gruppo Italiano per lo Studio delle Crioglobulinemie)

Pubblicazioni conseguite nell’ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo secondo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Benedetti D, Bomben R, Dal-Bo M, Marconi D, Zucchetto A, Degan M, Forconi F, Del-Poeta G, Gaidano G, Gattei V. Are surrogates of IGHV gene mutational status useful in B-cell chronic lymphocytic leukemia? The example of Septin-10. *Leukemia* 2008;22(1):224-6.
2. Bobisse S, Tisato V, Rondina MB, Merlo A, Amendola M, Naldini L, Willemsen RA, Debets R, Zanovello P, Rosato A. Reprogramming T lymphocytes for melanoma adoptive immunotherapy by T-cell receptor gene transfer with lentiviral vectors. *Cancer Res* 2009;69(24):9385-94.
3. Boffetta P, Dolcetti R. Infectious etiopathogenesis of extranodal lymphomas. In: Cavalli F, Stein H, Zucca E (Ed.). *Extranodal lymphomas*. London, New York: Informa Healthcare; 2008. p. 24-33.
4. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Benedetti D, Marconi D, Zucchetto A, Forconi F, Maffei R, Ghia EM, Laurenti L, Bulian P, Del Principe MI, Palermo G, Thorselius M, Degan M, Campanini R, Guarini A, Del PG, Rosenquist R, Efremov DG, Marasca R, Foa R, Gaidano G, Gattei V. Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood* 2007;109(7):2989-98.
5. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Francesco Forconi F, Maffei R, Laurenti L, Rossi D, Del Principe MI, Zucchetto A, Bretoni F, Rossi FM, Bulian P, Cattarossi I, Ilariucci F, Sozzi E, Spina V, Zucca E, Degan M, Lauria F, Del Poeta G, Efremov DG, Marasca R, Gaidano G, Gattei V.

- Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicenter study. *Br J Haematol* 2009;144(4):492-506.
6. Bulian P, Gaidano G, Del PG, Gattei V. CD49d expression in chronic lymphocytic leukemia: a prognostic parameter and a therapeutic target. *Future Oncol* 2008;4(3):355-8.
 7. Caggiari L, Cannizzaro R, De Zorzi M, Canzonieri V, Da Ponte A, De Re V. A new HLA-A*680106 allele identified in individuals with celiac disease from the Friuli area of northeast Italy. *Tissue Antigens* 2008;72(5):491-2.
 8. Caggiari L, De Zorzi M, Ahlenstiel G, Rehmann B, De Re V. Identification of new MHC-A, -B, -C alleles in Pan troglodytes. *Tissue Antigens* 2008;72(1):79-83.
 9. Caggiari L, Rehmann B, Folgori A, De Re V. Identification of four novel MHC-C alleles in chimpanzees. *Tissue Antigens* 2007;70(1):78-9.
 10. Dal Bo M, Bretoni F, Forconi F, Zucchetto A, Bomben R, Marasca R, Deraglio S, Laurenti L, Efremov DG, Gaidano G, Del PG, & Gattei V. Intrinsic and extrinsic factors influencing the clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia: prognostic markers with pathogenetic relevance. *J Transl Med* 2009;7:76.
 11. De Re V, Caggiari L, De Vita S, Mazzaro C, Lenzi M, Galli M, Monti G, Ferri C, Zignego AL, Gabrielli A, Sansonno D, Dammacco F, Libra M, Sacchi N, Talamini R, Spina M, Cannizzaro R, Guidoboni M, Dolcetti R. Genetic insights into the disease mechanisms of type II mixed cryoglobulinemia induced by hepatitis C virus. *Digest Liver Dis* 2007;39 Suppl 1:S65-S71.
 12. De Re V, Caggiari L, Dolcetti R, De Zorzi M, Simula MP, Toffoli G (GICAT). Immunogenetica delle linfoproliferazioni HCV-associate: il ruolo dell'HLA di classe II. In: *Tumori ed infezione da HIV. Tumori non-diagnostici per AIDS*. (Sezione Tumori della popolazione generale indotti da agenti infettivi). (GICAT Monografia 12). Milano: BIOMEDIA Editore; 2007.
 13. De Re V, Caggiari L, Simula MP, De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R. B-cell lymphomas associated with HCV infection. *Gastroenterology* 2007;132(3):1205-7.
