

Al mio papà

Indice

Indice	2
1. IMMUNOTERAPIA	3
1.1 Generalità	3
1.2 Attuali strategie immunoterapiche e campi di applicazione.....	4
1.3 I checkpoint immunitari e il meccanismo di azione degli ICIs.....	6
1.4 Classificazione degli ICIs e attuali approvazioni.....	8
1.5 Eventi avversi Immuno-relati (irAEs).....	11
2. FATTORI PREDITTIVI DI RISPOSTA E DI TOSSICITÀ.....	16
2.1 Fattori predittivi di risposta	17
2.2 Fattori predittivi di risposta plasmatici.....	19
2.3 Biomarcatori predittivi di tossicità associati all'uso degli ICIs.....	21
3. PROGETTO DI DOTTORATO	25
3.4 Raccolta e registrazione dati	27
3.5 Analisi statistica	29
4. RISULTATI	32
4.1 Analisi retrospettiva.....	32
4.2 Coorte retrospettivo-prospettica NSCLC	53
5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	59
6. BIBLIOGRAFIA	65
7. GLOSSARIO	76
8. APPENDICE.....	77
8.1 ECOG PS	77

1.IMMUNOTERAPIA

1.1 Generalità

L'immunoterapia rappresenta una nuova strategia terapeutica applicata all'oncologia, che si affianca alle terapie tradizionali antitumorali. Essa ha rappresentato una vera rivoluzione nel trattamento di diverse forme tumorali, apportando vantaggi significativi rispetto alle terapie convenzionali in termini di risposte obiettive (*objective responses rate*, ORR), di durata della risposta, di sopravvivenza libera da progressione (*progression-free survival*, PFS) e di sopravvivenza globale (*overall survival*, OS) in alcuni sottogruppi di pazienti¹. L'innovazione e il successo dell'immunoterapia consistono nel suo meccanismo di azione mirato alla stimolazione del sistema immunitario dell'ospite contro il tumore, che risulta totalmente differente dai tradizionali trattamenti chemioterapici, che esercitano invece un effetto citotossico diretto sulle cellule tumorali. L'immunoterapia agisce stimolando il sistema immunitario mediante la regolazione del microambiente immunitario, portando ad una attivazione di cellule effettrici contro le cellule tumorali mediante il riconoscimento di bersagli specifici.

Esistono varie strategie immunoterapiche: la terapia con citochine, i vaccini tumorali, la terapia basata sul *chimeric antigen receptor* (CAR) T-cell (adottiva cellulare) e la terapia con gli inibitori dei checkpoint immunitari (*immune checkpoint inhibitors*, ICIs).

Parallelamente all'aumento di indicazioni terapeutiche per l'immunoterapia, è sempre più emergente la necessità di gestire meglio quelli che sono gli eventi avversi definiti irAEs (*immune-related adverse events*), e sempre più crescente in pratica clinica il bisogno di standardizzare i metodi di diagnosi, cura e prevenzione di tali tossicità. Nella maggior parte dei casi, gli effetti indesiderati sono di entità lieve o moderata, e questi trattamenti sono generalmente meglio tollerati rispetto a chemioterapia e terapie *target*. Talvolta, però, possono verificarsi reazioni life-threatening o che possono portare ad una interruzione del trattamento con pesanti ricadute sugli outcomes di efficacia e di sopravvivenza, in particolare nei casi in cui gli AEs non vengano riconosciuti e trattati adeguatamente in fase iniziale. Nel contesto dell'immunoterapia è opportuno bilanciare il beneficio potenziale di questi trattamenti e il rischio correlato alla loro somministrazione, rapporto che può essere sfavorevole o poco noto/non sicuro in caso di specifiche comorbidità, come ad esempio nei pazienti con malattie autoimmuni preesistenti in fase attiva che necessitano di terapia steroidea o immunosoppressiva cronica o in caso di infezioni virali croniche. In futuro, allo scopo di selezionare i pazienti candidabili al trattamento, sarà

necessario identificare biomarcatori predittivi di efficacia e tossicità dell'immunoterapia al fine di poter disegnare modelli predittivo-prognostici di risposta e poter classificare i pazienti in gruppi di rischio di sviluppo tossicità. Parte fondamentale delle sperimentazioni cliniche in immuno-oncologia include, quindi, lo studio e la comprensione delle caratteristiche biologiche associate al tumore, al microambiente tumorale o al sistema immunitario del paziente, e delle loro interazioni, che possono influenzare la risposta clinica al trattamento immunoterapico. Allo stesso tempo la ricerca si propone di valutare, migliorare e comparare con la monoterapia l'efficacia della terapia di combinazione per lo sviluppo e l'applicazione clinica di nuove modalità terapeutiche personalizzate in funzione della neoplasia del singolo paziente. Tali obiettivi futuri volgono al raggiungimento di strategie terapeutiche innovative sempre più mirate e individualizzate sul singolo paziente, ottimizzando l'efficacia e minimizzando gli AEs¹.

1.2 Attuali strategie immunoterapiche e campi di applicazione

Gli approcci terapeutici immunologici possono essere distinti in passivi e attivi, con ulteriori sottoclassificazioni ².

L'immunoterapia passiva prevede l'infusione nell'organismo del paziente di effettori immunitari già attivati *ex vivo* e destinati sulla superficie della cellula neoplastica al fine di potenziare una risposta immunitaria antitumorale già esistente nel corpo. Essa si divide in cellulare adottiva e umorale: la prima consiste nella reinfusione diretta di cellule effettrici immunologiche specifiche dotate di attività antitumorale; la seconda, invece, prevede la somministrazione di anticorpi esogeni monoclonali (mAbs) con attività immunomodulatrice, quali ICI e co-stimolatori immunitari.

Nel dettaglio, l'immunoterapia cellulare adottiva (*adoptive cellular immunotherapy*, ACI) rappresenta un importante mezzo di trattamento in quanto specifico, e senza resistenza ai farmaci. L'ACI può essere a sua volta suddivisa in aspecifica e specifica. La prima prevede l'attivazione di cellule effettrici immunitarie (DCs; cellule NK; le *cytokine-induced killer cells*, CIK; TILs; LAK; macrofagi killer attivati MAK) da parte di linfocine o citochine: tali cellule sono ottenute dalle cellule endogene provenienti dal sangue periferico del paziente, che vengono estratte e coltivate in un sistema di colture cellulari esponendole alla interleuchina-2 (IL-2). Le cellule *killer* attivate hanno però una capacità di *killing* debole e una bassa specificità. L'ACI specifica, invece, possiede il vantaggio di avere una alta specificità e una alta letalità e consiste nell'induzione di cellule effettrici immunitarie (cellule T CD8+ e CD4+) attivate e stimulate da antigeni tumorali specifici. Essa include i seguenti

approcci terapeutici: la TIL *therapy* (linfociti T isolati dal tessuto tumorale resecato, processo che fornisce una linea di cellule T con maggiore specificità tumorale rispetto a quelle ottenute dal sangue) che trova impiego nel melanoma; l'immunoterapia basata sul recettore delle cellule T (TCR-T *therapy*) con cellule T geneticamente modificate che riconoscono i Tumor Associated Antigens (TAAs); infine la CAR-T *therapy* (cellule T geneticamente modificate che riconoscono specifiche proteine sulla superficie della cellula neoplastica), usata principalmente nei tumori ematologici come linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma a cellule B di alto grado, leucemia linfoblastica acuta recidivante o refrattaria¹.

L'immunoterapia passiva umorale, dall'altro lato, vede l'utilizzo di anticorpi monoclonali (mAbs), proteine modificate dirette contro un *target* specifico della deregolazione della catena di trasduzione del segnale nel tumore, allo scopo di interferire con i processi immunologici. Numerose tipologie di mAbs vengono oggi utilizzate nel trattamento delle neoplasie, includendo i mAbs *naked*, coniugati e bispecifici. I primi rappresentano il tipo più frequente nella pratica clinica e funzionano sia potenziando la risposta immune antitumorale sia come effettori di distruzione immunitaria: agiscono infatti su checkpoint del sistema immunitario, e sono pertanto definiti come Immune checkpoints Inhibitors (ICIs). Gli anticorpi coniugati vengono legati invece ad agenti chemioterapici (*chemolabeled antibodies*) o a particelle radioattive (*radiolabeled antibodies*), veicolando selettivamente i mAbs sulle cellule tumorali. Infine gli anticorpi bispecifici sono composti da due differenti mAbs^{2,3}

L'immunoterapia attiva consiste nell'induzione di una risposta immunitaria antitumorale nel paziente con attivazione in vivo delle cellule effettrici; essa può essere suddivisa in specifica (vaccini tumorali) e non specifica (immunomodulatori, terapia con citochine). I vaccini tumorali (preventivi o terapeutici) hanno come scopo quello di generare, indurre e far proliferare una popolazione T citotossica tumore-specifica destinata a uccidere il tumore in un ospite che non è riuscito a sviluppare spontaneamente una risposta efficace. La risposta T tumore-specifica è ottenuta con diverse tecniche, quali la somministrazione di peptidi, DNA (vaccini peptidici/a DNA) o cellule tumorali (provenienti dall'ospite-autotone- oppure da un altro paziente-allogene), al fine di conseguire una proliferazione di cellule T stimulate e attivate da antigeni tumorali reintrodotti nel corpo con lo scopo di renderli immunogenici e indurre il rigetto del tumore. L'immunoterapia aspecifica con citochine si è basata per anni sull'uso degli interferoni (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), glicoproteine con attività antivirale e antitumorale, ed interleuchine. Infine, la terapia aspecifica con immunomodulatori vede l'uso di alcuni adiuvanti batterici (BCG e derivati, sospensioni

di *Corynebacterium parvum* ucciso) che hanno proprietà tumoricide e che sono stati utilizzati con o senza aggiunta di antigeni tumorali nel trattamento di una varietà di neoplasie, solitamente in associazione a chemioterapia intensiva o radioterapia ².

1.3 I checkpoint immunitari e il meccanismo di azione degli ICIs

I checkpoint immunitari sono proteine inibitorie localizzate sulla superficie delle cellule T o sulle cellule tumorali e costituiscono un potenziale bersaglio per la soppressione della iper-attivazione delle cellule T. In circostanze normali, infatti, tali proteine regolano e sopprimono la risposta immunitaria T-mediata, prevenendo il danno da deregolazione autoimmune; tuttavia esse possono ridurre la risposta T nei confronti di un tumore indebolendo la capacità del sistema immunitario di riconoscere e attaccare il tumore².

Il checkpoint immunitario CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) è ampiamente distribuito sulla superficie delle cellule T attivate ed è un omologo competitivo di CD28 (molecola co-stimolatoria per l'attivazione della cellula T alla presentazione dell'antigene estraneo) ad affinità di legame maggiore per la molecola B7 presente sulle cellule presentanti l'antigene (APCs) : il *pathway* molecolare di CTLA-4 determina, quindi, una trasduzione di segnale intracellulare negativa, portando alla anergia della cellula T con conseguente ridotta proliferazione e sopravvivenza. In questo modo si inibisce l'uccisione delle cellule neoplastiche da parte dei CTLs ^{4,5}.

Il recettore PD-1 (*Programmed Death*) appartiene alla famiglia dei co-stimolatori B7/CD28 e si trova espresso sulla superficie delle cellule T attivate: quando si lega ai suoi ligandi PD-L1 e PD-L2 (*Programmed Death-Ligand 1/2*), largamente espressi dalle cellule tumorali, inibisce l'attivazione delle cellule T. La molecola PD-L1 si trova sulla superficie dei linfociti T, DCs, monociti, mieloidi, cellule neoplastiche e cellule esterne al sistema ematopoietico (polmone, endotelio vascolare, fegato non parenchimale, sinciziotrofoblasto placentare e cheratinociti). La molecola PD-L2 è presente, invece, sulla superficie di DCs, monociti e cellule tumorali. Il *pathway* molecolare mediato dall'interazione del recettore PD-1 con il suo ligando PD-L1 inibisce l'attivazione della cellula T sopprimendo principalmente la produzione di citochine IFN γ , TNF- α , IL-2 e trasduce segnali intracellulari di tipo inibitorio in modo che riducono la sopravvivenza della cellula ⁴.

Il razionale per l'utilizzo di mAbs che hanno come target checkpoints immunitari presenti sulla cellula T (CTLA-4, PD-1) e sulla cellula neoplastica (PD-L1) consiste nella

rimozione dell'inibizione esercitata da tali molecole immunoregolatrici e nel rendere i CTLs capaci di distruggere il tumore².

Gli ICI sono un gruppo di anticorpi monoclonali che stimolano il sistema immunitario a montare e mantenere attiva una risposta immunitaria contro il tumore, stimolando le cellule immunitarie, prevalentemente i linfociti T, mediante un blocco del meccanismo di inibizione della risposta T mediata. Gli inibitori del CTLA4 (Ipilimumab) agiscono legandosi a CTLA-4, e inducendo conseguentemente un'iperattivazione della risposta immunitaria in corrispondenza degli organi linfoidi secondari.

Gli inibitori del PD-1 (es. cemiplimab, pembrolizumab, nivolumab), invece, agiscono bloccando l'interazione tra PD-1, espresso sui linfociti T attivati, e molecole come PD-L1 e PD-L2 espresse sulle cellule tumorali.

Infine vi sono gli inibitori di PD-L1 (es. atezolizumab, durvalumab, avelumab), una glicoproteina transmembrana espressa sulle cellule immunitarie attivate dall'infiammazione, tra cui macrofagi, cellule T, cellule B, cheratinociti, cellule endoteliali ed epiteliali^{6,7}.

Il meccanismo di azione dei principali ICI è illustrato in figura 1.

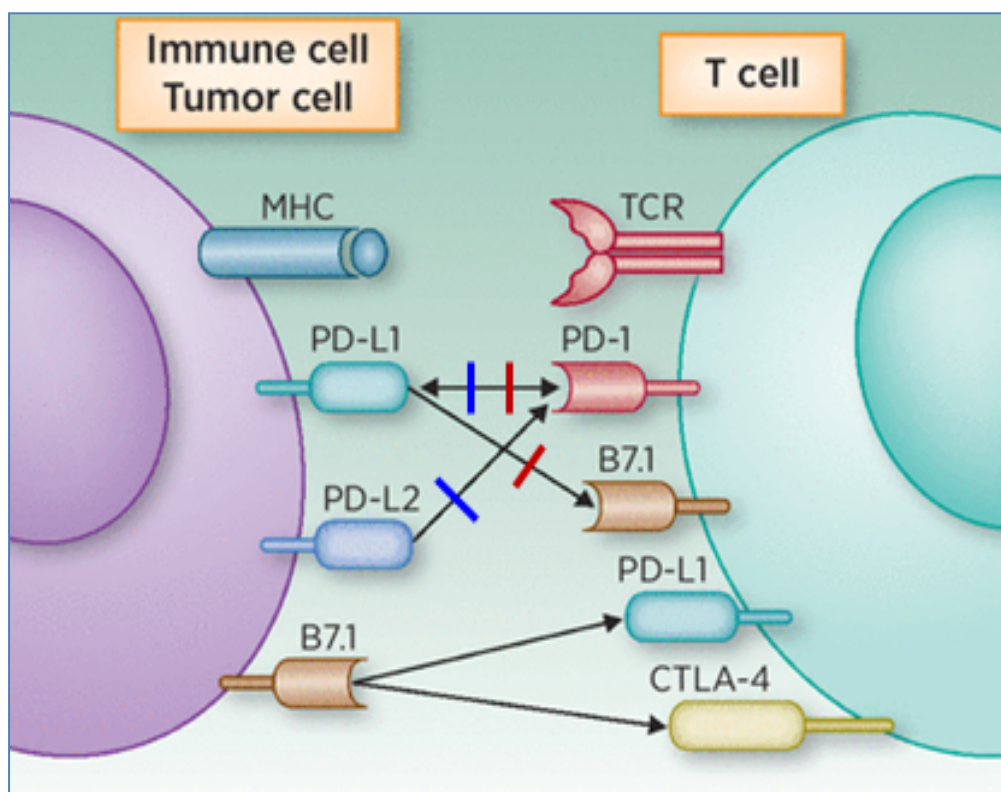


Fig 1: meccanismo di azione dei principali ICI (Soria JC et al., Clin Cancer Res, 2015)

1.4 Classificazione degli ICIs e attuali approvazioni

I principali ICIs approvati dalla FDA e usati nella pratica clinica possono essere suddivisi in tre gruppi: mAbs anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1.

L'anticorpo che ha come *target* CTLA-4 è l'ipilimumab (Yervoy®), e ha le seguenti indicazioni:

- in monoterapia o in associazione a nivolumab per il trattamento del melanoma avanzato mM (non resecabile o metastatico) negli adulti e negli adolescenti di età pari o superiore a 12 anni.
- in prima linea di pazienti adulti con carcinoma a cellule renali (RCC) avanzato a rischio intermedio/sfavorevole.
- in associazione a nivolumab e 2 cicli di chemioterapia a base di platino in prima linea del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) metastatico EGFR WT o ALK non traslocato.
- in associazione a nivolumab è indicato per il trattamento in prima linea nel mesotelioma maligno della pleura non resecabile.
- nel carcinoma del colon-retto (CRC) con deficit di riparazione del mismatch repair (dMMR) o elevata instabilità dei microsatelliti (MSI-H) in associazione a nivolumab dopo precedente chemioterapia di associazione a base di fuoropirimidina.
- in associazione a nivolumab per il trattamento in prima linea di pazienti adulti con carcinoma a cellule squamose dell'esofago (ESCC), avanzato non resecabile, ricorrente o metastatico, con espressione tumorale del PD-L1 $\geq 1\%$.

Gli anticorpi che hanno come *target* PD-1 attualmente approvati dalla FDA sono pembrolizumab (Keytruda®), nivolumab (Opdivo®), cemiplimab (Libtayo®).

Pembrolizumab trova indicazione in:

- in monoterapia è indicato nel trattamento del mM (non resecabile o metastatico).
- in monoterapia è indicato nel trattamento adiuvante del melanoma in Stadio IIB, IIC o III e che sono stati sottoposti a resezione completa
- NSCLC con PD-L1 con tumor proportion score (TPS) $\geq 50\%$ in assenza di tumore positivo per mutazione di EGFR o per ALK.
- in associazione a pemetrexed e chemioterapia contenente platino, nella prima linea del NSCLC non squamoso EGFR WT o ALK non riarriangiato.
- in associazione a carboplatino e paclitaxel o nab-paclitaxel, in prima linea del NSCLC metastatico squamoso.

