**Stimolazione in modelli preclinici dell’immunità adattativa mediante tf come trattamento di neoplasie IDH1 mutate**

*Tutor: Prof. Giovanni Brandi*

**Background**

Le immunoterapie contro il cancro hanno rivoluzionato il panorama terapeutico oncologico. Attualmente sta aumentando l’interesse per l'identificazione di molecole naturali o sintetiche in grado di agire da coadiuvanti sia nelle strategie immunoterapiche che vaccinali. Il fattore di trasferimento (TF) si riferisce ad un gruppo di composti di meno di 6000 kDa costituiti da piccoli peptidi coniugati con oligoribonucleotidi (1). Queste molecole possono essere estratte da un donatore o da colture di leucociti e replicate nella linea linfoblastoid LDV/7 (2). Studi precedenti hanno dimostrato che il TF è in grado di trasferire passivamente l'immunità cellulo-mediata da donatore immune a ricevente non immune. Nei pazienti oncologici, l’inoculo di TF è in grado di elicitare una risposta antitumorale; tale effetto si basa sulla capacità nota del TF di aumentare la risposta dei linfociti Th1 (3). L'isocitrato deidrogenasi (IDH1 e IDH2) è un enzima metabolico che converte l’isocitrato ad alfa-chetoglutarato. Mutazioni di IDH1 e 2 portano alla produzione di D-2 idrossiglutarato, un oncometabolita che induce modificazioni epigenetiche legate alla carcinogenesi. Tali mutazioni sono frequenti nel glioblastoma, nel colangiocarcinoma intraepatico (iCCA) e nella leucemia mieloide acuta (4). Studi recenti hanno dimostrato che la proteina IDH1 mutata sia altamente immunogenica.

Su queste basi, l'obiettivo del presente progetto di ricerca sarà quello di valutare l’efficacia della somministrazione del TF nel trattamento e nella prevenzione del cancro in modelli preclinici di iCCA con IDH1 mutato.

**Piano di attività**

1) Valutazione mediante analisi di immunoistochimica dell’ espressione di IDH1 nel tessuto tumorale di pazienti con iCCA esprimenti IDH1 wild-type o mutato (R132C). Questa parte dello studio avrà lo scopo di valutare se esiste una diversa localizzazione tra la proteina IDH1 WT e mutata nelle cellule tumorali. Al fine di valutare se la mutazione di IDH1 R132C possa suscitare una risposta immunogenica dei linfociti T CD4+, i livelli di anticorpi contro la mutazione di IDH1 R132C saranno misurati nel siero di pazienti con iCCA aventi IDH1 WT o mutato.

2) Produzione del TF contro la mutazione IDH1 R132C. A tal fine 10 ratti per gruppo verranno iniettati con cellule di iCCA SNU-1079 contenenti la mutazione IDH1-R132C e silenziate per IDH1 (controllo negativo). Le cellule SNU-1079 verranno fissate in formalina e iniettate insieme all'adiuvante (Freund) per stimolare la risposta immunitaria. I ratti verranno incubati per 7-21 giorni (il periodo di incubazione dipende dal ceppo di ratto utilizzato) per stimolare la risposta immunitaria e sacrificati. Verranno recuperati la milza, il timo e i linfonodi; tali tessuti saranno omogenati e centrifugati. Dopo la centrifugazione, il supernatante verrà isolato e analizzato per la presenza del fattore di trasferimento mediante spettrometria di massa e risonanza magnetica nucleare (NMR). Parallelamente a questi esperimenti, ai ratti verranno iniettate cellule SNU-1079 (contenenti la mutazione IDH1-R132C e silenziate per IDH1) non fissate in formalina al fine di valutare la tumorigenicità di queste linee cellulari nei ratti.

3) Valutazione del potenziale ruolo immunogenico del TF in termini di trattamento dei tumori con IDH1 mutato. l ratti verranno inoculati con cellule SNU-1079 contenenti la mutazione IDH1-R132C e incubati per un certo periodo di tempo affinché il tumore si sviluppi. Una volta sviluppato il tumore, i ratti verranno classificati in due diversi gruppi. I ratti del gruppo 1 verranno trattati con TF anti IDH1 R132C e i ratti del gruppo 2 verranno trattati con Placebo. Dopo il periodo di incubazione, i ratti di entrambi i gruppi verranno sacrificati e il tumore asportato sarà analizzato in termini di dimensioni, indice di proliferazione e presenza di infiltrato linfocitario.

**Bibliografia**

1. Marimuthu Krishnaveni, A review on transfer factor an immune modulator, Drug Invention Today, Volume 5, Issue 2, 2013, Pages 153-156, ISSN 0975-7619, <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.04.002.3>.
2. Viza D, Boucheix C, Cesarini JP, et al. Characterization of a human lymphoblastoid cell line, LDV/7 used to replicate transfer factor and immune RNA. Bio Cell. 1982;46:1e10.
3. Vetto RM, Burger DR, Nolte JE, Vandenbark AA, Baker HW. Transfer factor therapy in patients with cancer. Cancer. 1976 Jan;37(1):90-7.
4. Mondesir J, Willekens C, Touat M, de Botton S. IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. J Blood Med. 2016 Sep 2; 7:171-80.