 14. De Re V, Caggiari L, Simula M.P, De Vita S, Mazzaro C, Lenzi M, Massimo GM, Monti G, Ferri C, Zignego AL, Gabrielli A, Sansonno D, Dammacco F, Libra M, Sacchi N, Talamini R, Spina M, Tirelli U, Cannizzaro R, Dolcetti R. Role of the HLA class II: HCV-related disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1107:308-18.
 15. De Re V, Caggiari L, Simula MP, De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R. B-cell lymphomas associated with HCV infection. *Gastroenterology* 2007;132(3):1205-7.
 16. De Re V, De Vita S, Sansonno D, Toffoli G. Mixed cryoglobulinemia syndrome as an additional autoimmune disorder associated with risk for lymphoma development. *Blood* 2008;15;111(12):5760.
 17. De Re V, Sansonno D, De Paoli P, Geremia S, Gatti P, Caggiari L, Simula MP, Toffoli G. Recent patents relating to HCV molecules like putative targets for therapeutic intervention. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2007;1(3):186-94.
 18. De Re V, Simula MP, Caggiari L, Orzes N, Spina M, Da Ponte A, De Appollonia L, Dolcetti R., Canzonieri V, Cannizzaro R. Proteins specifically hyperexpressed in a coeliac disease patient with aberrant T cells. *Clin Exp Immunol* 2007;148(3):402-9.
 19. De Re V, Simula MP, Cannizzaro R, Sansonno D, Canzonieri V, Gloghini A, Carbone A, Colombatti A, Marin MD, De Zorzi M, Toffoli G. HCV Inhibits antigen processing and presentation and induces oxidative stress response in gastric mucosa. *Proteomics clinical application* 2008;2:1290-9.
 20. De Re V, Simula MP, Pavan A, Garziera M, Marin D, Dolcetti R, de Vita S, Sansonno D, Geremia S, Toffoli G. Characterization of antibodies directed against the immunoglobulin light kappa chain variable chain region (VK) of hepatitis C virus-related type-II mixed cryoglobulinemia and B-cell proliferations. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:152-60.

21. De Zorzi M, Caggiari L, Ahlenstiel G, Rehermann B., De Re V. Description of two new MHC class II DRB1 [Pan troglodytes (Patr)-DRB1] alleles. *Tissue Antigens* 2008;71(5):490-2.
22. Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, Sozzi E, Raspadori D, Rancoita PM, Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, Capello D, Zucca E, Marconi D, Bomben R, Gattei V, Lauria F, Gaidano G, Bertoni F. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br J Haematol* 2008;143(4):532-6.
23. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S, Del PG. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;111(2):865-73.
24. Libra M, Gloghini A, Malaponte G, Gangemi P, De Re V, Zignego AL, Spandidos DA, Nicoletti F, Stivala F, Carbone A. Prevalence of t(14;18) IGH-BCL2 translocation in mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *J Hepatol* 2008;49(2):170-4.
25. Libra M, Navolanic PM, Nicoletti F, De Re V, Mazzarino MC. Rituximab for treatment of lymphoproliferative disorders associated with hepatitis C virus (HCV) infection. In: Bonavida B (Ed.). *Rituximab-mediated molecular signaling and interaction with chemotherapeutic drugs*. Trivandrum (India): Research Signpost; 2007. p. 19-32.
26. Martorelli D, Houali K, Caggiari L, Vaccher E, Barman L, Franchin G, Gloghini A, Pavan A, Da Ponte A, Tedeschi RM, De Re V, Carbone A, Ooka T, De Paoli P, Dolcetti R. Spontaneous T cell responses to Epstein-Barr Virus-encoded BART1 protein and derived peptides in patients with nasopharyngeal carcinoma: bases for improved immunotherapy. *Int J Cancer* 2008;123(5):1100-7.
27. Merlo A, Turrini R, Bobisse S, Zamarchi R, Alaggio R, Dolcetti R, Zanovello P, Amadori A, Rosato A. EBV-specific cytotoxic CD4+ T cells: a potential new tool to improve the treatment of EBV-related tumors. (inviato per la pubblicazione).
28. Merlo A, Turrini R, Dolcetti R., Zanovello P, Amadori A, Rosato A. Adoptive cell therapy against EBV-related malignancies: a survey of clinical results. *Expert Opin Biol Th* 2008;8(9):1265-94.