- in monoterapia è indicato nel NSCLC localmente avanzato o metastatico con PD-L1 TPS $\geq 1\%$ e che hanno ricevuto almeno un precedente trattamento chemioterapico.
- Linfoma di Hodgkin classico recidivato o refrattario che abbiano fallito il trattamento con trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) o a seguito di almeno due precedenti terapie quando ASCT non è un'opzione di trattamento.
- carcinoma uroteliale (UCC) localmente avanzato o metastatico negli adulti che hanno ricevuto una precedente chemioterapia contenente platino.
- UCC localmente avanzato o metastatico in pazienti che non sono eleggibili alla chemioterapia contenente cisplatino e il cui tumore esprime PD-L1 con un combined positive score (CPS) ≥ 10 .
- in monoterapia o in associazione a chemioterapia contenente platino e 5-fluorouracile (5-FU), nel trattamento di prima linea del carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC) carcinoma a cellule squamose della testa e del collo, metastatico o ricorrente non resecabile, in caso di PD-L1 con un CPS ≥ 1 .
- in monoterapia nel trattamento del HNSCC, ricorrente o metastatico, negli adulti il cui tumore esprime PD-L1 con un TPS $\geq 50\%$ e in progressione durante o dopo la chemioterapia contenente platino.
- in associazione ad axitinib, è indicato nel trattamento di prima linea del RCC avanzato
- in associazione a lenvatinib, è indicato nel trattamento di prima linea del RCC
- in monoterapia è indicato nel trattamento adiuvante di adulti con RCC a maggior rischio di recidiva a seguito di nefrectomia o a seguito di nefrectomia e resezione di lesioni metastatiche-
- CRC MSI-H o dMMR nei seguenti setting: - trattamento di prima linea del mCRC - trattamento del carcinoma del CRC non resecabile o metastatico dopo precedente terapia di associazione a base di fluoropirimidina.
- in monoterapia è indicato nel trattamento dei seguenti tumori MSI-H o dMMR: carcinoma dell'endometrio avanzato o ricorrente, con progressione della malattia durante o dopo un precedente trattamento con una terapia contenente platino in qualsiasi setting e che non sono candidati a chirurgia curativa o radioterapia; carcinoma gastrico (GC), dell'intestino tenue o delle vie biliari, non resecabile o metastatico, con progressione della malattia durante o dopo almeno una precedente terapia.
- in associazione a chemioterapia contenente platino e fluoropirimidina, è indicato nel trattamento di prima linea del carcinoma dell'esofago localmente avanzato non resecabile o

metastatico o adenocarcinoma della giunzione gastroesofagea HER-2 negativo, negli adulti il cui tumore esprime PD-L1 con un CPS ≥ 10 –

- Carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) in associazione a chemioterapia come trattamento neoadiuvante e poi continuato in monoterapia come trattamento adiuvante dopo intervento chirurgico o in associazione a chemioterapia, nel TNBC non resecabile o metastatico con PD-L1 CPS ≥ 10 e che non hanno ricevuto una precedente chemioterapia per malattia metastatica

-In associazione a lenvatinib, è indicato nel trattamento del carcinoma dell'endometrio avanzato o ricorrente con progressione della malattia durante o dopo un precedente trattamento con una terapia contenente platino in qualsiasi setting e che non sono candidati a chirurgia curativa o radioterapia.

- in associazione a chemioterapia con o senza bevacizumab, è indicato nel trattamento del carcinoma della cervice persistente, ricorrente o metastatico negli adulti il cui tumore esprime PD-L1 con un CPS ≥ 1 .

Nivolumab trova indicazione in: mM (in monoterapia o in combinazione con ipilimumab); NSCLC metastatico in progressione/dopo CT a base di platino; RCC avanzato dopo precedente terapia antiangiogenica, e in associazione a ipilimumab negli RCC a rischio intermedio/sfavorevole; nel RCC in associazione a cabozantinib; LH classico dopo trapianto autologo di staminali e brentuximab vedotin; HNSCC ricorrente/metastatico in progressione/dopo terapia a base di platino; UCC avanzato/metastatico in progressione/dopo terapia a base di platino e in adiuvante negli UCC muscolo invasivi PDL1 $\geq 1\%$; mesotelioma maligno in prima linea di trattamento; CRC MSI-H dopo precedente chemioterapia di associazione a base di fluoropirimidina ; ESCC avanzato non resecabile, ricorrente o metastatico, con espressione tumorale del PD-L1 $\geq 1\%$; ESCC, avanzato non resecabile, ricorrente o metastatico, con espressione tumorale del PD-L1 $\geq 1\%$, in associazione a chemioterapia di combinazione a base di fluoropirimidina e platino; in monoterapia per il trattamento di pazienti adulti con ESCC, avanzato non resecabile, ricorrente o metastatico dopo precedente chemioterapia di combinazione a base di fluoropirimidina e platino; trattamento adiuvante di pazienti i con cancro esofageo o della giunzione gastro-esofagea che presentano malattia patologica residua a seguito di precedente chemioradioterapia neoadiuvante; in associazione a chemioterapia di combinazione a base di fluoropirimidina e platino nel GC, della giunzione gastro-esofagea o dell'esofago, HER2 negativo, avanzato o metastatico, i cui tumori esprimono PD-L1 con un punteggio positivo combinato (CPS) ≥ 5 .

Infine, gli anticorpi che hanno come target PD-L1 attualmente approvati dalla FDA sono durvalumab (Imfinzi®) indicato nell' UCC o metastatico in progressione/dopo CT a base di platino e nel NSCLC localmente avanzato/ non resecabile con espressione di PD-L1 $\geq 1\%$ non progredito a seguito di CT a base di platino, avelumab (Bavencio®) indicato nel UC avanzato e nel carcinoma a cellule di Merkel metastatico, e atezolizumab (Tecentriq®) indicato in UCC avanzato, in associazione con carboplatino ed etoposide per la terapia di prima linea del carcinoma polmonare a piccole cellule in stadio esteso, in associazione con nab-paclitaxel, nel TNBC localmente avanzato non resecabile o metastatico PD-L1 ($\geq 1\%$) e nel NSCLC metastatico precedentemente trattato ^{8,9,10}.

Dalla numerosità delle indicazioni approvate per gli ICI già in uso, notevolmente incrementate negli ultimi anni, e attualmente in corso di allargamento, e dalle innumerevoli molecole di questo tipo in corso di sviluppo, si evince la necessità impellente di migliorare ed incrementare la possibilità di selezionare i pazienti candidabili ad immunoterapia, mediante l'identificazione di fattori predittivi di risposta agli ICI, che possano essere facilmente fruibili in pratica clinica nel corso dei prossimi anni.

1.5 Eventi avversi Immuno-relati (irAEs)

In virtù del meccanismo d'azione degli ICI non specifico per l'attivazione dei linfociti T, le principali tossicità di questi farmaci sono dovute al danno immuno-mediato e auto-infiammatorio, con coinvolgimento d'organo o sistemico, rompendo il meccanismo di tolleranza. Le tossicità da immunoterapia sono, quindi, condizioni infiammatorie uniche e nuove nel panorama degli AEs derivanti da trattamento oncologico: gli irAEs sono aspecifici e possono potenzialmente avere qualsiasi organo come bersaglio dell'iperattivazione delle cellule T e ciò pone problemi di diagnosi differenziale con altre condizioni morbose frequenti nel paziente oncologico (come le sindromi paraneoplastiche). Il riconoscimento rapido dell'irAE, e un trattamento repentino dello stesso con coinvolgimento spesso di expertises multidisciplinari rappresentano un punto fondamentale per il successo della terapia con ICI: si riduce il rischio di dover interrompere il trattamento e si massimizza l'efficacia della terapia e l'*outcome* del paziente ¹¹.

Sembrano esserci spettri di tossicità differenti in relazione alla classe di ICI utilizzata: diarrea, colite e ipofisite predominano nell'uso di inibitori di CTLA-4, mentre polmonite e tiroidite sono più frequenti con inibitori di PD1; il profilo degli irAEs che si manifestano

durante il trattamento con mAbs anti-CTLA-4 è inoltre dose-dipendente¹². In Figura 2 sono rappresentate le tossicità più frequenti divise per organo.

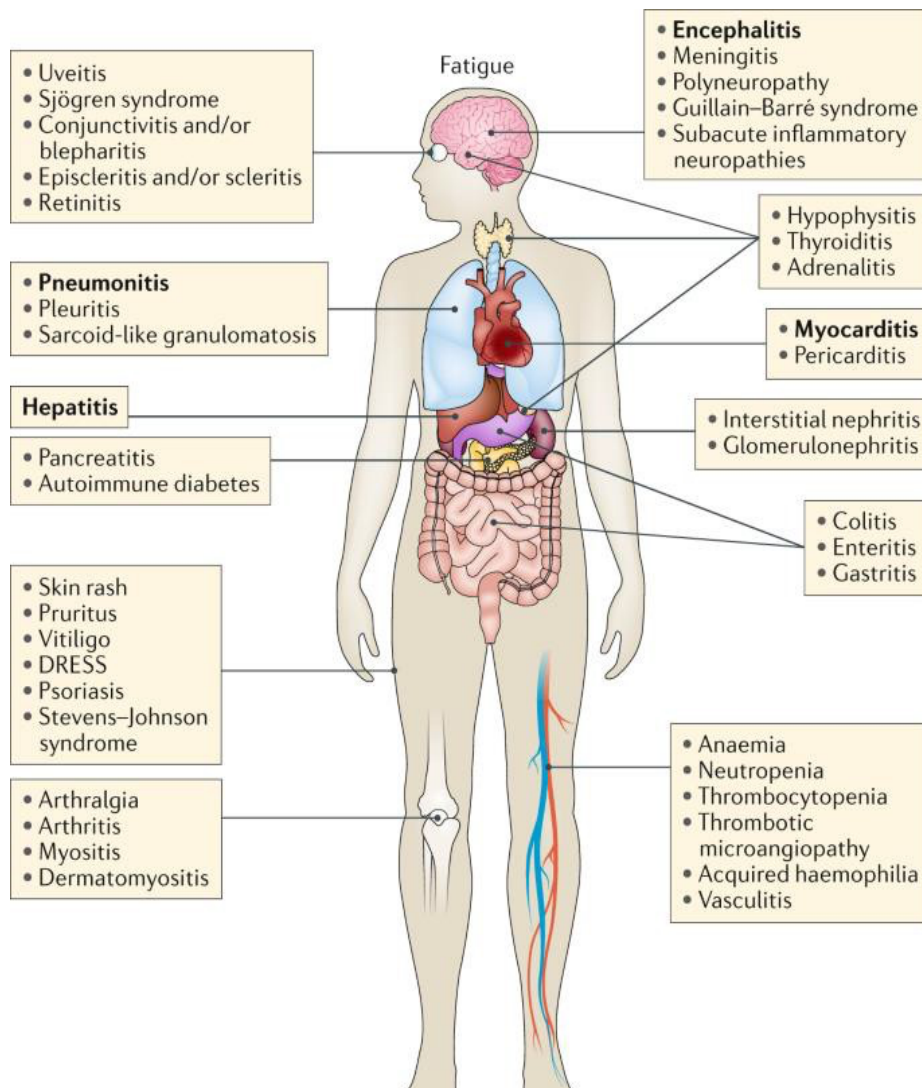


Fig 2 rappresentazione delle principali tossicità immunomediate per tropismo d'organo; da Martins, F., Sofiya, L., Sykiotis, G.P. *et al.* Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 563–580 (2019)

La maggior parte degli irAEs, in accordo alla distinzione per grado di severità come codificato in Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE v 4.0)¹³, è di grado <3 e può non richiedere trattamento o solo terapia sintomatica se riconosciuti rapidamente e trattati adeguatamente. Tuttavia, alcune tossicità organo-specifiche sono di grado severo (in particolare in individui geneticamente predisposti a disturbi autoimmuni) e richiedono trattamenti steroidei ad alte dosi e a lungo termine (che possono teoricamente impattare sull'attività della immunoterapia stessa) o una terapia sostitutiva, necessitando in casi selezionati di ricovero ospedaliero o interruzione transitoria/permanente della terapia. Ogni tipo di irAE ha delle caratteristiche di comparsa, durata, incidenza, severità e

trattamento specifiche. Generalmente, la maggior parte degli irAEs non compare prima di 4 settimane dall'inizio del trattamento con ICIs, anche se manifestazioni dermatologiche (rash e prurito), gastrointestinali (diarrea e colite) e neurologiche possono manifestarsi in tempi più precoci. Inoltre, sembrerebbe esserci un modello di comparsa prevedibile delle diverse tossicità: quelle dermatologiche e gastrointestinali compaiono generalmente intorno alle prime 4-6 settimane dall'inizio del trattamento (irAEs precoci), mentre le manifestazioni endocrinologiche (ipofisite) e la tossicità epatica tendono a manifestarsi più tardi, solitamente dopo il terzo mese (Figura 3). E' però importante sottolineare che le tossicità possono manifestarsi in qualsiasi momento e possono perdurare anche una volta terminata la terapia con ICIs, necessitando di monitoraggio anche dopo la conclusione del trattamento per almeno i 6 mesi successivi ¹⁴.

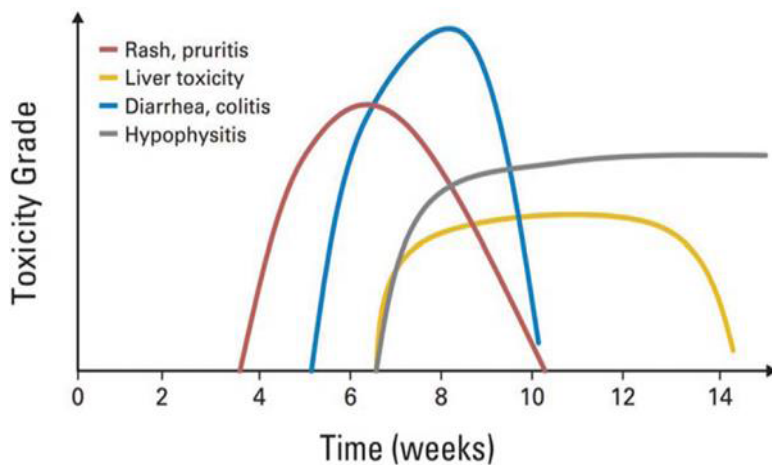


Fig. 3 tempo di comparsa medio degli irAES

Gli irAEs dermatologici sono i più comuni e, tipicamente, hanno l'insorgenza più precoce. Si osservano frequentemente reazioni di grado lieve, tuttavia a volte si riportano reazioni gravi come la sindrome di Stevens-Johnson e la necrolisi epidermica tossica (manifestazioni a rapida comparsa). Si è osservato che ipilimumab non è frequentemente associato a tossicità cutanee, determinando prevalentemente rash maculo-papulare di grado lieve più o meno accompagnato da sintomi quali il prurito. Gli inibitori di PD-1/PD-L1, invece, sono più frequentemente associati a manifestazioni dermatologiche, fra cui anche in rari casi di reazioni gravi, ma nella maggior parte dei casi si verificano rash lievi che non richiedono trattamento oppure occasionalmente vengono trattati con corticosteroidi topici, non rendendo necessario l'aggiustamento posologico degli anti-PD-1/PD-L1. Raramente gli irAEs dermatologici determinano l'interruzione definitiva del trattamento con ICIs, più

frequenti sono le sospensioni temporanee causate da rashes che richiedono alte dosi di steroidi.

Le tossicità gastrointestinali sono frequentemente riportate durante l'uso di ICI, in particolare la diarrea: insorge alla sesta/settimana di trattamento e si risolve intorno alla decima, all'endoscopia e alla biopsia si presenta colite autoimmune (caratterizzata da invasione neutrofila e distruzione delle cripte-epitelio) del colon distale che risparmia il retto e come una lesione macroscopicamente eritematosa, emorragica, con edema e erosione della mucosa. Tuttavia, vi è un'incidenza molto più elevata di diarrea nei pazienti che ricevono anticorpi anti-CTLA-4 in confronto a quelli trattati con anti PD-1 / PD-L1 in cui raramente gli irAEs sono di grado severo. L'eventuale trattamento prevede l'uso di farmaci sintomatici, terapia reidratante orale e supplementi elettrolitici se necessario; i gradi più severi vengono trattati con steroidi e idratazione parenterale con supporto nutrizionale (fino all'uso, nei casi refrattari, di infliximab). Altre tossicità gastrointestinali più severe in corso di terapia con ICI, quali perforazione e ostruzione, mostrano una bassa incidenza.

Gli irAEs endocrini maggiormente osservati sono tiroiditi, insufficienza surrenalica e ipofisiti, altre meno osservate sono livelli di testosterone basso e diabete mellito di tipo 1. Tali tossicità tendono a manifestarsi tardivamente, fra la dodicesima e ventiquattresima settimana di trattamento, con frequenza simile negli inibitori di CTLA-4 e negli inibitori di PD-1/PD-L1. Poiché le manifestazioni specifiche si manifestano tardivamente è necessario sospettare precocemente il ruolo di tali tossicità in presenza di sintomatologia non specifica (nausea, cefalea, astenia): l'ipofisite, infatti, si presenta con sintomi generali e aspecifici di fronte ai quali si rende necessario il dosaggio plasmatico degli ormoni ACTH (*adrenocorticotropic hormone*), TSH (*thyroid-stimulating hormone*), FSH-LH (*follicle-stimulating hormone-luteinizing hormone*), GH (*growth hormone*) e prolattina. I livelli ormonali bassi pongono diagnosi di ipofisite (più o meno supportata dall'evidenza radiologica alla RMN encefalica) e il trattamento prevede la terapia ormonale sostitutiva che permette il miglioramento dei sintomi, consentendo la prosecuzione dell'immunoterapia. L'ipertiroidismo o l'ipotiroidismo si osservano nel 10-15% dei pazienti e, generalmente, l'ipertiroidismo precede un lungo periodo successivo di ipotiroidismo; le disfunzioni tiroidee si risolvono in 6-10 mesi. Le disfunzioni dell'asse corticosteroidico e gonadico, dall'altra parte, tendono a restare permanenti: l'insufficienza surrenalica acuta è l'endocrinopatia più grave associata a disidratazione, ipotensione e squilibri elettrolitici come ipercalcemia e iponatremia e viene trattata con terapia ormonale sostitutiva a base di corticosteroidi (comportando problemi di gestione con la concomitante terapia

immunostimolante a base di ICI) che necessita di essere sospesa, per essere ripresa successivamente quando si raggiunge la dose di mantenimento dell'ormone. Nei pazienti sottoposti a ICI si raccomanda il monitoraggio plasmatico dei livelli di TSH prima di iniziare e durante il trattamento, mentre i livelli plasmatici dell'ACTH, cortisolo e testosterone vengono solitamente richiesti nei pazienti che sviluppano astenia e sintomatologia non specifica.

L'epatotossicità è evento piuttosto raro durante l'uso di ICI: la reazione di più comune riscontro è rappresentata dall'aumento di transaminasi (ALT, AST) e, meno comunemente, di bilirubina totale, ragion per cui è necessaria l'esecuzione di esami ematici con gli indici di funzionalità epatica prima di ogni somministrazione, escludendo eventuali altre cause di disfunzione epatica (epatiti virali, progressione neoplastica epatica, danno da farmaci, alcol) nel caso in cui tali indici risultino aumentati. La maggior parte degli episodi sono asintomatici o presentano febbre e si manifestano, più frequentemente, intorno alla 8-12 settimana dopo l'inizio del trattamento, anche se possono anche esservi eventi precoci o ritardati. L'epatotossicità può determinare l'interruzione del trattamento con ICI ed essere curata con alte dosi di steroidi (o micofenolato mofetile nei casi refrattari).

La pancreatite immuno-correlata si osserva raramente ed eventualmente nei pazienti trattati con ipilimumab, molto spesso asintomatica o con dolore addominale aspecifico, viene confermata dal rialzo di amilasi e/o lipasi e dai cambiamenti radiologici. Nonostante ciò, non rientra nel monitoraggio di routine il dosaggio di amilasi e/o lipasi in pazienti asintomatici trattati con ipilimumab, mentre in pazienti sintomatici si considera il trattamento con prednisone o equivalenti.

Le tossicità polmonari non sono molto frequenti (<10% dei pazienti) e le più osservate sono condizioni infiammatorie quali sarcoidosi e polmoniti interstiziali, accompagnate da sintomi come tosse e dispnea. L'iter diagnostico degli irAEs polmonari deve escludere la presenza di polmoniti infettive e il trattamento delle condizioni severe prevede l'uso di steroidi ad alte dosi e, in aggiunta nel caso in cui i sintomi non migliorino, di infliximab o micofenolato mofetile.

Gli irAEs reumatologici sono stati poco studiati e comprendono artrite infiammatoria, sindrome di sicca, miopatia infiammatoria, vasculite e nefrite lupica. Tali tossicità possono spesso persistere oltre la cessazione della somministrazione di ICI e un trattamento tempestivo con immunosoppressori è fondamentale per garantire i risultati ottimali per questi pazienti. Inoltre, la mancanza di una diagnosi tempestiva e l'uso inconsistente (o incoerente) della nomenclatura da parte degli oncologi per descrivere diverse

condizioni reumatiche infiammatorie ostacola lo sviluppo di iter di gestione. In questo contesto il reumatologo svolge un ruolo cruciale nella diagnosi, valutazione e trattamento di questi pazienti.

Altri irAEs più rari sono quelle oculari (episclerite, congiuntivite, uveite) osservati in <1% dei pazienti e accompagnate da fotofobia, secchezza oculare, visione offuscata e trattate con steroidi topici; seguono le tossicità neurologiche, renali, ematologiche e possibili esacerbazioni di malattie autoimmuni preesistenti.

In conclusione, tutti gli irAEs sono condizioni infiammatorie mediate dalla cross-reazione delle cellule T, la cui risposta è diretta verso organi e tessuti dell'organismo. Caposaldo del trattamento delle irAEs, sono i corticosteroidi, farmaci dal potere immunosoppressore, il cui uso può rendersi necessario per un lungo periodo con conseguente aumento del rischio di effetti a lungo termine (osteoporosi, soppressione surrenalica, iperglicemia, malattie cardiovascolari, sindrome di Cushing, turbe psichiatriche e immunosoppressione), direttamente proporzionali alla durata del trattamento e alla dose cumulativa. La gestione degli irAEs con steroidi richiede, infine, l'uso della dose minima efficace di steroide per il più breve tempo possibile e la prevenzione degli effetti avversi steroide-correlati. Altri farmaci immunosoppressori possono essere utilizzati nella gestione degli irAEs, nel caso in cui gli steroidi risultino insufficienti, come infliximab (usato nella diarrea steroide-resistente), agenti anti-TNF- α (nella diarrea e polmonite refrattaria), da evitare in pazienti che presentano epatotossicità. Nel caso di tossicità endocrine quali insufficienza surrenalica o ipofisaria è chiaramente indicata la terapia di sostituzione ormonale ³.

2. FATTORI PREDITTIVI DI RISPOSTA E DI TOSSICITÀ

L'immunoterapia è diventata un caposaldo nella terapia oncologica negli ultimi anni, in quanto ad oggi gli ICIs utilizzabili in pratica clinica hanno spesso mostrato significativa superiorità rispetto alla CT tradizionale in termini di ORR, durata delle risposte e OS in molti tumori. Tuttavia, tale strategia soffre di diverse limitazioni come l'alto costo, la presenza di una percentuale di pazienti non responders (con sottogruppi di pazienti che sviluppano anche rapida progressione di malattia (*progression of disease*, PD), infine possibili tossicità severe scarsamente riconosciute e di difficile gestione.

Nell'era della medicina personalizzata e di precisione risulta pertanto fondamentale trovare biomarcatori prognostici e predittivi di risposta al trattamento con ICIs. I

biomarcatori predittivi, infatti, permettono di distinguere i pazienti *responders* al trattamento dai *non responders*, risparmiando questi ultimi da eventuali irAEs gravi e non necessarie e contenendo la spesa sanitaria. La ricerca oncologica si è mossa per identificare possibili fattori predittivi di risposta alla terapia con ICIs, quali ad esempio l'espressione di PD-L1, l'aumentato numero di TILs, l'elevato *tumor mutational burden* (TMB), il deficit di *mismatch repair* (MMRD) e altri fattori plasmatici periferici (come i livelli di neutrofilo) facilmente misurabili al fine di selezionare i pazienti candidabili al trattamento ed impedire costi e tossicità inutili^{15,16}. Allo stesso tempo, assodato che gli irAEs possono provocare l'interruzione della terapia o trattamenti prolungati con steroidi (che influenzano l'efficacia del trattamento con ICIs) e ricoveri ospedalieri, influenzando negativamente l'*outcome* clinico e impattando sulla sostenibilità, si rende necessario identificare biomarcatori predittivi del rischio, insorgenza e gravità degli irAEs. Con l'eccezione di preesistenti disordini immunitari, attualmente non ci sono biomarcatori clinicamente validati e disponibili, ma sono in studio molti candidati promettenti come il profilo proteomico sierico basale (ad es CD163 e CXCL5 che avrebbero un ruolo nel melanoma)¹⁴⁻¹⁸.

Sarebbe auspicabile riuscire a validare dei biomarcatori facilmente misurabili che possano guidare il clinico nella scelta terapeutica ottimale per i pazienti candidabili ad ICIs.

2.1 Fattori predittivi di risposta

Gli studi ad oggi condotti hanno evidenziato possibili fattori che influenzano l'efficacia dell'immunoterapia anticipandone l'effetto favorevole o meno in determinate tipologie di pazienti. Alcuni di questi fattori predittivi di risposta agli ICIs possono assumere anche un ruolo prognostico.

Il primo fattore su cui è necessario porre attenzione è la composizione e il numero di cellule immunitarie presenti nel TME (microambiente tumorale), rivestendo un ruolo predittivo positivo l'infiltrazione sia profonda sia marginale del tumore da parte delle cellule T CD8+. Fattori predittivi negativi di risposta agli ICIs presenti nel TME sono: i drivers inibitori della risposta immunitaria antitumorale presenti (MDSCs, i macrofagi di tipo II, i metaboliti del triptofano, i *cancer-associated fibroblasts* che mediano l'apoptosi delle cellule T); condizioni di acidità e ipossia che promuovono la crescita tumorale e proliferazione neoplastica, inibendo l'attivazione e la citotossicità delle cellule T. Un altro fattore proprio dell'ospite è costituito dalla flora batterica che stimola i TILs all'uccisione neoplastica, potenziando quindi l'effetto degli ICIs. Per quanto riguarda le caratteristiche

cliniche del paziente, non è stato trovato alcun biomarcatore predittivo di risposta a immunoterapia (eccezion fatta per un basso IMDC *risk score* nel mRCC, associato a una migliore risposta a nivolumab)¹⁹.

Risulta fondamentale classificare i tumori sulla base delle loro caratteristiche immunitarie: il primo fenotipo è rappresentato dai tumori *immunosuppressed* altresì conosciuti come *immune desert type* poiché mancano di cellule T sia al centro che alla periferia del tumore, rendendo quindi inefficace dal punto di vista clinico l'efficacia degli inibitori di PD-1/PD-L1. Il secondo tipo di tumore è quello *immune excluded*, conosciuto anche come *immune exemption type* in quanto possiede un gran numero linfociti CD3+ e CD8+ alla periferia del tumore, mentre il centro ne è privo, ciò rappresenta un meccanismo di *escape* tumorale ed è il motivo per cui la risposta immunitaria è soppressa e la terapia con ICIs è inefficace. L'ultima tipologia di tumori è chiamata *immune inflammatory type* poiché esprimono PD-L1, fattori pro-infiammatori e cellule immunitarie effettrici intorno al tumore e solitamente risponde agli ICIs⁶, tuttavia è possibile l'*escape* tumorale. Caratteristiche tumorali indagate come fattori potenzialmente influenzanti la risposta all'immunoterapia sono state la densità di neoantigeni e il TMB. L'eterogenità intratumorale/profilo mutazionale e il ridotto numero di neoantigeni clonali rappresentano putative ragioni di ridotta efficacia dell'immunoterapia, suggerendo lo *screening* tumorale per le mutazioni clonali vs le mutazioni subclonali come biomarcatore predittivo di risposta. Allo stesso modo, il TMB condiziona il numero di neoantigeni rilasciati e quindi la risposta T associata: un incremento del TMB determina un maggior numero di neoantigeni rilasciati e presentati ai CTLs, con potenziamento dell'effetto immunoterapico, costituendo un possibile biomarcatore sia predittivo di risposta all'immunoterapia sia prognostico di *outcome* clinico favorevole. Alla luce di tali evidenze il TMB del sangue periferico (su cui sono stati ricercati e calcolati il numero di alterazioni del *circulating tumor DNA* e i SNVs) permette potenzialmente di predire meglio gli esiti positivi della immunoterapia e la conseguente efficacia del trattamento⁶. Sono stati investigati fattori predittivi di risposta agli inibitori di PD-1/PD-L1 come l'elevata espressione di PD-L1 sulle cellule tumorali del paziente, che rappresenta il biomarcatore più comune e correntemente utilizzato mediante tecniche di immunoistochimica. Gli studi, infatti, mostrano che l'iperespressione tumorale di PD-L1 sembra essere associata a una maggiore attività degli inibitori di PD-1/PD-L1 nei pazienti con NSCLC pretrattati, suggerendo un potenziale ruolo predittivo positivo²⁰. Altri fattori predittivi di risposta agli ICIs sono il deficit del meccanismo di riparazione del DNA (MMRD), che determina un

accumulo di mutazioni rendendo il tumore maggiormente immunogenico e infiltrato dai CTLs: MMRD ad esempio è un parametro predittivo positivo di risposta a pembrolizumab in pazienti con carcinoma colon-retto e, insieme alla instabilità dei microsatelliti (MSI), rappresenta un fattore predittivo di risposta a inibitori di PD-1 in molte neoplasie²¹.

I fattori genetico-molecolari sopramenzionati sono da una parte promettenti biomarcatori di risposta al trattamento con ICIs, dall'altra per molti non vi sono metodi universalmente standardizzati per la loro determinazione. Si ritrovano, infatti, alcuni ostacoli per il loro utilizzo nella pratica clinica, come ad esempio la riproducibilità dell'indagine e la relativa difficoltà di utilizzo del test impiegato (come NGS e le indagini immunoistochimiche), il requisito patologico del campione, l'eterogeneità del tumore e la variabilità del campionamento. Per tali motivi, si rende necessaria la ricerca di biomarcatori predittivi di risposta alla terapia *easy-to-use*, ossia prontamente disponibili ed economici, come la conta delle cellule del sangue periferico ottenibile da semplici esami ematici di routine (*blood biomarkers*)²².

2.2 Fattori predittivi di risposta plasmatici

I biomarcatori plasmatici (quali ad esempio la conta cellulare periferica, assoluta o in percentuale, e altre proteine sieriche) sono facili da gestire e monitorare, motivo per cui rappresentano un campo di studio promettente della ricerca oncologica anche nel campo dell'immunoterapia. Essi, se verificati e validati, potrebbero essere richiesti in qualsiasi momento, consentirebbero l'individuazione dei pazienti responders e un più efficace monitoraggio della terapia, evitando sprechi e tossicità inutili.

Ad oggi, è stato indagato il possibile ruolo predittivo di risposta alla terapia con inibitori di PD-1 di svariati fattori plasmatici. Studi condotti su pazienti affetti da mM mostrano che un aumento della conta dei monociti è associato significativamente a riduzione di OS e PFS²³ e che alti livelli di neutrofili al basale (in rapporto alla conta dei linfociti, *neutrophil-to-lymphocyte ratio*, NLR) combinati con LDH sierico sono significativamente correlati negativamente con l'efficacia di nivolumab²⁴; studi che indagano i benefici di nivolumab in pazienti con NSCLC, invece, hanno osservato che alti livelli di NLR correlavano con scarsa OS e PFS dopo il trattamento con nivolumab e ne hanno suggerito l'uso come fattore predittivo di OS e PFS²⁵. È stato inoltre suggerito l'uso di LDH sierico come biomarcatore predittivo, durante il trattamento con inibitori di PD-1, di risposte

precoci e PD nei pazienti con mM²⁶. Altri studi condotti su pazienti con mRCC trattati con nivolumab mostravano che nei pazienti con aumentati livelli di neutrofili, monociti e piastrine (in rapporto ai linfociti, *platelet-to-lymphocyte ratio*, PLR) vi erano una OS e PFS significativamente più brevi, mentre nei pazienti con PCR sierica elevata si era osservata una riduzione di OS. In aggiunta, è stato osservato che i livelli di monociti e NLR si associavano significativamente a ORRs migliori durante la terapia con nivolumab. Questi dati retrospettivi suggeriscono che fattori di infiammazione sistemica NLR/MLR/PLR/PCR sierica potrebbero essere usati come fattori predittivi significativi dell'efficacia della terapia con nivolumab in pazienti con mRCC. In particolare, le piastrine giocano un ruolo attivo nell'infiammazione mediante il rilascio di VEGF (che induce la migrazione e lo stravasamento di leucociti) e di PDGF (una chemochina che recluta neutrofili e monociti). Allo stesso modo, alti livelli di neutrofili promuovono un'infiammazione cronica aspecifica che favorisce la crescita tumorale mediante la soppressione (linfopenia) dell'attività antitumorale del sistema immunitario²⁷. Altri studi indagano il potenziale ruolo predittivo del fattore di NLR: alti livelli basali di neutrofili sono stati associati ad aumentato rischio di PD nei pazienti con mRCC trattati con nivolumab²⁸ e a ridotta PFS e ridotta risposta al trattamento con inibitori di PD-1 nei pazienti affetti da melanoma avanzato. Altre analisi retrospettive condotte su pazienti con NSCLC avanzato trattati con nivolumab o pembrolizumab confermano il potenziale ruolo predittivo di risposta al trattamento dei livelli di neutrofili e piastrine (NLR e PLR) al basale correlati al beneficio clinico derivante dalla terapia., in quanto entrambi i rapporti riflettono l'equilibrio tra infiammazione sistemica aspecifica e immunoreazione²⁸⁻³⁰.

Sono stati studiati, ma non clinicamente validati, anche fattori plasmatici associati all'efficacia della terapia con ipilimumab nei pazienti con mM: è stato proposto l'uso di elevati livelli di LDH sierico come criterio negativo di selezione al trattamento, mentre cambiamenti nella conta linfocitaria durante il trattamento hanno mostrato di predire la risposta a ipilimumab. Inoltre, anche i livelli di neutrofili (NLR) sono stati significativamente associati con l'efficacia di ipilimumab nel trattamento del mM: alti livelli basali aumentavano il rischio di PD e possono essere usati per costruire modelli prognostici (con endpoint OS) che forniscono una simultanea stima della cinetica di risposta a ipilimumab, agendo come marcatori surrogati di risposta e aiutando nella selezione dei pazienti che risponderanno al trattamento. Anche bassi livelli di monociti correlavano a esito terapeutico positivo³¹⁻³⁷.

2.3 Biomarcatori predittivi di tossicità associati all'uso degli ICIs

L'identificazione di biomarcatori che siano in grado di identificare i pazienti a più alto rischio di sviluppo di irAE e diagnosticare precocemente le tossicità sviluppate o addirittura prevederle potrebbe facilitare il clinico nell'uso e nella prescrizione appropriata degli ICIs, minimizzando i rischi ed i costi di gestione, con esiti diretti e misurabili sull'outcome. Sulla base di tali biomarcatori sarebbe idealmente possibile costruire un modello predittivo del rischio di sviluppo di tossicità per ciascun ICI utilizzato, classificando i pazienti a basso o ad alto rischio di sviluppo degli irAEs. L'identificazione di pazienti ad alto rischio di sviluppo degli irAEs risulta ancora più importante potenzialmente nella gestione dell'immunoterapia in regimi adiuvanti ed è attualmente fondamentale in considerazione della disponibilità di dosi flat mensili per nivolumab o di terapie di combinazione con chemio terapia o target therapy, che mostrano un'aumentata incidenza di tossicità.

2.3.1 Fattori genetici e molecolari

Contrariamente alle evidenze prodotte in merito ai fattori predittivi di risposta agli ICIs, attualmente non ci sono biomarcatori predittivi dell'inizio e severità degli irAEs clinicamente validati e disponibili, ma sono in studio molti candidati promettenti come il profilo proteomico sierico basale e in particolare i dosaggi di CD163 e CXCL5 al basale che avrebbero un ruolo nel mM³⁸⁻⁴⁰. Studi recenti condotti su pazienti con mM hanno mostrato che biomarcatori di attivazione neutrofila come CD117 e CECAM1 insieme a diversi geni dell'immunoglobuline potrebbero avere un ruolo predittivo di tossicità gastrointestinali associate a ipilimumab; inoltre pazienti femmine con bassi livelli sierici di IL-6 al basale sembrano a maggior rischio di sviluppo di tossicità di grado 3-4 associate al trattamento con ipilimumab. Allo stesso tempo è stato ipotizzato che IL-17 potesse essere un potenziale fattore predittivo di colite in pazienti trattati con ipilimumab, suggerendo il pathway IL-17/eosinofili come effettore di certi irAEs e il suo blocco promettente strategia nella gestione delle tossicità⁴¹⁻⁴³. Tuttavia, i fattori genetico-molecolari ad oggi studiati sono di difficile, costosa e non routinaria investigazione, ragion per cui la ricerca oncologica verte il proprio interesse sull'individuazione di fattori plasmatico-periferici semplici da dosare, prontamente disponibili ed economici.

2.3.2 Fattori plasmatici periferici

Ad oggi non vi sono molte evidenze in merito a possibili fattori plasmatici periferici predittivi di tossicità agli ICIs: studi condotti su pazienti con NSCLC avanzato hanno valutato il potenziale ruolo predittivo dei livelli basali di neutrofili e piastrine rispetto alla conta linfocitaria (NLR e PLR) osservando che bassi livelli erano significativamente associati con lo sviluppo degli irAEs. Allo stesso tempo tali rapporti al basale, indicatori di fattori di infiammazione aspecifica, sono stati indicati come fattori predittivi di risposta e beneficio clinico di terapia con ICIs, suggerendo l'uso combinato di determinati fattori, ove validati, sia come fattori predittivi di risposta che predittivi degli irAEs per selezionare i pazienti candidabili alla terapia con ICIs sulla base del rapporto rischio/beneficio ¹⁴. La determinazione dei valori basali di tali fattori periferici, dunque, potrebbe in futuro rientrare nel pannello di indagini routinarie da eseguire prima di iniziare il trattamento, al fine di ottimizzare il monitoraggio del trattamento, l'efficacia clinica della terapia e massimizzare l'outcome del paziente.

Dall'altro lato, si deve porre attenzione anche ai livelli di fattori plasmatici periferici che si modificano al momento della comparsa degli irAEs durante il trattamento: tali fluttuazioni dal livello basale in senso di aumento o decremento indotti dalla terapia con ICIs potrebbero anticipare la comparsa delle tossicità e potrebbero essere monitorate per la diagnosi precoce e il rapido trattamento di queste ultime. Esperienze retrospettive suggeriscono che aumenti della conta dei globuli bianchi (*white blood cells*, WBC) e diminuzioni dei livelli di linfociti potrebbero essere associati agli irAEs di grado 3-4 e irAEs polmonari di grado 1 nei pazienti con mM trattati con nivolumab; inoltre, è stato osservato in pazienti con mM trattati con ipilimumab una ipereosinofilia al tempo di comparsa delle tossicità cutanee ⁴⁴⁻⁴⁵. Tuttavia questi dati sono stati raccolti al momento di comparsa delle tossicità, e mancano del tutto dati sul loro valore predittivo al basale.

2.3.3 Conta eosinofila come biomarcatore periferico di risposta e tossicità agli ICIs

L'eosinofilia associata al tumore fu descritta per la prima volta nel 1893 ed è frequentemente osservata nei pazienti con il cancro, numerosi studi dimostrano che gli eosinofili sono attratti nel sito neoplastico da fattori chemiotattici come le esotossine e molecole associate al danno (allarmina HMGB1) rilasciati dalle cellule necrotiche tumorali. Tuttavia non è chiaro se gli eosinofili contribuiscano all'immunità antitumorale o siano semplicemente cellule appartenenti al TME⁴⁶⁻⁵².

L'eosinofilia periferica si riferisce a una conta plasmatica AEC >500 cellule/ μ l, mentre ipereosinofilia è definita come eosinofilia moderato-severa (\geq 1500 cellule/ μ l) in due determinazioni eseguite a un mese di distanza oppure è definita dalla conferma istologica dei tessuti con ipereosinofilia. Quando l'eosinofilia è direttamente associata a danno d'organo, viene chiamata sindrome ipereosinofila⁵³.

L'associazione tra gli eosinofili e il tumore rimane non chiara: è stato riportato che l'eosinofilia tumore-associata e periferica correlano con la prognosi in alcuni tipi di tumore, in particolare quelli di origine epiteliale (l'eosinofilia tumore-associata è stata correlata a buona prognosi nei tumori gastrointestinali, del distretto testa-collo, della vescica e della prostata in contrasto con i pazienti affetti da linfoma di Hodgkin). Studi condotti su pazienti con mM trattati con inibitori di PD-1 mostrano che alte proporzioni di eosinofili al basale potevano essere indipendentemente associate con favorevole OS⁵⁴⁻⁵⁵.