29. Montrone M, Martorelli D, Rosato A, Dolcetti R. Retinoids as critical modulators of immune functions: new therapeutic perspectives for old compounds. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009;9(2):113-31.
30. Pasini E, Caggiari L, Dal Maso L, Martorelli D, Guidoboni M, Vaccher E, Barzan L, Franchin G, Gloghini A, De Re V, Sacchi N, Serraino D, Carbone A, Rosato A, Dolcetti R. Undifferentiated nasopharyngeal carcinoma from a nonendemic area: protective role of HLA allele products presenting conserved EBV epitopes. *Int J Cancer* 2009;125(6):1358-64.
31. Pavan A, Spina M, Canzonieri V, Sansonno S, Toffoli G, De Re V. Recent prognostic factors in Diffuse Large B-Cell lymphoma indicate NF-kB pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leukemia and Lymphoma* 2008;49(11):2048-58.
32. Quartuccio L, Fabris M, Salvin S, Isola M, Soldano F, Falletti E, Beltrami CA, De Re V, De Vita S. Bone marrow B-cell clonal expansion in type II mixed cryoglobulinaemia: association with nephritis. *Rheumatology* 2007;46(11):1657-61.
33. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, De PL, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A, Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, Gaidano G. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008;142(2):202-15.
34. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009;15(3):995-1004.

35. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, Laurenti L, Maffei R, Forconi F, Bretoni F, Zucca E, Agostinelli C, Cabras A, Ludioni M, Martini M, Magni M, Deraglio S, Ladetto M, Nomdedeu JF, Besson C, Ramponi A, Canzonieri V, Paulli M, Marasca R, Larocca LM, Carbone A, Pileri SA, Gattei V, Gaidano G. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res* 2009;15(13):4415-22.
36. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, Cresta S, Rasi S, De PL, Lobetti BC, Bulian P, Del PG, Ladetto M, Gattei V, Gaidano G. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008;93(10):1575-9.
37. Sansonno D, Carbone A, De Re V, Dammacco F. Hepatitis C virus infection, cryoglobulinaemia, and beyond. *Rheumatology* 2007;46(4):572-8.
38. Sansonno D, Tucci FA, Lauletta G, De Re V, Montrone M, Troiani L, Sansonno L, Dammacco F. Hepatitis C virus productive infection in mononuclear cells from patients with cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 2007;147(2):241-8.
39. Sansonno D, Tucci FA, Lauletta G, Troiani L, Gatti P, De Re V, Conteduca V, Chironna M, Sansonno S, Dammacco F. Combined interferon-ribavirin, and rituximab management of hepatitis c virus-related mixed cryoglobulinemia. A long-term study. (inviato per la pubblicazione).
40. Secchiero P, Melloni E, di Iasio MG, Tiribelli M, Rimondi E, Corallini F, Gattei V, Zauli G. Nutlin-3 up-regulates the expression of Notch1 in both myeloid and lymphoid leukemic cells, as part of a negative feedback antiapoptotic mechanism. *Blood* 2009;113(18):4300-8.
41. Simula MP, Caggiari L, Gloghini A, De Re V. HCV-related immunocytoma and type II mixed cryoglobulinemia-associated autoantigens. *Ann Ny Acad Sci* 2007;1110:121-30.
42. Spessotto P, Zucchetto A, Degan M, Wasserman B, Danussi C, Bomben R, Perris R, Canzonieri V, Radillo O, Colombatti A, Gattei V. Laminin-332 (Laminin-5) is the major motility ligand for B cell chronic lymphocytic leukemia. *Matrix Biol* 2007;26(6):473-84.
43. Terrin L, Trentin L, Degan M, Corradini I, Bertorelle R, Carli P, Maschio N, Bo MD, Noventa F, Gattei V, Semenzato G, De RA. Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same igVH mutation status and different outcome. *Leukemia* 2007;21(5):965-72.
44. Zauli G, di Iasio MG, Secchiero P, Dal Bo M, Marconi D, Bomben R, Del PG, Gattei V. Exposure of B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells to nutlin-3 induces a characteristic gene expression profile, which correlates with nutlin-3-mediated cytotoxicity. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9(4):510-8.
45. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, Bossi F, Lorenzon D, Degan M, Rossi FM, Rossi D, Bulian P, Franco V, Del PG, Deaglio S, Gaidano G, Tedesco F, Malavasi F, Gattei V. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 2009;69(9):4001-9.