In letteratura sono presenti evidenze preliminari nel mM che dimostrano una correlazione tra l'aumento della conta eosinofila periferica (AEC) e miglioramenti dell'outcome dei pazienti che ricevono ICIs: in uno studio su pazienti con mM a avanzato è stato osservato inoltre un incremento della conta eosinofila di >100 cellule/ μ l dopo la somministrazione di ipilimumab che correlava con un'aumentata sopravvivenza³³; un altro studio su pazienti con mM trattati con pembrolizumab ha mostrato che un'elevata AEC basale (assoluta e relativa) correlava con favorevole OS⁵⁶ e anche l'uso di nivolumab nel mM produceva risultati simili (la mediana di OS per i pazienti che ricevevano immunoterapia con ipereosinofilia era di 35 mesi, in confronto ai 16 mesi dei pazienti con bassi livelli di eosinofili)⁵⁴. Inoltre, in un altro studio su pazienti affetti da melanoma, carcinoma a cellule renali e altri tumori non specificati ha stato osservato che l'eosinofilia indotta dalla terapia con ICIs (*immune-related eosinophilia*, Eo-ir) era rara e il picco mediano della conta eosinofila era stato stabilito intorno a 1000 cellule/ μ l e la sua presenza correlava con aumentato tasso di risposte alla terapia⁵⁷.

Gli eosinofili come co-effettori nella risposta immunitaria antitumorale, dunque, potrebbero spiegare il potenziale ruolo dell'eosinofilia come biomarcatore predittivo di risposta alla terapia con ICIs in un'ampia popolazione di pazienti con molti tipi di tumore. Si rendono necessarie a tal fine ulteriori indagini che valutino anche se l'aumento di AEC sia un effetto immunitario atteso dell'immunoterapia ed associato a miglior outcome.

Le tossicità derivanti dall'uso degli ICIs sono causate dall'attivazione aspecifica del sistema immunitario contro i tessuti sani e comprendono gli irAEs di tipo dermatologico, gastrointestinale e raramente ematologico, eosinofilia inclusa. L'eosinofilia indotta dal

trattamento con ICIs, oltre a correlare con risposta favorevole alla terapia, può determinare effetti avversi eosinofilo-indotti (*eosinophil-induced adverse events*, Eo-irAEs) di cui la maggior parte asintomatici. Tuttavia, l'eosinofilia moderato-severa che si instaura subito dopo l'inizio del trattamento può indurre i rari casi danni d'organo che necessitano dell'uso di steroidi e/o interruzione della terapia con ICIs, ragion per cui il monitoraggio di AEC durante la terapia con ICIs potrebbe essere un parametro da monitorare⁵⁸. Quando occorre eosinofilia durante trattamento con ICI, in primo luogo è necessario escludere altre possibili cause di aumento di AEC (uso di altri farmaci, elmintiasi-parassitosi, malattie atopiche-allergiche, reazioni allergiche agli stessi farmaci ICIs, tumori ematologici); secondariamente si ricercano i sintomi clinici e si eseguono gli esami di primo livello (ECG, indici di funzionalità epato-renale, *markers* cardiaci Tn e BNP) per indagare il danno d'organo eosinofilo-indotto (miocardite, polmonite eosinofila, colangite, rash, fascite eosinofila, nefrite). Una volta diagnostica l'eosinofilia indotta dal trattamento con ICIs e gli effetti avversi eosinofilo-indotti, è necessario valutarne la severità clinica: in caso di eosinofilia moderato-severa associata a irAEs di grado ≤ 3 si procede inizialmente al trattamento di prima linea con corticosteroidi a bassa o alta dose per la remissione dell'eosinofilia, mantenendo la terapia con gli ICIs se il tumore è sotto controllo, proseguendo successivamente con il *tapering* steroideo e il monitoraggio stretto delle complicanze eosinofile (in particolar modo la miocardite, evenienza spesso asintomatica e mortale). Tali osservazioni suggeriscono, dunque, che l'Eo-ir asintomatica e gli Eo-irAEs (grado ≤ 3) non costituiscono motivo sufficiente per l'interruzione del trattamento con gli ICIs.

Il ruolo degli eosinofili come co-effettori nell'immunità antitumorale potrebbe spiegare come alti livelli della conta eosinofila migliorino la risposta al trattamento con gli ICIs e sono stati associati ad un aumentato numero di irAEs.

Tuttavia, i meccanismi alla base dell'eterogeneità di risposta agli ICIs e di sviluppo degli irAEs rimangono non chiari.

Nonostante dati univoci sul ruolo dell'eosinofilia nel predire la risposta alla terapia con gli ICIs, mancano evidenze in letteratura in merito al possibile ruolo predittivo degli eosinofili nel segnalare il rischio, l'inizio e la gravità degli irAEs. Al momento sono disponibili studi condotti su pazienti affetti da mM trattati con ipilimumab che evidenziano aumenti della conta eosinofila al tempo di comparsa delle tossicità di tipo cutaneo: i pazienti hanno dimostrato aumenti dei livelli di eosinofili da 2,7 a 16 volte rispetto ai valori basali (valori medi prima vs dopo il trattamento con ipilimumab, 1.73% vs 8.38%) dopo lo sviluppo di reazioni cutanee⁴⁵. Sempre nel melanoma in trattamento con ipilimumab, in altri studi

aumenti della conta eosinofila sono risultati significativamente associati generalmente con l'occorrenza degli irAEs, ma non con OS, suggerendone l'uso come biomcatore per tutti gli AE⁵⁹. Uno studio più recente condotto su pazienti con mM trattati con inibitori di PD-1 sottolinea la correlazione fra alti livelli di AEC al basale (>240/ μ L) e l'evenienza degli irAEs endocrini¹². Tale correlazione potrebbe essere spiegata dall' evenienza di insufficienza surrenalica da ICIs che induce bassi livelli di glucocorticoidi e conseguente eosinofilia⁶⁰⁻⁶¹. Inoltre, è stato osservato che gli eosinofili infiltrano la ghiandola tiroidea dei pazienti con tiroidite di Hashimoto⁶². Su tali evidenze, gli eosinofili potrebbero avere un ruolo importante nella patogenesi degli irAEs endocrini indotti dagli ICIs. Inoltre, è stato osservato che l'occorrenza degli irAEs endocrini correlava con una miglior sopravvivenza nei pazienti con mM avanzato trattati con ipilimumab¹².

In conclusione, sono necessari ulteriori indagini che definiscano il ruolo dell'eosinofilia periferica come potenziale biomcatore di rischio, sviluppo e gravità delle tossicità associate al trattamento con gli ICIs.

3. PROGETTO DI DOTTORATO

Il progetto di Dottorato è volto ad analizzare il profilo di irAEs in pazienti affetti da tumore solido trattati in pratica clinica presso la SODc Oncologia Medica - AOU-Careggi di Firenze. Il progetto si avvale della stesura, approvazione conduzione ed analisi di un protocollo di ricerca clinica, osservazionale retrospettivo e prospettico.

L'obiettivo generale di questo progetto è quello di caratterizzare gli irAEs relativi al trattamento con ICIs, descrivendo l'incidenza e la tipologia, i loro modelli di gestione e la correlazione con gli esiti oncologici.

L'analisi osservazionale retrospettiva e prospettica effettuata si propone inoltre di investigare se esiste una possibile correlazione fra biomarkers sierici e la risposta al trattamento, nonché il ruolo di certi fattori nella predizione e nel monitoraggio della tossicità al trattamento. Ulteriore obiettivo sarà sviluppare e attuare adeguate strategie terapeutiche preventive e/o strategie di gestione degli irAEs, in particolare quelli reumatologici, con la possibilità di implementare percorsi intra aziendali per la gestione multidisciplinare della tossicità al trattamento.

3.1 Disegno dello Studio

Nel presente progetto abbiamo proposto uno studio prospettico multicentrico, longitudinale e osservazionale, che include tutti i pazienti oncologici che ricevono ICIs per valutare la prevalenza e il tipo di irAEs, così come la correlazione con la risposta tumorale. Tutti i pazienti trattati con ICIs da soli o in combinazione, sia in studi clinici che nella pratica clinica di routine nella SODc Oncologia Medica, AOU Careggi da gennaio 2020 a marzo 2022 sono stati inclusi nello studio.

3.2 Popolazione in Studio

Criteri di inclusione:

- Età >18 anni;
- Consenso informato volontario, scritto, datato e firmato;
- Tutti i pazienti trattati con tutti gli ICIs, nel contesto della pratica clinica di routine o degli studi clinici;
- Trattamento attivo o follow-up somministrato presso SODc Oncologia Medica AOU Careggi;
- Tutti i tumori solidi trattati in qualsiasi stadio della malattia con immunoterapia;

Criteri di esclusione:

- Assenza di un consenso scritto informato;

3.3 Endpoints

Endpoints primari:

1. Descrivere l'incidenza di tutti gli irAEs durante il trattamento e il follow-up per l'intera popolazione dello studio;
2. Descrivere il tipo e la frequenza degli irAES reumatologici, il loro trattamento e follow-up;
3. Descrivere la gravità (secondo la CTCAE, versione 4.03) e il trattamento di tutti gli irAEs e delle eventuali conseguenze;
4. Correlare il tipo, l'incidenza e la gravità di tutti gli irAEs con il tipo istologico del tumore, lo stadio della malattia, il tipo di ICI, il dosaggio dei farmaci, la durata del trattamento;
5. Analizzare l'associazione tra il tipo e la gravità dell'irAEs e l'esito oncologico, in termini di tasso di risposta globale (ORR), sopravvivenza libera da progressione (PFS: il tempo trascorso tra l'inizio del trattamento e la progressione del tumore o morte per qualsiasi causa)

e sopravvivenza globale (OS: il tempo trascorso tra l'inizio del trattamento e la morte per qualsiasi causa).

Endpoints secondari:

- Convalidare un algoritmo diagnostico per gli irAEs;
- Determinare il ruolo predittivo di risposta e di tossicità immuno-relata di fattori predittivi biologici;

3.4 Raccolta e registrazione dati

Ogni paziente è stato sottoposto secondo pratica clinica a una valutazione ambulatoriale pretrattamento che comprendeva visita clinica con esame obiettivo, esami ematici *standard*, la valutazione tumorale, la valutazione della funzione tiroidea. Durante il trattamento con ICIs è stato valutato l'eventuale sviluppo di tossicità mediante visita ambulatoriale di controllo (ogni 3-4 settimane, o comunque ad ogni accesso ambulatoriale o in degenza per l'infusione) e nel sospetto clinico di irAE durante il trattamento o durante il follow-up, il paziente è stato inviato a visita specialistica secondo il tipo di irAE. Riassumendo, dunque, le procedure di raccolta dei dati dei pazienti in studio (finalizzate a creare un *database* retrospettivo per ogni tumore solido studiato) prevedono i seguenti esami laboratoristici, strumentali, e valutazioni cliniche nelle varie fasi del trattamento.

Basale:

- Anamnesi, ECOG PS, esame obiettivo e segni vitali tramite visita oncologica;
- Esami ematici di routine: emocromo con formula leucocitaria, indici di funzionalità epatorenale, TSH;
- Determinazione dei livelli di AEC, ottenuti dagli esami ematici, che definiscono l'eosinofilia periferica (AEC >500 cellule/ μ L), ipereosinofilia (eosinofilia moderato-severa \geq 1500 cellule/ μ L) e la sindrome ipereosinofila (quando l'eosinofilia è direttamente associata a danno d'organo)⁶²;
- Consenso informato scritto.

Durante il trattamento

Ogni due/tre/quattro settimane (sulla base della schedule di trattamento):

- Esami ematici: emocromo con formula e chimica parziale (bilirubina totale, AST, ALT, creatinina), dosaggio di TSH per annotare eventuali modifiche indotte dal trattamento;
- Eventuale applicazione, sulla base dei livelli di AEC e sulle tossicità osservate, delle definizioni eosinofilia/iperosinofilia/sindrome ipereosinofila;
- Valutazione degli irAEs durante visita oncologica secondo il grading secondo CTCAE versione ¹³;
- ECOG PS ed esame obiettivo mediante visita oncologica di follow-up;
- Valutazione della risposta tumorale secondo i criteri RECIST ver 1.1 ⁶³.

Le tossicità sistemiche legate al trattamento sono state registrate nelle cartelle cliniche informatizzate sulla base di quanto riferito dal paziente ed obiettato dal medico durante la visita oncologica, in accordo alle buone norme di pratica clinica, e sulla base di quanto riportato agli esami ematici standard (provvisi di emocromo con formula leucocitaria, indici di funzionalità epatorenale e dosaggio del thyroid stimulating hormone, TSH). Gli irAEs sono stati valutati secondo il tipo (endocrino, epato-gastrointestinale, dermatologico, reumatologico, polmonare e di altra natura) e secondo il grading (G1, G2, G3 e G4) di severità clinica in accordo alla classificazione CTCAE versione 4.03 ¹³. Inoltre, è stato specificato per ogni irAE se vi erano state interruzioni della terapia con ICIs, tempo di comparsa, trattamento ed esito della tossicità.

I pazienti arruolati nello studio sono stati trattati tutti con ICIs somministrati su indicazione approvata o durante uno studio clinico in monoterapia o in combinazione per tumori solidi. La somministrazione dei farmaci è stata eseguita per via endovenosa (ev) in regime ambulatoriale o di degenza ordinaria secondo pratica clinica corrente.

Gli schemi terapeutici in monoterapia utilizzati sono:

- Nivolumab 3 mg/kg ogni 14 giorni in un periodo di 30 minuti, oppure 240 mg bisettimanale in infusione di 30 minuti o 480 mg ogni 28 giorni in infusione di 60 minuti con possibilità di passaggio da una schedula posologica all'altra nello stesso paziente;
- Pembrolizumab: 200 mg ogni 21 giorni in infusione di 30 minuti;
- Atezolizumab: 1200 mg ogni 21 giorni in infusione endovenosa;
- Durvalumab: 10 mg/kg ogni 14 giorni in infusione di 60 minuti;
- Ipilimumab: 3 mg/kg ogni 21 giorni in infusione di 90 minuti.

Lo schema di combinazione è:

- Nivolumab 3 mg/kg EV in 30 minuti + ipilimumab 1 mg/kg EV in 30 minuti ogni 21 giorni.

La raccolta dei dati dei pazienti è studio è stata effettuata consultando le informazioni presenti nelle cartelle cliniche (cartacee e informatizzate) della SODc Oncologia Medica AOU – Careggi.

Per ogni paziente arruolato sono state registrate le seguenti caratteristiche: i dati clinico-demografici (età, sesso, stadio della neoplasia alla diagnosi, durata del follow-up) e le informazioni riguardanti la terapia ricevuta con ICIs in monoterapia o in combinazione (piano terapeutico, linea di terapia, durata del trattamento, esito terapeutico definito secondo i criteri RECIST ver. 1.1⁶³), dati relativi agli irAEs; sono stati registrati inoltre gli esami ematochimici presenti in cartella e richiesti secondo pratica clinica al basale, ad ogni ciclo di trattamento e alla comparsa di ciascun irAE.

La valutazione della risposta obiettiva nelle lesioni target è così codificata secondo i criteri RECIST ver. 1.1⁶³:

- Risposta completa (CR): scomparsa di tutte le lesioni target. Qualsiasi linfonodo patologico (target o non target) deve avere il diametro minore che si è ridotto a una lunghezza < 10 mm;
- Risposta parziale (PR): almeno una diminuzione del 30% nella somma dei diametri delle lesioni target, prendendo come riferimento la somma dei diametri alla valutazione basale;
- Progressione di malattia (PD): almeno un aumento del 20% nella somma dei diametri delle lesioni target, prendendo come riferimento la maggior riduzione ottenuta durante il trattamento o la valutazione basale, se questa è la somma minore;
- Malattia stabile (SD): Riduzione o aumento nella somma dei diametri insufficiente per definirsi PR o PD.

Il presente studio è stato condotto nel pieno rispetto della legge italiana, dei principi enunciati nella Dichiarazione di Helsinki⁶⁴ e della *Good Clinical Practice* (GCP)⁶⁵, al fine di garantire ai pazienti la migliore protezione possibile.

Inoltre, la richiesta di approvazione per l'esecuzione del *trial* è stata esaminata e approvata dal Comitato Etico Regionale per la Sperimentazione Clinica della Regione Toscana con codice di protocollo "17332_oss", il quale ha approvato anche il modulo di Consenso Informato e ogni altra informazione fornita al paziente prima dell'arruolamento.

3.5 Analisi statistica

Sono state effettuate analisi descrittive riguardanti gli irAEs osservati in ciascun paziente arruolato. I confronti statistici per le variabili categoriche sono stati effettuati mediante il *test* X^2 . Tutte le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p < 0.05$.

La valutazione della risposta obiettiva è stata definita secondo i criteri RECIST ver. 1.1⁶³.

Alla base di questa classificazione, i pazienti analizzati in trattamento immunoterapico, sono stati descritti come responders, se presentavano una risposta completa (CR), parziale (PR) o una malattia stabile (SD) e non responders, nel caso in cui avessero una progressione della malattia (PD). Sono state eseguite analisi di correlazione tra svariati parametri biochimici al basale, la risposta al trattamento e l'occorrenza di irAEs.

In una sottoanalisi è stata eseguita una correlazione tra livello basale della conta eosinofila (AEC) e ulteriori fattori clinici quali età, sito del tumore, tipo di trattamento e tossicità, con l'insorgenza di irAES durante e al termine del trattamento, sviluppando un modello matematico in grado di predirre il rischio di svilupparli. Infine, per valutarne la validità, sono state utilizzate tre coorti esterne indipendenti di pazienti con carcinoma renale, melanoma e tumore polmonare non a piccole cellule che hanno ricevuto gli ICI, presso l'Unità di Oncologia Medica dell'Ospedale Universitario di Pisa e presso l'Unità di Oncologia Traslazionale dell'Ospedale Universitario di Careggi.

Tale modello è stato sviluppato come segue: È stata effettuata in collaborazione con lo statistico dr. Davide Capaccioli, attraverso la costruzione di indicatori e modelli, un'analisi statistica per spiegare l'andamento della tossicità rispetto all'AEC basale, su un campione di pazienti affetti da patologia tumorale, classificata per sede. L'obiettivo è stato quello di individuare la correlazione tra AEC basale e numero di tossicità, relativamente ad una serie di variabili quantitative e di altri fattori. Le unità statistiche che compongono il campione sono i pazienti affetti da patologia tumorale, la numerosità campionaria n è pari a 168 rilevazioni. La validità dell'analisi effettuata verte sullo studio incrociato di 3 variabili (caratteristiche le cui modalità, sono state rilevate su ciascun paziente appartenente al campione) e di 6 fattori, definiti come le caratteristiche delle unità statistiche le cui modalità, dette livelli, assumono valori interi appartenenti ad un intervallo finito. Le variabili in questione sono: numero di tossicità, AEC Basale, Età del paziente. I fattori invece, sono:

1. Sesso del paziente, 2 livelli (0=maschio; 1=femmina)
2. Sede della patologia, 3 livelli (0=rene; 1=melanoma; 2=polmone)

3. Trattamento, 5 livelli (0=Nivolumab; 1=Pembrolizumab; 2=Ipilimumab; 3=Nivolumab+Ipilimumab; 4= Altro)
4. Tossicità, 2 livelli (0=SI; 1=NO)
5. Best Response, 4 livelli (0=CR; 1=RP; 2=SD; 3= PD)
6. Responder, 2 livelli (0=NO; 1=SI)

I dati sono elaborati in una serie di tabelle e grafici che forniscono appropriati indicatori statistici che segnalano:

Come varia AEC Basale entro tossicità e tra tossicità

Come varia AEC Basale entro sede e tra sedi

Come varia AEC Basale entro trattamento e tra trattamenti

L'analisi è implementata dal confronto tra AEC Basale e AEC, a livello generale e rispetto alla sede: in questo caso sono stati utilizzati, oltre agli indicatori precedenti, anche il primo ed il terzo quartile, in modo da individuare le soglie di variabilità del fenomeno oggetto di studio. Gli indici proposti hanno segnalato che la variabilità della tossicità rispetto all'AEC Basale è non casuale, di conseguenza la componente sistematica è rilevante: per quantificare con precisione tale componente, ed individuare a livello analitico l'andamento delle tossicità, sono stati costruiti una serie di modelli statistici esplicativi e predittivi. Si è costruito una serie di modelli di analisi della varianza e in cui i fattori descritti precedentemente sono stati analizzati singolarmente, rispetto alle variabili risposta. La procedura adottata è stata questa: dopo aver costruito il modello generale, sono state omesse le variabili ed i fattori non significativi, inserite eventuali interazioni tra variabili e fattori, misurata la significatività di eventuali termini quadratici ed infine inseriti nuovamente le variabili ed i fattori omessi in precedenza. Successivamente, è stata rilevata l'adeguatezza di un modello di analisi della covarianza dove: la variabile risposta è "numero di tossicità", le due variabili esplicative sono "età" e "AEC Basale", è stato assunto il termine quadratico rispetto all'AEC Basale, tre fattori ("Sede", "Trattamento", "Tossicità") ed un'interazione tra età e Trattamento. Per far sì che il modello proposto potesse essere valido, sono stati considerati solamente le variabili e i fattori significativi, andandone a calcolare singolarmente i p-value in base ai test t ed F. Il test t di Student, è definito come un test statistico di tipo parametrico con lo scopo di verificare se il valore medio di una distribuzione si discosta significativamente da un certo valore di riferimento e viene utilizzato per valutare se le differenze osservate tra due gruppi sono reali o attribuibili al caso. Il test F, o test di Fisher, è un metodo sviluppato da Fisher fondamentale per l'interpretazione statistica di molti dati biologici ed è alla base di molti disegni sperimentali. Il test F si applica nell'analisi della varianza (in inglese: Analysis of

variance, abbreviata con l'acronimo ANOVA), utilizzata per testare le differenze tra medie campionarie prendendo in considerazione le rispettive varianze. Il principio alla base di questo test è quello di stabilire se due o più medie campionarie possono derivare da popolazioni che hanno la stessa media parametrica. Quando le medie sono solamente due è indifferente usare questo test o il t-test, mentre dobbiamo necessariamente utilizzare l'ANOVA quando le medie sono più di due, o quando vogliamo suddividere la variabile di raggruppamento in più variabili per eliminare eventuali fonti di variazione oltre a quella prodotta dal fattore di cui vogliamo valutare l'effetto (**Fig.4**).

$$Y_i = \mu_{site} + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \beta_3 x_{i2}^2 + \gamma_{01} x_{i1} + \epsilon_i$$

$$Y_i = \mu + \pi_{site} + \alpha_{site} + \theta_{site} + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \beta_3 x_{i2}^2 + \gamma_{01} x_{i1} + \epsilon_i$$

$\mu = 0,2688$, $\pi = site$, $\alpha = toxicity$, $\theta = treatment$, $\beta_1 = -0,0035$, $x_{i1} = Age$, $\beta_2 = 0,0016$, $X_{i2} = Basal AEC$, $\beta_3 = 3,4860E-06$, $X_{i2} = Basal AEC \times \sqrt{age}$, $\gamma_{01} x_{i1} + z_i = interaction between age and treatment$.

Figura 4: modello di analisi di covarianza proposto per prevedere le tossicità in funzione dell'aec basale.

4. RISULTATI

Nel corso dell'Anno accademico 2019-2020, è stata completata la stesura del protocollo clinico “*Immune-related adverse events in oncological patients treated with immune checkpoint inhibitors*” e della relativa documentazione per sottomissione per approvazione etica.

Lo studio è stato sottoposto al Comitato Etico Regionale per la Sperimentazione Clinica della Regione Toscana Sezione Area Vasta Centro in data 19/05/2020 ed ha ricevuto parere FAVOREVOLE per la conduzione in AOUC. Successivamente è stata ottenuta l'approvazione per la conduzione dello studio presso l'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana e l'Ospedale Santo Stefano di Prato.

Lo studio ha compreso una raccolta dati retrospettiva e una fase prospettica.

4.1 Analisi retrospettiva

Per la fase retrospettiva, sono stati raccolti i dati di 172 pazienti trattati con ICIs presso la SODc Oncologia Medica AOU Careggi da aprile 2013 a Maggio 2020 con ICIs e

affetti da carcinoma a cellule renali – mRCC (n=43), melanoma- mM (n=62) e tumore del polmone non a piccole cellule -NSCLC (n=67).

In particolare, è stato creato un database (DB) clinico per descrivere l'incidenza, il tipo e la frequenza, la gravità di gli irAEs durante il trattamento e il follow-up. E' stata eseguita inoltre la correlazione del tipo, l'incidenza e la gravità di tutti gli irAE con il tipo istologico del tumore, lo stadio della malattia, il tipo di ICI, il dosaggio dei farmaci, la durata del trattamento.

Per i pazienti in trattamento attivo o in follow up è stato acquisito consenso informato scritto a partecipare al progetto di ricerca in seguito alla ricezione delle informazioni circostanziate sugli scopi, sulle modalità di esecuzione e sui possibili rischi inerenti alla partecipazione.

I pazienti arruolati sono stati suddivisi in tre coorti specifiche per la specifica neoplasia solida presentata e per ogni coorte sono state descritte le seguenti caratteristiche proprie di ciascun paziente: i dati clinico-demografici (età, sesso, stadio della neoplasia alla diagnosi, durata del follow-up) e le informazioni riguardanti la terapia ricevuta con ICI in monoterapia o in combinazione (piano terapeutico, linea di terapia, durata del trattamento, esito terapeutico definito secondo i criteri RECIST e la tipologia di irAEs).

La raccolta dei dati dei pazienti è studio è stata effettuata consultando le informazioni presenti nelle cartelle cliniche (cartacee e informatizzate).

Sono state registrate tutte le procedure eseguite per ogni paziente, in accordo alla comune pratica clinica: valutazione ambulatoriale pre-trattamento che comprendeva visita clinica con esame obiettivo, esami ematici standard, valutazione tumorale, la valutazione della funzione d'organo. E' stato registrato l'eventuale sviluppo di tossicità mediante valutazione di ogni visita ambulatoriale di controllo (ogni 3-4 settimane) ed è stato identificato se nel sospetto clinico di irAE durante il trattamento o durante il follow-up, il paziente fosse stato inviato a visita specialistica secondo il trofismo d'organo.

E' stata parallelamente condotta una sottoanalisi dello studio, per cercare di stabilire il rapporto tra la conta eosinofila (in termini assoluti, AEC) al basale e le eventuali modifiche durante terapia con lo sviluppo di irAEs e la correlazione tra aumenti e riduzioni della conta eosinofila periferica con lo sviluppo di una determinata tipologia di irAE.

4.1.1 Analisi descrittiva

Nella coorte di pazienti con RCC l'età mediana era di 65 anni (range, 45-79), i pazienti maschi erano 35/43 (81.4%) e le femmine 8/43 (18.6%); l'età mediana dei pazienti affetti da mM era di 69 anni (range, 30-90), i pazienti maschi erano 44/62 (71.0%) e le femmine 18/62 (29.0%); infine, i pazienti con diagnosi di NSCLC presentavano una età mediana di 70 anni (range, 32-83), i maschi erano 39/67 (58.2%) e le femmine 28/67 (41.8%). Tutti i pazienti sono stati valutati per le risposte obiettive secondo i criteri RECIST 1.1: nel tumore renale 1 paziente/43 (2.3%) ha ottenuto CR e 6/43 (14.0%) hanno ottenuto PR (ORR, 16.3%), 11/43 (25.6%) hanno mostrato SD, mentre 25 (58.1%) pazienti sono progrediti durante il trattamento. Nei pazienti affetti da melanoma 7/62 (11.3%) ha ottenuto CR e 8/62 (12.9%) ha ottenuto PR (ORR, 24.2%), 21/62 (33.9%) hanno ottenuto CR e 8/62 (12.9%) ha ottenuto PR (ORR, 24.2%), 21/62 (33.9%) hanno mostrato SD, mentre 22 (35.5%) sono progrediti durante il trattamento. Infine nel gruppo del NSCLC 3 pazienti/67 hanno ottenuto CR (4.5%) e 5/67 (7.5%) hanno ottenuto PR (ORR, 12.0%), 15/67 (22.4%) hanno mostrato SD, mentre 34 (50.7%) sono progrediti durante il trattamento. Al momento dell'analisi, i pazienti con diagnosi di RCC vivi erano 25/43 (58.2%), si è rilevato solo 1 paziente/43 morto (2.3%) e il numero dei pazienti persi al follow up è stato 17/43 (39.5%); i pazienti affetti da mM vivi erano invece 26/62 (42.0%), i morti sono stati 3/62 (4.8%), mentre i persi al fup 33/62 (53.2%); infine, i pazienti con diagnosi di neoplasia polmonare in vita erano 26/67 (38.8%), i morti sono stati 19/67 (28.4%) e i persi al fup 22/67 (32.8%). Tali caratteristiche clinico-demografiche relative a ogni coorte (rene, melanoma e polmone) sono riportate in **Tabella 1**.

Per quanto riguarda l'esposizione al trattamento con ICIs, i dati raccolti mostrano che 93 pazienti/172 (54.1%) hanno ricevuto nivolumab; 43/172 (25.0%) sono stati trattati con pembrolizumab; 12 pazienti/172 (7.0%) –tutti con diagnosi di mM– hanno ricevuto ipilimumab; 10 individui/172 (5.8%) –tutti con diagnosi di RCC– hanno eseguito la terapia di combinazione simultanea nivolumab+ipilimumab; infine 14 pazienti/172 (8.1%) hanno seguito altri protocolli terapeutici (atezolizumab/durvalumab per NSCLC). Per maggiori dettagli e confronti fra i regimi terapeutici adottati nelle diverse coorti si rimanda alla **Tabella 2**, in cui viene specificata la frazione di pazienti appartenenti alla specifica coorte che ha ricevuto un determinato farmaco.

	Età mediana [range]	Sesso		Esito terapeutico	
		M	F	Resp	Non resp
Rene (n=43)	65 [45-79]	35 (81.4%)	8 (18.6%)	18/43 (41.9%)	25/43 (58.1%)
Melanoma (n=62)	69 [30-90]	44 (71.0%)	18 (29.0%)	36/62 (58.1%)	22/62 (35.5%)
Polmone (n=67)	70 [32-83]	39 (58.2%)	28 (41.8%)	23/67 (34.3%)	34/67 (50.7%)

Tabella 1. Caratteristiche clinico-demografiche e di risposta al trattamento; Resp: responders

	ICIs				
	Nivolumab	Pembrolizumab	Ipilimumab	Nivo+Ipi	Altro
Rene (n=43)	33/43 (76.7%)	-	-	10/43 (23.3%)	-
Melanoma (n=62)	31/62 (50.0%)	19/62 (30.6%)	12/62 (19.4%)	-	-
Polmone (n=67)	29/67 (43.3%)	26/67 (38.8%)	-	-	12/67 (17.9%)
N TOT =172	93/172 (54.0%)	45/172 (26.2%)	12/172 (7.0%)	10/172 (5.8%)	12/172 (7.0%)

Tabella 2. Tipi di trattamento

Gli irAEs si sono osservati in 114/172 pazienti (66.3%), fra questi 105/114 (92.1%) presentavano irAEs G1-2 come prima tossicità, mentre 9/114 (7.9%) hanno manifestato AEs G3-4 come prima tossicità. I 114 pazienti che avevano sviluppato almeno una tossicità 32/114 (28.1%) avevano diagnosi di RCC, 43/114 (37.7%) erano affetti da mM, infine 39/114 (34.2%) erano affetti da NSCLC.

I dati sulla frequenza di irAEs (per singola coorte) sono riportate nelle **Tabelle 3 e 4**. Nella prima si specifica il numero di pazienti che sviluppano almeno una tossicità: nei pazienti con diagnosi di tumore renale 32/43 (74.4%) hanno sviluppato almeno una tossicità e fra questi 27/32 (84.4%) aveva come prima tossicità un irAEs di grado G1-2,

mentre 5 su 32 (15.6%) un evento di grado G3-4; nella coorte dei pazienti affetti da mM 43/62 (69.3%) avevano manifestato irAEs e fra questi 40/43 pazienti (93.0%) aveva come prima tossicità un irAEs G1-2, mentre 3 su 43 (7.0%) una prima tossicità di grado G3-4; infine 39 pazienti/67 (58.2%) con diagnosi di neoplasia polmonare sviluppavano irAEs e fra questi 38 avevano come prima tossicità irAEs G1-2 (97.4%), mentre 1 su 39 (2.6%) di grado G3-4. In **Tabella 5** sono evidenziati la frequenza di irAEs sulla base del regime terapeutico ricevuto: l'associazione nivolumab+ipilimumab ha causato irAEs in 7 pazienti/10 (70.0%) , ovvero su 7/32 (21.9%) pazienti RCC che avevano sviluppato almeno una tossicità; pembrolizumab ha determinato irAEs in 31/45 pazienti (68.9%) che avevano eseguito il trattamento; nivolumab ha determinato irAEs in 63/93 (67.7%) pazienti che hanno ricevuto il trattamento ipilimumab ha determinato irAEs in 7/12 (58.3%) pazienti che hanno eseguito la terapia e in 7/43 pazienti (16.3%) con diagnosi di melanoma con almeno una tossicità; infine altri protocolli terapeutici hanno causato irAEs in 6/12 (50.0%) ovvero in 6/39 (15.4%) pazienti con NSCLC con almeno una tossicità.

	Frequenza pz con irAEs (tox 1)	Pz con tossicità (tox 1)	
		G1-2	G3-4
Rene	32/43 pz (74.4%)	27/32 tox (84.4%)	5/32 tox (15.6%)
Melanoma	43/62 pz (69.3%)	40/43 tox (93.0%)	3/43 tox (7.0%)
Polmone	39/67 pz (58.2%)	38/39 tox (97.4%)	1/39 tox (2.6%)

Tabella 3. irAEs e sede neoplasia primitiva.

	Totale pz con irAEs	Rene (n=32)	Melanoma (n=43)	Polmone (n=39)
Nivolumab (n=93)	63/93 (67.7%)	25/32 (78.1%)	21/43 (48.8%)	17/39 (43.6%)
Pembroizumab (n=45)	31/45 (68.9%)	-	15/43 (34.9%)	16/39 (41.0%)
Ipilimumab (n=12)	7/12 (58.3%)	-	7/43 (16.3%)	-
Nivo+Ipi (n=10)	7/10 (70.0%)	7/32 (21.9%)	-	-
Altro (n=12)	6/12 (50.0%)	-	-	6/39 (15.4%)

Tabella 4. irAEs e regime terapeutico

Inoltre, gli irAEs sono stati classificati, sulla base della tipologia, in eventi di tipo endocrino, epato-gastrointestinale, dermatologico, reumatologico, polmonare, e altro (ematologici, oculari, renali, neurologici, generali). Riportiamo in **Tabella 5** il numero di pazienti, totale (n=114) e per neoplasia (rene n=32, melanoma n=43, polmone n=39), che hanno sviluppato come prima tossicità un determinato tipo di irAE: nella coorte RCC gli irAEs più frequenti sono state quelli di tipo endocrino manifestatesi in 12/32 pazienti (37.5%); nel melanoma gli irAEs epato-gastrointestinali in 12/43 pazienti (27.9%); nel polmone gli irAEs dermatologiche in 8/39 pazienti (20.5%).

Tipo di tossicità	Pz con irAEs (tox 1)			
	TOT (n=114)	Rene (n=32)	Melanoma (n=43)	Polmone (n=39)
Endocrinologica	24/114 (21.1%)	12/32 (37.5%)	5/43 (11.6%)	7/39 (17.9%)
Epato-gastro	23/114 (20.2%)	4/32 (12.5%)	12/43 (27.9%)	7/39 (17.9%)
Dermatologica	23/114 (20.2%)	5/32 (15.6%)	10/43 (23.3%)	8/39 (20.5%)
Reumatologica	7/114 (6.1%)	2/32 (6.3%)	2/43 (4.6%)	3/39 (7.7%)
Polmonare	12/114 (10.5%)	4/32 (12.5%)	4/43 (9.3%)	4/39 (10.3%)
Altro	25/114 (21.9%)	5/32 (15.6%)	10/43 (23.3%)	10/39 (25.7%)

Tabella 5. Tipo di irAE alla prima comparsa

Ulteriore approfondimento è stato eseguito sul numero di irAEs totali (indipendente dal tempo di comparsa) sviluppati dai 114 pazienti che hanno mostrato almeno una tossicità: si sono registrati 191 irAEs totali per 114 pazienti, quindi alcuni pazienti hanno sviluppato più di una tossicità (con rapporto irAEs: paziente uguale a 1.7) e di questi 191 irAEs 61/191 (32.0%) nei pazienti con RCC, 66/191 (34.5%) si sono manifestati nei pazienti con mM e 64/191 (33.5%) sono state sviluppati dai pazienti con NSCLC. Nello specifico in **Tabella 6** è stato analizzato il grado delle tossicità sviluppate ed è stato osservato che 172 irAEs/191 (90.1%) erano di grado lieve G1-2, mentre 19/191 (9.9%) di grado più severo G3-4: in particolare nei pazienti con diagnosi di RCC 51 irAEs/61 (83.6%) erano di grado G1-2 e 10/61 (16.4%) di grado G3-4; i pazienti con mM avevano 58 irAEs/66 (87.9%) G1-2 e 8/66 (12.1%) G3-4; infine nei pazienti con NSCLC 63 irAEs/64 (98.4%) erano G1-2 e solo 1/64 (1.6%) G3-4. Infine si riporta nella **Tabella 7** seguente la classificazione per tipologia degli irAEs totali (n=191) indipendente dal tempo di comparsa delle tossicità sviluppate.

	Frequenza irAEs	Pz con tossicità	
	(N=191)	G1-2	G3-4
Rene	61/191 (32.0%)	51/61(83.6%)	10/61 (16.4%)
Melanoma	66/191 (34.5%)	58/66 (87.9%)	8/66 (12.1%)
Polmone	64/191 (33.5%)	63/64 (98.4%)	1/64 (1.6%)

Tabella 6. Grado irAEs e sede neoplasia primitiva

Tipo di tossicità	irAEs (tutte)			
	TOT (n=191)	Rene (n=61)	Melanoma (n=66)	Polmone (n=64)
Endocrinologica	38/191 (19.9%)	19/61 (31.1%)	7/66 (10.6%)	12/64 (18.8%)
Epato-gastroenterica	45/191 (23.6%)	13/61 (21.3%)	18/66 (27.3%)	14/64 (21.9%)
Dermatologica	34/191 (17.8%)	10/61 (16.4%)	14/66 (21.2%)	10/64 (15.6%)

Reumatologica	13/191 (6.8%)	3/61 (4.9)	5/66 (7.6%)	5/64 (7.8%)
Polmonare	17/191 (8.9%)	4/61 (6.6)	7/66 (10.6%)	6/64 (9.3%)
Altro	44/191 (23.0%)	12/61 (19.7%)	15/66 (22.7%)	17/64 (26.6%)

Tabella 7. Tipo di irAE globale

4.1.2 Valore predittivo della Conta Eosinofila

È stato analizzato il livello basale della conta eosinofila assoluta, AEC (N°/ μ L), nelle tre coorti (**Tabella 8**). La media di AEC basale risultava: nei pazienti con RCC di 163.1 nella popolazione globale, 132.2 in chi non sviluppava tossicità e 176.7 nei pazienti che sviluppavano irAEs; nei pazienti affetti da mM era di 206.8 per la coorte globale, 332.2 nei pazienti senza tossicità e 154.3 nei pazienti con irAEs; nei pazienti con NSCLC era di 252.7 globale, 298.0 nei pazienti senza tossicità e 223.6 in chi sviluppava irAEs. La mediana di AEC basale risultava: nei pazienti con RCC di 160.0 per tutta la coorte, 130.0 in chi non sviluppava tossicità e 165.0 nei pazienti che sviluppavano irAEs; nei pazienti affetti da melanoma era di 140.0 globalmente, 170.0 nei pazienti senza tossicità e 140.0 nei pazienti con irAEs; nei pazienti con NSCLC era di 135.0 in tutti i pazienti, 90.0 nei pazienti senza tossicità e 150.0 in chi sviluppava irAEs. I risultati ottenuti evidenziano che i valori di media/mediana di AEC al basale nei pazienti senza tossicità risultava diverso rispetto a quanto osservato nei pazienti che sviluppavano irAEs: in particolare, nel RCC entrambi i valori risultavano inferiori; nel mM, invece, tali valori erano superiori; infine, nel NSCLC il valore di media di AEC basale nei pazienti senza tossicità era superiore a quello dei pazienti con irAEs, mentre il valore di mediana di AEC risultava inferiore.

Inoltre, sono stati calcolati i valori di media e mediana di AEC al basale (come riportato in **Tabella 9**) nel gruppo dei pazienti che avevano sviluppato almeno una tossicità, per ciascuna coorte, distinguendo i pazienti che presentavano irAEs di G1-2 come prima tossicità da quelli che mostravano irAEs di G3-4 come prima tossicità. I risultati ottenuti hanno mostrato che entrambi i valori nel gruppo di pazienti con irAEs G1-2 erano inferiori (rene) o superiori (melanoma e polmone) rispetto a quelli osservati nei pazienti con irAEs G3-4.

	AEC basale (N°/ μ L)					
	TOT PZ		<i>Pz senza tox</i>		<i>Pz con tox</i>	
	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>
Rene	163.1	160.0	132.2	130.0	176.7	165.0
	<i>n=43</i>		(11 no tox/43)		(32 tox/43)	
Melanoma	206.8	140.0	332.2	170.0	154.3	140.0
	<i>n=62</i>		19 no tox/62		43 tox/62	
Polmone	252.7	135.0	298.0	90.0	223.6	150.0
	<i>n=67</i>		28 no tox/67		39 tox/67	

Tabella 8. AEC basale nelle coorti

È stato analizzato il livello AEC (N°/ μ L), nelle tre coorti (**Tabella 10**) al tempo di comparsa della prima tossicità (t=tox 1) nei pazienti che sviluppavano almeno un irAE. La media risultava: nei pazienti con RCC di 247.5, nei pazienti affetti da mM era di 217.0, nei pazienti con NSCLC era di 176.9; la mediana risultava di 180.0 nei pazienti con RCC, di 155.0 nei pazienti affetti da mM, di 120.0 nei pazienti con NSCLC. Analizzando l'andamento del livello della media di AEC dal basale alla comparsa della prima tossicità, si è osservato che in media al primo irAE c'è un aumento degli eosinofili per i pazienti con RCC e mM (Δ 140.1% e Δ 140.6% rispettivamente) e un decremento per i pazienti con NSCLC (Δ 79.1%).

	AEC basale (N°/ μ L)			
	tox G1-2		tox G3-4	
	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>
Rene (n=32)	153.1	155.0	330.0	275.0
	27 pz/32		5 pz/32	
Melanoma (n=43)	158.9	140.0	93.3	90.0
	40 pz/43		3 pz/43	
Polmone (n=39)	229.7	155.0	0.0	0.0
	38 pz/39		1 pz/39	
TOT (n=114)	181.9	150.0	300.0	200.0
	105 pz/114		9 pz/114	

Tabella 9. AEC basale e grado tossicità

	AEC (N°/µL) t=tox 1	
	Media	Mediana
Rene (n=32)	247.5	180.0
Melanoma (n=43)	217.0	155.0
Polmone (n=39)	176.9	120.0

Tabella 10. AEC a tempo di comparsa della prima tossicità

L'andamento temporale dei livelli di AEC ($t=0 \rightarrow t=tox 1$) è stato altresì studiato analizzando i singoli valori della conta eosinofila al basale e alla comparsa della prima tossicità per ciascun paziente. Riassumiamo in **Tabella 11** i risultati derivanti da tale analisi e condotti su tutti gli individui che avevano sviluppato almeno una tossicità: il trend di AEC risultava in aumento (\uparrow), in diminuzione (\downarrow), o rimaneva uguale ($=$) mostrando un livello di eosinofili periferici costante nel tempo. È risultato che su 114 pazienti che hanno sviluppato una tossicità, 55/114 (48.2%) mostravano un aumento di AEC nel tempo; 41/114 (36.0%) avevano il trend in diminuzione; 12/114 (10.5%) riportavano un andamento costante; mentre in 6 /114 (5.3%) non è stato determinato.

	Trend AEC (N°/ µL)		
	t=0 \rightarrow t=tox 1		
	\uparrow	\downarrow	=
TOT pz con irAEs (n=114)	55/114 (48.2%)	41/114 (36.0%)	12/114 (10.5%)
Rene (n=32)	17/32 (53.1%)	11/32 (34.4%)	1/32 (3.1%)
Melanoma (n=43)	25/43 (58.1%)	9/43 (20.9%)	6/43 (14.0%)
Polmone (n=39)	13/39 (33.3%)	21/39 (53.8%)	5/39 (12.8%)

Tabella 11. Trend AEC in pazienti con almeno una tossicità

L'andamento temporale di AEC è stato altresì correlato alla natura del primo irAE che occorreva in ogni paziente: in **Tabella 12** vengono riportati, per ciascuna neoplasia, il numero di pazienti che presentavano un trend di AEC in aumento/decremento e fra questi si specifica quanti avevano sviluppato, come prima

tossicità, un certo tipo di irAE, evidenziando se ne prevaleva una determinata tipologia. Nei pazienti che mostravano un trend in aumento è risultato che gli irAEs più frequenti sono stati: gli irAEs di tipo endocrino nel RCC manifestatesi in 4/17 pazienti (23.6%), le tossicità dermatologiche in 8 pazienti/25 (32.0%) affetti da mM e gli irAEs di tipo cutaneo in 5/13(38.4%) pazienti con NSCLC.

È stato, inoltre, eseguito una analisi di correlazione tra grading con cui si presentava la prima tossicità e trend di AEC (vedi **Tabella 13**): nel rene 27 pazienti/32 totali (84.3%) che hanno sviluppato almeno una tossicità presentavano irAEs di G1-2 e di questi 14/27 (51.9%) mostravano un andamento in aumento, 10/27 (37.0%) in discesa, 1/27 (3.7%) costante e 2/27 (7.4%) non determinabile, mentre i restanti 5/32 (15.6%) avevano sviluppato tossicità di G3-4 e fra questi pazienti 3/5 (60.0%) avevano un *trend* in aumento, 1/5 (20.0%) in diminuzione e 1/5 (20.0%) non determinabile. Nel mM, invece, 40 pazienti/43 totali (93.0%) con almeno una tossicità avevano irAEs di G1-2 e di questi 24/40 (60.0%) avevano un trend in aumento, 8/40 (20.0%) in diminuzione, 6/40 (15.0%) costante nel tempo e 2/40 (5.0%) sconosciuto, mentre i rimanenti 3 pazienti/43 (7.0%) avevano sviluppato irAEs G3-4 di cui 1 paziente/3 (33.3%) aveva un trend in aumento, 1/3 (33.3%) in discesa e 1/3 (33.3%) non è stato possibile determinarlo Infine, nel NSCLC 38 pazienti/39 (97.4%) avevano sviluppato tossicità mostravano irAEs di G1-2 e di questi 12/38 (31.6%) presentavano un trend in aumento, 21/38 (55.3%) un trend in calo e 5/38 (13.2%) uguale, mentre un solo paziente/39 (1.6%) aveva sviluppato irAEs di G3-4 come prima tossicità associata a trend di AEC in aumento.

Tipo di tossicità	Trend AEC (N°/ μ L) t=0 \rightarrow t=tox 1					
	Rene		Melanoma		Polmone	
	\uparrow (n=17)	\downarrow (n=11)	\uparrow (n=25)	\downarrow (n=9)	\uparrow (n=13)	\downarrow (n=21)
Endocrinologica	4/17 (23.6%)	6/11 (54.5%)	3/25 (12.0%)	1/9 (11.1%)	2/13 (15.4%)	5/21 (23.8%)
Epatogastroenterica	3/17 (17.6%)	1/11 (9.1%)	6/25 (24.0%)	3/9 (33.3%)	2/13 (15.4%)	5/21 (23.8%)
Dermatologica	3/17 (17.6%)	2/11 (18.2%)	8/25 (32.0%)	1/9 (11.1%)	5/13 (38.4%)	3/21 (14.4%)
Reumatologica	1/17 (5.9%)	1/11 (9.1%)	-	-	2/13 (15.4%)	-
Polmonare	2/17 (11.8%)	-	2/25 (8.0%)	1/9 (11.1%)	-	4/21 (19.0%)
Altro	4/17 (23.5%)	1/11 (9.1%)	6/25 (24.0%)	3/9 (33.3%)	2/13 (15.4%)	4/21 (19.0%)

Tabella 12. Trend AEC correlato al tipo di tossicità.

	Trend AEC (N°/ μ L) t=0 \rightarrow t=tox 1			
	tox G1-2		tox G3-4	
	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow
Rene	14/27 (51.9%)	10/27 (37.0%)	3/5 (60.0%)	1/5 (20.0%)
	27 pz/32		5 pz/32	
Melanoma	24/40 (60.0%)	8/40 (20.0%)	1/3 (33.3%)	1/3 (33.3%)
	40 pz/43		3 pz/43	
Polmone	12/38 (31.6%)	21/38 (55.3%)	1/1 (100.0%)	0
	38 pz/39		1 pz/39	

Tabella 13. Trend AEC correlato a tox G1-2 e G3-4.

Al fine di investigare se esistesse una possibile correlazione fra il livello di eosinofili basale e una maggiore probabilità di sviluppare irAEs è stata effettuata un'analisi di contingenza con il test X^2 . I pazienti di ciascuna coorte sono stati divisi in due gruppi sulla base del cut off del livello di conta eosinofila proposto da Martens et al.

nel 2016⁶⁶: pazienti con livello basale di AEC <50 cellule/ μ L (gruppo 1) e pazienti con livello basale di AEC >50 cellule/ μ L (gruppo 2). Nella coorte dei pazienti con RCC è stato possibile determinare il valore basale di AEC in 39 pazienti/43: di questi 6 (15.4%) appartenevano al gruppo 1 e 33 (84.6%) al gruppo 2. Nel primo gruppo 1 paziente/6 (16.7%) non ha sviluppato tossicità e 5/6 (83.3%) avevano manifestato irAEs; nel secondo 8 pazienti/33 (24.2%) non avevano tossicità, mentre 25/33 (75.8%) avevano irAEs. Tuttavia, nessuna correlazione è risultata statisticamente significativa (X^2 0.164, df 1, $p=0.685$). Nella coorte dei pazienti affetti da mM è stato possibile determinare il valore basale di AEC in 60 pazienti/62: di questi 13 (21.7%) appartenevano al gruppo 1 e 47 (78.3%) al gruppo 2. Nel primo gruppo 5 pazienti/13 (38.5%) non avevano sviluppato irAEs e 8/13 (61.5%) avevano manifestato irAEs; nel secondo 13 pazienti/47 (27.7%) non avevano tossicità, mentre 34/47 (72.3%) avevano irAEs. Anche in questo caso, nessuna correlazione è risultata statisticamente significativa (X^2 0.566, df 1, $p=0.452$). Nella coorte dei pazienti con NSCLC, infine, è stato possibile determinare il valore basale di AEC in 64 pazienti/67: di questi 15 (23.4%) appartenevano al gruppo 1 e 49 (76.6%) al gruppo 2. Nel primo gruppo 9 pazienti/15 (60.0%) non avevano sviluppato eventi e 6/15 (40.0%) avevano manifestato irAEs; nel gruppo 2, 16 pazienti/49 (32.7%) non avevano registrato eventi, mentre 33/49 (67.3%) avevano irAEs. Questa correlazione è stata l'unica che si avvicinava alla significatività statistica (X^2 3.61, df 1, $p=0.057$).

Nel dettaglio delle varie tossicità (**Tabella 14**) è stata indagata una possibile correlazione tra livelli basali non aumentati <50 cellule/ μ L (gruppo 1) e aumentati >50 cellule/ μ L (gruppo 2) della conta eosinofila periferica e lo sviluppo di una determinata tipologia di irAE. Nei pazienti con tumore renale è stato possibile determinare il valore basale di AEC in 30 pazienti su 32 che avevano sviluppato irAE: alla comparsa di irAEs endocrini 3 pazienti/11 (18.2%) appartenevano al gruppo 1 e 8/11 (81.8%) al gruppo 2, ma la correlazione non è stata statisticamente significativa (X^2 1.41, df 1, $p=0.236$); alla comparsa di irAEs epato-gastrointestinali tutti e 4 i pazienti che avevano sviluppato questa come prima tossicità appartenevano al secondo gruppo, ma la correlazione non è risultata statisticamente significativa (X^2 0.923, df 1, $p=0.337$); alla comparsa di irAEs cutanei tutti e 5 i pazienti con questi come primo irAE appartenevano al gruppo 2, con una associazione non statisticamente significativa (X^2 1.20, df 1, $p=0.273$); alla comparsa di tossicità reumatologiche tutti e 2 i pazienti con questa tipologia come primo irAE appartenevano al gruppo 2, ma la correlazione non è statisticamente significativa (X^2

0.429, df 1, p=0.513); infine alla comparsa di irAEs polmonari tutti e 3 i pazienti appartenevano al gruppo 2, ma la correlazione non è risultata essere significativa (X^2 0.667, df 1, p=0.414).

Nei pazienti affetti da melanoma è stato possibile determinare il valore basale di AEC in 32/33 che sviluppavano tossicità: alla comparsa di irAEs endocrini 1 paziente/5 (20.0%) appartenevano al gruppo 1 e 4/5 (80.0%) al gruppo 2, ma la correlazione non è risultata essere statisticamente significativa (X^2 0.00334, df 1, p=0.954); alla comparsa di irAEs epato-gastrointestinali 3 pazienti/12 (25.0%) appartenevano al primo gruppo e 9/12 (75.0%) al gruppo 2, senza correlazione statisticamente significativa (X^2 0.386, df 1, p=0.534); alla comparsa di irAEs cutanei 1 paziente/10 (10.0%) apparteneva al gruppo 1 e 9/10 (90.0%) al gruppo 2, con associazione non statisticamente significativa (X^2 0.697, df 1, p=0.404); alla comparsa di tossicità reumatologiche 1 paziente/2 (50.0%) apparteneva al primo gruppo e l'altro paziente al secondo, senza correlazione significativa (X^2 1.30, df 1, p=0.253); infine alla comparsa di irAEs polmonari tutti e 3 i pazienti appartenevano al gruppo 2, senza correlazione significativa (X^2 0.760, df 1, p=0.383).

Nei pazienti con NSCLC è stato possibile determinare il valore basale di AEC in tutti i pazienti che sviluppavano tossicità: alla comparsa di irAEs endocrini tutti e 7 i pazienti con questi come prima tossicità appartenevano al gruppo 2, senza relazione statisticamente significativa (X^2 1.55, df 1, p=0.213); alla comparsa di irAEs epato-gastrointestinali tutti e 7 i pazienti che avevano sviluppato questa come prima tossicità appartenevano al secondo gruppo, correlata non in maniera statisticamente significativa (X^2 1.55, df 1, p=0.213); alla comparsa di irAEs cutanei 2 pazienti/8 (25.0%) apparteneva al gruppo 1 e 6/8 (75.0%) al gruppo 2, senza correlazione (X^2 0.715, df 1, p=0.398); alla comparsa di tossicità reumatologiche 2 pazienti (66.7%) apparteneva al gruppo 1 e 1/3 (33.3%) al gruppo 2, e questa è stata l'unica correlazione statisticamente significativa (X^2 6.57, df 1, p=0.010), limitatamente all'esiguo numero del campione; infine alla comparsa di irAEs polmonari tutti e 4 i pazienti appartenevano al gruppo 2, ma la correlazione non è stata significativa (X^2 0.810, df 1, p=0.368).

Tabella 14. Analisi di contingenza delle varie tossicità

Variabili analizzate		X ²	df	p
gruppo 1	irAEs endocrinologici (3 pz/11)	1.41	1	0.236
	irAEs epato-gastroenterici (0 pz/4)	0.923	1	0.337
	irAEs dermatologici (0 pz/5)	1.20	1	0.273
	irAEs reumatologici (0 pz/2)	0.429	1	0.513
	irAEs polmonari (0 pz/3)	0.667	1	0.414
gruppo 2	irAEs endocrinologici (8 pz/11)	1.41	1	0.236
	irAEs epato-gastroenterici (4 pz/4)	0.923	1	0.337
	irAEs dermatologici (5 pz/5)	1.20	1	0.273
	irAEs reumatologici (2 pz/2)	0.429	1	0.513
	irAEs polmonari (3 pz/3)	0.667	1	0.414

Rene. Gruppo 1: AEC <50/μL; gruppo 2: AEC>50/μL.

Variabili analizzate		X ²	df	p
gruppo 1	irAEs endocrinologici (1 pz/5)	0.00334	1	0.954
	irAEs epato-gastroenterici (3 pz/12)	0.386	1	0.534
	irAEs dermatologici (1 pz/10)	0.697	1	0.404
	irAEs reumatologici (1 pz/2)	1.30	1	0.253
	irAEs polmonari (0 pz/3)	0.760	1	0.383
gruppo 2	irAEs endocrinologici (4 pz/5)	0.00334	1	0.954
	irAEs epato-gastroenterici (9 pz/12)	0.386	1	0.534
	irAEs dermatologici (9 pz/10)	0.697	1	0.404
	irAEs reumatologici (1 pz/2)	1.30	1	0.253
	irAEs polmonari (3 pz/3)	0.760	1	0.383

Melanoma. Gruppo 1: AEC <50/μL; gruppo 2: AEC>50/μL.

Variabili analizzate		X ²	df	p
gruppo 1	irAEs endocrinologici (0 pz/7)	1.55	1	0.213
	irAEs epato-gastroenterici (0 pz/7)	1.55	1	0.213
	irAEs dermatologici (2 pz/8)	0.715	1	0.398
	irAEs polmonari (0 pz/4)	0.810	1	0.368
	irAEs reumatologici (2 pz/3)	6.57	1	0.010
gruppo 2	irAEs endocrinologici (7 pz/7)	1.55	1	0.213
	irAEs epato-gastroenterici (7 pz/7)	1.55	1	0.213
	irAEs dermatologici (6 pz/8)	0.715	1	0.398
	irAEs polmonari (4 pz/4)	0.810	1	0.368
	irAEs reumatologici (1 pz/3)	6.57	1	0.010

Polmone. Gruppo 1: AEC <50/μL; gruppo 2: AEC>50/μL.

Alla comparsa del primo irAE in media è stato osservato a partire dal valore basale un aumento degli eosinofili nel RCC (Δ 140.1%) e mM (Δ 140.6%), mentre un decremento nel NSCLC (Δ 79.1%). L'analisi di contingenza con il test ha evidenziato che nei pazienti con NSCLC esiste una correlazione tra livelli basale di AEC >50/μL e lo sviluppo di irAEs: il 67.3% dei pazienti che ha un livello di eosinofili >50/μL sviluppa infatti un irAE (p=0.05) e la conta eosinofila basale >50 è significativamente associata allo sviluppo di irAEs reumatologici (p=0.010).

4.1.3 Associazione tra AEC e irAEs

Per confermare la correlazione tra i valori di AEC basale e il rischio di tossicità per pazienti trattati con ICIs, è stato sviluppato un modello di analisi di covarianza, con due tipologie di variabili (età e AEC basale), un termine quadratico (AEC basale), tre fattori (trattamento, sito del tumore e tossicità) e un'interazione (tra età e trattamento). Così come descritto dalla formula in Figura 4, in base alla relazione che esiste tra le variabili, il termine quadratico, i tre fattori e l'interazione tra età e trattamento, è possibile ricavare un valore di previsione (y_0), che ci permette di stimare in maniera accurata la presenza e il numero di tossicità previste (catalogate per sede e trattamento). Affinchè il modello generale proposto possa essere valido, sono stati omessi i fattori e le variabili

non significativi, andandone a valutare singolarmente i p-value. Una variabile o un fattore risultano significativi se i rispettivi p-value, calcolati in base ai test t ed F, assumono valori il più vicino possibile a 0. Come è possibile stimare dai test F di significatività con i rispettivi p-value descritti in tabella 8, il modello matematico proposto, si adatta bene alla successione dei singoli dati; per questo motivo è possibile spiegare in maniera precisa l'andamento del fenomeno oggetto di studio ed ottenere previsioni attendibili del numero di tossicità in funzione dell'AEC basale, suddividendole per sede e trattamento.

Fonte di varianza	Df	Sum Sq	Mean Sq	F-valore	P- value
Variabile X1= età	1	5,7040	5,70400\	7,177439	0,00819033
Variabile X2= AEC basale	1	1,1600	1,6000000	1,459648	0,22885028
Termine Quadratico X2	1	6,8610	6,861000	8,633312	0,00381220
Fattore P = sede	2	6,6530	3,326500	4,185791	0,00154665
Fattore T= trattamento	4	14,6320	3,658000	4,602923	0,00154665
Fattore A = tossicità	1	129,1830	129,183000	162,553141	0,00000000
Interazione tra X 1 e T	4	12,1910	3,047750	3,835035	0,00533404
Errore	153	121,5910	0,794712		

Tabella15. ANOVA relativa a Modello di Analisi e covarianza. Df: forma della distribuzione. Sum Sq: somma degli scarti quadratici, Mean Sq: media degli scarti quadratici

In conclusione, è stato attuato un processo di validazione esterna del modello, per dimostrare come esso possa funzionare anche all'esterno dello studio, andando ad esaminare la “performance predittiva” di quest’ultimo. Per fare una validazione esterna, c’è bisogno di “nuovi” dati che non sono stati esaminati all’interno dello studio: in questo caso, il modello matematico sviluppato è stato utilizzato all’interno di una coorte indipendente di pazienti oncologici (n = 43) trattati con ICIs; 13 (30,2%) presso l'Oncologia Medica dell'Ospedale Universitario di Pisa con mM, e 30 presso l'Unità di Oncologia Traslazionale dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, di cui 21 (48,8%) con mNSCLC e 9 (21,0%) con mRCC. Utilizzando la formula matematica del modello descritta in Figura 3, il valore di previsione, calcolato in base ai dati dei singoli pazienti, concordava con le tossicità sviluppate effettivamente per ogni paziente. Confrontando, quindi, i dati previsti con quelli reali, è stato possibile valutare l'accuratezza e l'affidabilità del modello predittivo.

Questi risultati sono stati oggetto di pubblicazione nell' agosto 2021 nella rivista *Immuno*, vol 1, issue 3 2021, sezione speciale *Cancer Immunology and Immunotherapy* 67.

4.1.4 Associazione tra irAEs e outcome nel mRCC

Relativamente alla coorte di pazienti con RCC trattati con nivolumab, ipilimumab o con l'associazione dei due ICIs, l'istologia più frequente era il carcinoma a cellule chiare (83.7%), seguita dalla forma papillare o carcinoma a cellule cromofobe. La maggior parte dei pazienti aveva ricevuto la resezione del tumore primitivo (n = 39/43, 91%). Sede di metastatizzazioni più frequenti erano polmone (65%), linfonodi (44%) osso (35%) fegato (21%) e cervello (7%). Globalmente 33 pazienti (76,7%) hanno ricevuto nivolumab, mentre 10 (23,7%) hanno ricevuto la doppietta. Dieci pazienti (23,2%) sono stati trattati in prima linea, e 25 (58,1%) in seconda linea di trattamento. Globalmente è stata ottenuta 1 RC (2,3%), 6 PR (13,9%), 11 SD (25,6%) , mentre 25 pazienti hanno sperimentato una PD (58,1). Tra i pazienti Dei pazienti che hanno sperimentato tossicità, 39 (67,4%) hanno riportato 7 diversi tipi di tossicità come riportato in **tabella 16**.

	Nivolumab		Nivolumab + Ipilimumab		Totale	
	N	%	n	%	n	%
Polmonite	3	9,1%	0	0,0%	5	6,9%
Colite	5	15,1%	0	0,0%	5	11,6%
Epatite	4	12,1%	3	30,0%	7	16,3%
Tossicità cutanea	8	24,2%	1	10,0%	9	20,9%
Nefrite	0	0,0%	1	10,0%	1	2,3%
Artralgia /mialgia	4	12,1%	0	0,0%	4	9,3%
Eventi endocrini	14	42,4%	6	60,0%	20	46,5%

Tab.16: tipo di irAEs per ICI

Le caratteristiche cliniche dei pazienti che hanno sperimentato irAEs non differivano da quelli senza tossicità. La mediana di sviluppo di tossicità è stata 59 giorni dall'inizio della terapia. Le tossicità registrate sono state prevalentemente di grado 1 e 2 (irAEs non seri), ovvero in 19 pazienti (65,5%), mentre 10 pazienti hanno sviluppato un evento serio grado 3 o 4 (34,5%). Se consideriamo il numero totale di eventi osservati (n = 49), 12 irAEs sono stati seri (24.5%), mentre 37 sono stati classificati come non seri (75.5%). Nei pazienti trattati in monoterapia con nivolumab (n=33), 3 (9%) hanno sviluppato polmonite, 5 (15,1%) diarrea, 4 (12,1%) epatite, 8(24,4%) tossicità cutanea, 4

(12,1%) artralgia/mialgia e 14 (42,4%) eventi endocrini. Nella coorte di combinazione (n = 10), 3(30%) pazienti hanno sviluppato epatite, solo 1 (10%) reazione cutanea, mentre 6 (60%) hanno avuto eventi endocrini, and 1 (10%) ha sviluppato una nefrite. Non ci sono differenze statisticamente significative nel rischio di sviluppo di irAE tra la mono e la terapia di combinazione (p = 0.84). Globalmente, le tossicità endocrine sono state le più prevalenti, (46% dei pz con 19 eventi), e rappresentano il 40% di tutte le tossicità. Esse hanno un tempo di onset mediano di circa 80 gg dall'inizio della terapia. Prevalentemente si tratta di disfunzioni tiroidee (n = 15/19), seguite da ipofisiti e iperglicemia. Otto pazienti hanno sperimentato una tireotossicosi seguita da ipotiroidismo permanente residuale.

Riguardo la relazione tra sviluppo dell'evento avverso e i parametri di outcome, la PFS è stata significativamente più lunga nei pazienti che hanno sperimentato disfunzione tiroidea (p = 0.028): la PFS mediana della popolazione rimasta eutiroidea è stata 121 giorni (IQR 92–305.) mentre quella della popolazione con disfunzione tiroidea non è stata raggiunta (**Figura 5**).

Alla multivariata, lo sviluppo di tossicità tiroidea è risultata fattore prognostico indipendente di PFS (HR: 0.34 [95% CI 0.13–0.87] p = 0.025) (**Tabella 17**).

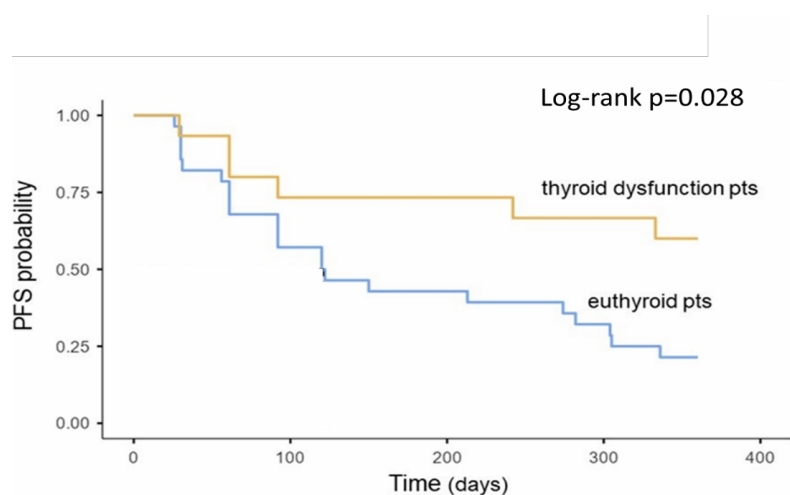


Fig. 5. PFS correlata allo sviluppo di tossicità tiroidea

Characteristics	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	HR (95%CI)	p-Value	HR (95%CI)	p-Value
Age, years (≥ 65)	1.41 (0.66–2.99)	0.373	-	
Gender (female)	0.91 (0.34–2.39)	0.842	-	
Smoking history (current or former)	1.20 (0.57–2.54)	0.625	-	
Histopathology (clear cells)	2.22 (0.88–5.58)	0.089	2.09 (0.72–6.02)	0.173
Skin toxicity (present)	0.33 (0.11–0.95)	0.041	0.36 (0.12–1.06)	0.065
Thyroid dysfunction (present)	0.36 (0.15–0.89)	0.028	0.34 (0.13–0.87)	0.025
Number of irAEs (≥ 2)	0.33 (0.13–0.81)	0.016	0.32 (0.13–0.79)	0.014

HR = hazard ratio; CI = confidence interval; irAEs = immune-related adverse events.

Tab 17. Analisi uni e multivariate per PFS

D'altro canto, l'ipofisite, seppur veramente rara, è correlata a PFS più breve ($p = 0.048$). Le tossicità endocrine sono risultate significativamente più frequenti nei pazienti pretrattati ($p = 0.022$). Una PFS più lunga è stata registrata anche tra i pazienti con tossicità cutanea rispetto a quelli senza tossicità cutanea ($p = 0.41$): la mPFS dei pazienti senza tossicità cutanea è stata infatti di 120 giorni (61-336) vs mediana non raggiunta in quelli con tale tossicità (**Figura 6**).

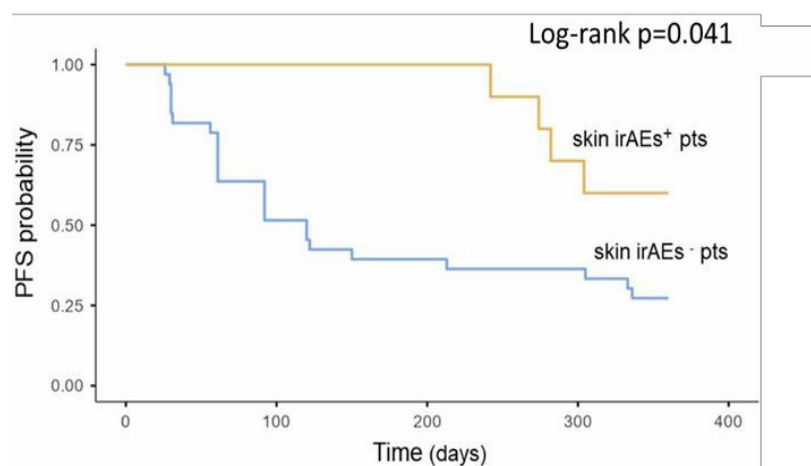


Fig. 6. PFS correlata allo sviluppo di tossicità cutanea

Inoltre, la PFS è stata significativamente più lunga nei pazienti che hanno sviluppato due o più irAEs rispetto a chi ne ha sviluppato uno o nessuno ($p = 0.016$). Alla multivariata, lo sviluppo di due o più irAEs è risultato fattore prognostico indipendente di PFS PFS (HR: 0.32 [95% CI 0.13–0.79] $p = 0.014$). Età, sesso, abitudine tabagica, sottotipo istologico non sono associati con la PFS.

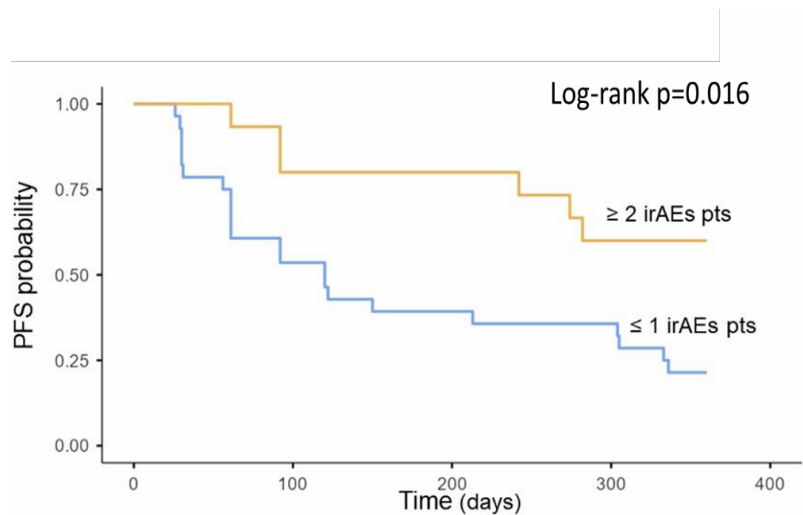


Fig. 7. PFS correlata al numero di irAEs

In aggiunta, è stata eseguita una analisi complementare con un cut off a 16 settimane, tempo al quale i pazienti con più lunga PFS potevano avere maggior probabilità di sviluppare un irAE, per limitare i bias di analisi. L'analisi a 16 settimane ha confermato che lo sviluppo di irAEs è associato con un prolungamento della PFS nei pazienti con tossicità cutanea e in quelli con due o più eventi avversi (PFS: NR vs. 120 giorni, $p = 0.005$ and PFS: NR vs. 120 giorni, $p = 0.029$, rispettivamente). Ciò non è stato confermato per la tossicità tiroidea, seppur con un trend nello stesso senso ($p = 0.160$).

Tali risultati sono stati pubblicati nella rivista *Cancers* ⁶⁸.

4.1.5 Impatto dell'utilizzo dei corticosteroidi sull'outcome dei pazienti trattati con ICIs

E' stata successivamente condotta una ulteriore analisi di real world su un sottogruppo di 146 pazienti (67 NSCLC, 46 mM, 33 RCC) trattati in monoterapia con avelumab, pembrolizumab o nivolumab che avevano ricevuto corticosteroidi (CCS) per il trattamento di irAE, per investigare l'impatto in termini di PFS dell'uso dei CCS sull'efficacia del trattamento.

Globalmente sono stati trattati con CCS 41 pazienti per irAES, nel 24% dei casi di grado 3-4. Gli AEs trattati con CCS sono stati polmonite (19,5%), reazioni cutanee (22%), eventi endocrini (22%), coliti (22%), eventi reumatologici (12,2%), epatite (2,4%). Il 39% dei pazienti ha ricevuto una dose cumulativa di prednisone o equivalenti maggiore di 500 mg, e il 49% dei pazienti ha dovuto prolungare il trattamento con CCS

oltre i 14 gg. Non c'era differenza statisticamente significativa nella necessità di trattamento con CCS tra diverse istologie ($p = 0.192$) o differenti ICI ($p = 0.671$).

L'analisi di correlazione tra PFS ed utilizzo di steroidi ha evidenziato che il trattamento precoce con steroidi (entro 30 giorni dall'inizio della terapia con ICI) non è correlato a una pFS più breve ($p = 0.077$). Di contro, i pazienti trattati con CCS dopo i primi 30 gg dall'inizio dell'immunoterapia avevano una PFS significativamente più lunga ($p = 0.017$) **Figura 8**. All'analisi multivariata il trattamento con CCS dopo 30 gg è risultato essere un fattore prognostico indipendente per PFS (HR: 0.59 [95% CI 0.36–0.97], $p = 0.037$).

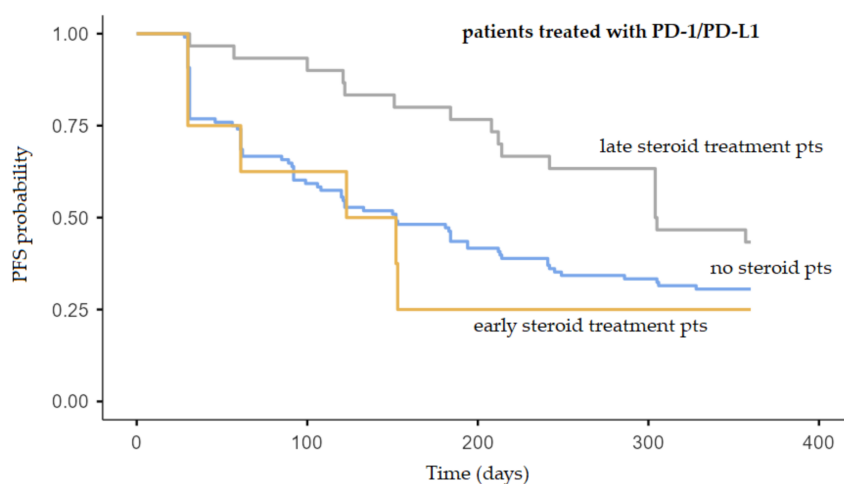


Fig. 8 PFS dei pazienti trattati con steroidi in fase early o late

Questi dati, seppur preliminari, sfaterebbero il mito dell'impatto detrimentalmente dell'uso di CCS in corso di immunoterapia.

I risultati di questa analisi sono stati pubblicati dal nostro gruppo sulla rivista *Molecules* nel 2021⁶⁹.

4.2 Coorte retrospettivo-prospettica NSCLC

Dall'inizio della raccolta dati a ottobre 2020 abbiamo arruolato 158 pazienti affetti da NSCLC trattati con ICI in monoterapia (prima linea o linee successive).

Scopo di questa analisi è stato quello di valutare prospetticamente il ruolo di AEC come fattore predittivo di risposta e di sviluppo di tossicità immunorelata in una casistica omogenea di pazienti NSCLC.

Le caratteristiche dei pazienti sono riportate in **Tabella 18**.

La mediana di età alla diagnosi è stata di 70 anni (range 41-83 anni) , 102 pazienti erano maschi (64,6%) e 56 femmine (35,4%), la maggior parte di questi (91.1%) era fumatore (56,3% pregresso and 34,8% fumatore attivo) mentre 14 pazienti (8,9%) non avevano mai fumato. La maggior parte dei pazienti (84.8%) aveva un PS ECOG \leq 1. Tutti i pazienti sono stati trattati con un inibitore di PD1 o di PDL1 in monoterapia, in prima linea in 71 pazienti (44,9%) in seconda o successive linee in 87 pazienti (55.1%). Sono stati utilizzati pembrolizumab e nivolumab, rispettivamente in 72 (45,6%) and 68 (43,0%) pazienti, mentre atezolizumab è stato utilizzato in 18 pazienti (11,4%). E' stato testato come da pratica clinica corrente il livello di espressione di PD-L1 che è risultato: 0% in 24 pazienti (15,2%), 1- 49% in 18 pazienti (11,4%), \geq 50% in 73 casi (46,2%), mentre non abbiamo il dato per 43 pazienti (27,2%).

Patients(n= 158)	
Age	
Median (range)- years	70 (41-83)
Sex- no. (%)	
Male	102 (64.6)
Female	56 (35.4)
Smoking Status- no. (%)	
Never	14 (8.9)
Current	55 (34.8)
Former	89 (56.3)
ECOG Performance Status- no. (%)	
0	47 (29.7)
1	87 (55.1)
2	24 (15.2)
Histology- no. (%)	
Adenocarcinoma	104 (65.8)
Squamous Cell Carcinoma	46 (29.1)
NOS Carcinoma	8 (5.1)
PD-L1 tumor proportion score- no. (%)	
< 1%	24 (15.2)
1-49%	18 (11.4)
> 50%	73 (46.2)
Not available	43 (27.2)
Baseline Eosinophil Count- no. (%)	
< 130 /mcl	76 (48.1)
> 130 /mcl	82 (51.9)
Type of ICI treatment- no. (%)	
Pembrolizumab	72 (45.6)
Nivolumab	68 (43.0)
Atezolizumab	18 (11.4)
Line of treatment- no. (%)	
1 st line	71 (44.9)
>2 nd line	87 (55.1)
Best response to treatment- no. (%)	
Complete Response	6 (3.8)
Partial Response	30 (18.9)
Stable Disease	41 (25.9)
Progression Disease	78 (49.4)

Tab. 18. Caratteristiche dei pazienti

Globalmente, 6 pazienti hanno ottenuto una CR (3,8%), 30 una PR (18,9%) 41 una SD (25,9%) mentre 78 hanno registrato una PD come risposta migliore al trattamento (49,4%). Per tre pazienti non è stata eseguita la valutazione della risposta, in quanto hanno discontinuato il trattamento per AE serio.

Abbiamo considerato 130 cellule/ μL come cut-off empirico per la AEC, che corrispondeva alla AEC mediana al baseline. I pazienti sono stati divisi in due gruppi: quelli con bassa o alta AEC in accordi con il cut-off individuato. E' emersa una associazione statisticamente significativa tra una alta AEC e l'espressione di PD-L1 $\geq 50\%$ ($p=0.018$), mentre non è stata evidenziata correlazione statisticamente significativa tra un'alta AEC e altre caratteristiche clinico-patologiche come l'età, il sesso, l'abitudine tabagica, l'ECOG PS e il tipo istologico (**Fig.9**).

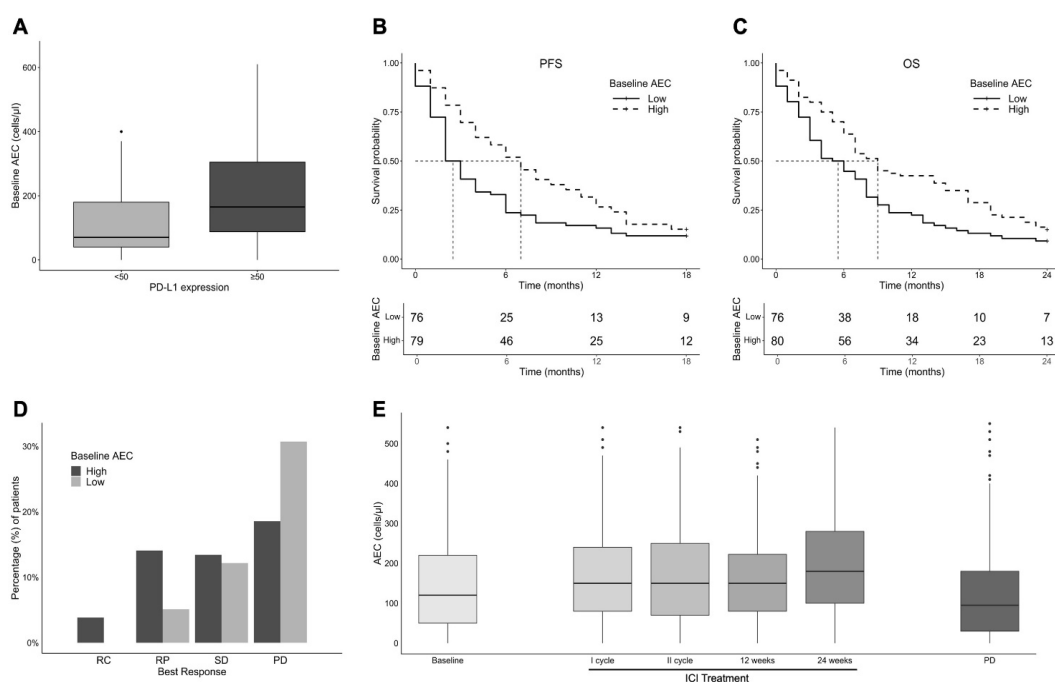


Figura 9. Associazione tra AEC basale e l'espressione di PDL-1 $> 50\%$ (n:158) (A). Considerando High group: AEC $\geq 130/\mu\text{L}$ e low group: AEC $< 130/\mu\text{L}$. PFS nei gruppi high AEC vs low AEC (B). OS dei gruppi high- vs low-AEC (C). Associazione tra AEC e la best response alla terapia (D). Trend longitudinale di AEC durante il trattamento (E).

Nella popolazione in studio la mPFS e la mOS sono risultate 4 (95% CI 3.0-6.0) e 7 mesi (95% CI 6.0-8.0), rispettivamente. I pazienti con un AEC al baseline $\geq 130/\mu\text{L}$ hanno ottenuto una PFS statisticamente più lunga rispetto a quelli con AEC $< 130/\mu\text{L}$ (mPFS = 7 mesi, 95% CI 5.0-10.0 versus 2.5 mesi 95% CI 2.0-4.0; $p=0,007$) (**Figura 9B**). Inoltre, è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa in mOS tra il

gruppo con AEC alto e il gruppo con AEC basso (mOS = 9.0 mesi, CI 95% 7.0-15.0 vs 5.5 mesi, 95% CI 4.0-8.0; p=0.009) (**Figura 9C**).

Globalmente la risposta globale ORR è stata del 22, 8%, e il Disease Control Rate (DCR) 48,7%. I nostri risultati dimostrano dunque una associazione significativa tra livelli basali di AEC alti e miglior risposta al trattamento (p<0.001). Nel dettaglio, una risposta radiologica alla immunoterapia è stata registrata nel 64,4% dei pazienti con AEC basale $\geq 130/\mu\text{L}$ e nel 35,5% dei pazienti con AEC basale bassa (p=0.009) (**Figura 9D**).

Considerando il trend longitudinale dell'AEC durante il trattamento, misurando il valore della conta anche dopo la prima e la seconda somministrazione degli ICIs, alla 12ma e alla 24ma settimana di terapia e alla progressione. Comparando l'andamento al valore basale, si osserva un incremento significativo tra la prima e la seconda somministrazione (mAEC = $150/\mu\text{L}$ vs $130/\mu\text{L}$ dopo ciclo I, p=0.004; mAEC = $160/\mu\text{L}$ vs $130/\mu\text{L}$ dopo CII, p=0.016, rispettivamente). I valori mediani di AEC alla settimana 12 and 24 sono stati $160/\mu\text{L}$ e $185/\mu\text{L}$, senza significativa variazione rispetto al baseline, mentre un trend in decremento è stato osservato alla progressione ($110/\mu\text{L}$, p=0.756) (**Figura 9E**).

Le tossicità registrate nella popolazione sono risultate attese: in particolare sono state registrati irAEs in 69 pazienti (43.7%), che hanno sperimentato almeno un evento. Il tipo di tossicità registrata e il corrispondente valore di AEC allo sviluppo dell'evento sono così distribuite: irAE endocrino in 21 soggetti (13,3%) con mAEC = $160/\mu\text{L}$; evento gastrointestinale in 13 pazienti (8,2%), con mAEC = $125/\mu\text{L}$; tossicità epatica in 16 pazienti (10,1%), con mAEC = $215/\mu\text{L}$; eventi dermatologici in 30 pazienti (18,9%), con mAEC = $145/\mu\text{L}$; eventi reumatologici in 10 pazienti (6,3%), con mAEC = $185/\mu\text{L}$; polmonite in 12 pazienti (7,6%), con mAEC = $80/\mu\text{L}$. Eventi avversi di grado 3 e 4 sono riportati in 13 pazienti (8, 2%) e l'evento serio più comune è risultato la tossicità polmonare (n=7, 4,4%). Non abbiamo registrato morti tossiche (**Figura 10A e 10B**).

Non è stato evidenziato un aumento significativo del rischio di sviluppo di irAE durante il trattamento nei pazienti con alto livello basale di AEC rispetto ai pazienti con bassa conta al basale (p=0.133).

Globalmente, anche questa nostra analisi evidenzia che la PFS e la OS sono migliori nei pazienti che sperimentano un irAE rispetto a quelli senza tossicità: infatti, la mPFS è stata di 8 mesi (CI 95% 7.0-12.0) vs 2.0 mesi (CI 95% 2.0-3.0) (p<0.001) e la mOS di 13.0 mesi (CI 95% 9.0-19.0) vs 4.0 mesi (CI 95% 3.0-6.0) (p<0.001), rispettivamente (**Figura 10C e 10D**). In accordo a questi risultati, una PFS migliore in

maniera statisticamente significativa è stata evidenziata nei pazienti con tossicità polmonari ($p<0.01$), endocrine ($p=0.006$) e dermatologiche ($p<0.001$) rispetto a quelli senza tossicità. Un trend non statisticamente significativo per una migliore PFS è comunque evidenziato nei pazienti con tossicità epatica ($p=0.180$). Inoltre, un miglioramento significativo dei tassi di risposta ad ICI è stato riscontrato nei pazienti che sviluppavano un irAE: in particolare, ORR e DCR sono state 33.8% vs 14.9% e 72.0% vs 32.1%, rispettivamente, tra il gruppo di pazienti con tossicità rispetto a chi non sviluppava tossicità ($p<0.001$).

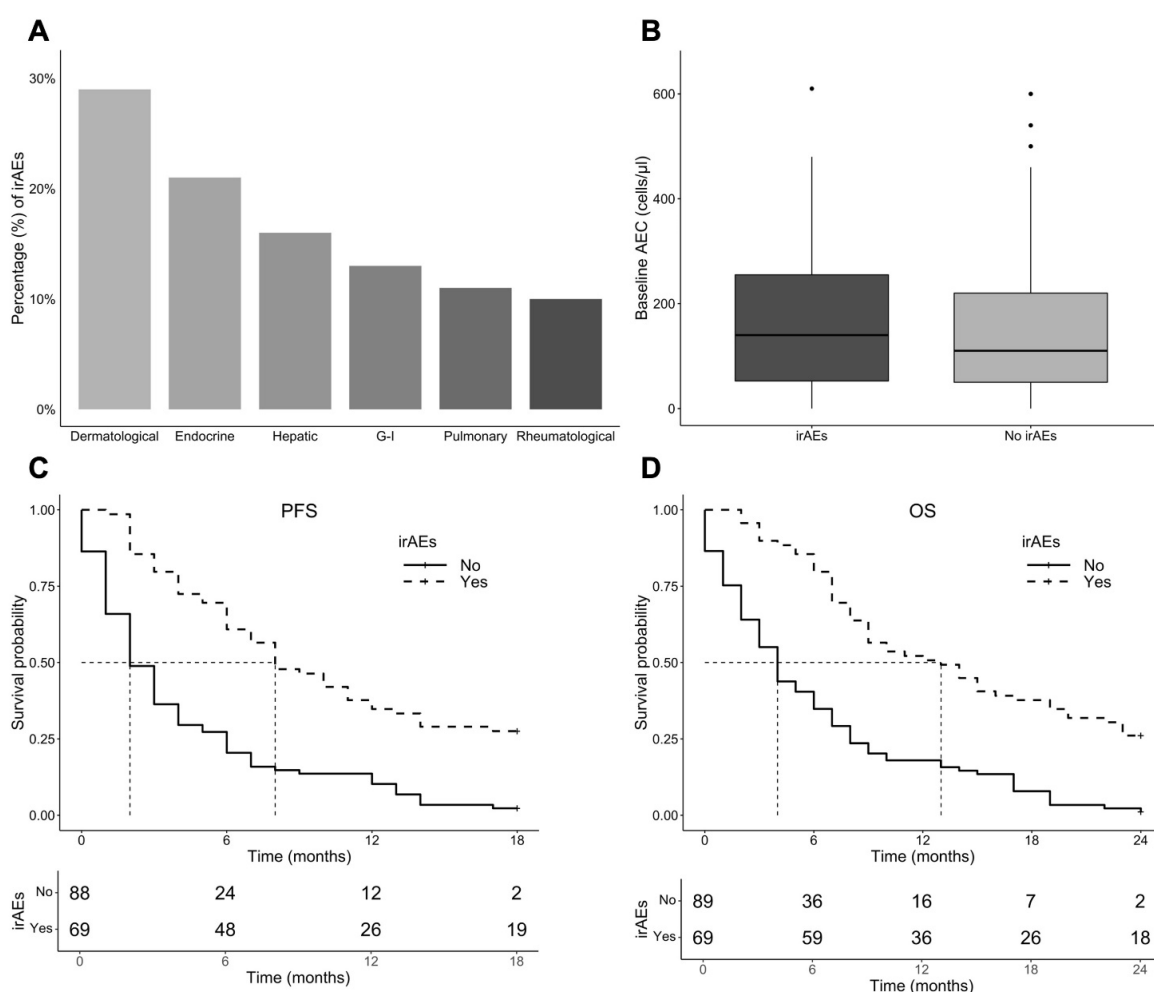


Figura 10 Tipo e percentuale di irAEs riportati nella popolazione in studio NSCLC (A). Associazione tra AEC basale e irAEs durante il trattamento (B); PFS (C) e OS (D) nei pazienti con tossicità rispetto a quelli senza tossicità.

Sono state successivamente condotte le analisi uni e multivariata per stabilire la relazione tra fattori clinico-patologici e biomolecolari e PFS e OS (Tabelle 19 e 20).

Alla analisi univariata, il gruppo con AEC basale alta aveva PFS e OS significativamente migliori rispetto al gruppo con AEC bassa (PFS HR = 1.70, CI 95% 1.12-2.58, $p=0.012$; OS HR = 1.56, CI 95% 1.11-2.18, $p=0.010$). Inoltre, è stato riscontrato un impatto positivo significativo in OS e PFS alla multivariata sia dello

sviluppo di irAEs (PFS HR = 0.36, CI 95% 0.23-0.55, p<0.001; OS HR = 0.31, CI 95% CI 0.22-0.45, p<0.001) che di un PS ECOG ≤ 1 (HR 3.04 CI 95% 1.55-5.99, p=0.001). Alla multivariata, aggiustata per fattori confondenti, condotta per identificare i fattori prognostici indipendenti correlati agli outcomes di sopravvivenza, l'AEC alta era associata con PFS e OS migliori (PFS HR = 1.77, CI 95% 1.10-2.86, p=0.019; OS HR 1.46, CI 95% 1.02-2.10, p=0.040). I pazienti che sviluppavano un irAE tendevano ad avere un beneficio in termini di OS (HR = 0.51, CI 95% 0.30-0.86, p=0.011), ma non un miglioramento statisticamente significativo in PFS. La tossicità polmonare era associata con PFS e OS migliori (PFS HR = 0.23, CI 95% 0.07-0.79, p=0.019. OS HR = 0.37, CI 95% 0.16-0.85, p=0.019). Anche un PS ECOG ≤ 1 è risultato essere un fattore prognostico indipendente di migliori outcomes di sopravvivenza.

Tabella 19 analisi uni e multivariate dei fattori relati a PFS

Variables	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	<i>p-value</i>	HR (95% CI)	<i>p-value</i>
Gender (male vs female)	1.27 (0.89 - 1.80)	0.180		
ECOG PS:				
0	-	-	-	-
1	1.80 (1.08 - 3.01)	0.024	2.19 (1.24 - 3.84)	0.007
2	3.04 (1.55 - 5.99)	0.001	2.62 (1.20 - 5.72)	0.016
Smoking status:				
Never	-	-	-	-
Former	0.30 (0.12 - 0.73)	0.008	0.50 (0.19 - 1.33)	0.167
Current	0.30 (0.12 - 0.73)	0.008	0.50 (0.20 - 1.24)	0.133
Histology (squamous vs non-squamous)	1.08 (0.76 - 1.54)	0.663		
PD-L1 expression (<50% vs ≥50%)	0.57 (0.38 - 0.86)	0.007	0.54 (0.34 - 0.85)	0.007
Baseline AEC vs (<130/μL vs ≥130/μL)	1.70 (1.12 - 2.58)	0.012	1.77 (1.10 - 2.86)	0.019
irAEs (yes vs no)	0.36 (0.23 - 0.55)	<0.001	0.63 (0.32 - 1.23)	0.177
Pulmonary irAEs (yes vs no)	0.24 (0.07 - 0.75)	0.014	0.23 (0.07 - 0.79)	0.019
Variables with <i>p</i> -value ≤0.05 in univariate model were analyzed in multivariate analysis model. HR, hazard ratio; CI, Confidence Interval; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group; AEC, absolute eosinophil count; irAEs, immune-related adverse events				

Tabella 20 analisi uni e multivariate dei fattori relati a OS

Variables	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	<i>p</i> -value	HR (95% CI)	<i>p</i> -value
Gender (male vs female)	1.11 (0.79 – 1.57)	0.577		
ECOG PS:				
0	-	-	-	-
1	1.66 (1.13 – 2.45)	0.011	1.75 (1.17 – 2.62)	0.007
2	3.25 (1.91 – 5.53)	<0.001	2.54 (1.42 – 4.56)	0.002
Smoking status:				
Never	-	-		
Former	0.56 (0.30 – 1.04)	0.065		
Current	0.58 (0.32 – 1.04)	0.067		
Histology (squamous vs non-squamous)	1.15 (0.81 – 1.63)	0.435		
PD-L1 expression (<50% vs ≥50%)	0.65 (0.44 – 0.97)	0.037	0.63 (0.41 – 0.96)	0.033
Baseline AEC vs (<130/μL vs ≥130/μL)	1.56 (1.11 – 2.18)	0.010	1.46 (1.02 – 2.10)	0.040
irAEs (yes vs no)	0.31 (0.22 – 0.45)	<0.001	0.51 (0.30 – 0.86)	0.011
Pulmonary irAEs (yes vs no)	0.33 (0.15 – 0.70)	0.004	0.37 (0.16 – 0.85)	0.019
Variables with <i>p</i> -value ≤0.05 in univariate model were analyzed in multivariate analysis model. HR, hazard ratio; CI, Confidence Interval; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group; AEC, absolute eosinophil count; irAEs, immune-related adverse events				

L'analisi prospettica condotta suggerisce di nuovo il ruolo che potrebbe avere la conta eosinofila come fattore prognostico e predittivo di risposta agli ICI.

Questa analisi è stata pubblicata nella rivista *Cancer Treatment e Research Communications* nel 2022 ⁷⁰.

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

L'immunoterapia rappresenta una nuova frontiera nel trattamento dei tumori solidi, e l'aumento esponenziale delle indicazioni terapeutiche sta modificando in modo significativo le sopravvivenze e le possibilità di cura dei pazienti, che possono sempre di più accedere a trattamenti innovativi, efficaci e con tossicità limitate. Purtroppo, l'utilizzo di questi farmaci in pratica clinica apre la necessità di una curva di apprendimento da parte dei clinici utilizzatori, che verte sulla selezione del paziente e la gestione delle tossicità a breve e lungo termine.

Seppur gli AEs legati agli ICI siano spesso di grado lieve e ben gestibili, differenti esperienze evidenziano come irAEs di intensità grave (≥ grado 3) si verificano in circa il 10%-27% dei pazienti trattati con anti-CTLA-4, nel 7%-20% dei pazienti trattati con anti-PD-1, e nel 55% dei pazienti che ricevono una combinazione di anti-CTLA-4 e anti-PD-1. In questi pazienti, la discontinuazione temporanea o permanente

dell'immunoterapia a causa delle tossicità o il trattamento dell'irAE stesso, tendenzialmente con corticosteroidi ad alte dosi, può condizionare negativamente l'outcome della terapia in termini di risposta tumorale e sopravvivenza.

Il nostro studio ha evidenziato che esiste una associazione positiva tra irAEs specifici (disfunzioni tiroidee e tossicità cutanea) e l'efficacia nei pazienti affetti da RCC. Inoltre, l'evenienza di più di due tossicità nello stesso paziente è associata ad un miglior tasso di risposta. Di contro, l'utilizzo dei corticosteroidi per il trattamento degli irAEs non sembra essere detrimentalmente per l'efficacia dell'immunoterapia, soprattutto se utilizzati dopo 30 gg dall'inizio del trattamento.

L'utilizzo su larga scala degli ICIs associata a risposte cliniche molto eterogenee nei diversi pazienti ha reso però sempre più urgente la necessità di trovare e validare fattori predittivi di risposta che possano selezionare pazienti responders ab inizio, così da candidare a tale trattamento solo i pazienti che possano beneficiarne, evitando spese sanitarie e tossicità inutili. In particolare le tossicità possono portare a ritardi di somministrazione dell'ICI, discontinuazioni ed aumento della mortalità. Si evince quindi quanto questo emergente bisogno porti la ricerca di biomarcatori routinariamente disponibili ad essere campo di studio molto fervido in questi anni ⁷¹⁻⁷⁴. I potenziali nuovi biomarcatori sono ricercati sia nel TME sia nel siero dei pazienti. L'identificazione di marcatori circolanti predittivi della risposta all'immunoterapia potrebbe favorire l'identificazione precoce delle risposte al trattamento, evitando sospensioni premature della terapia o un prolungamento inutile della stessa, migliorando la loro sostenibilità.

Tra i numerosi biomarcatori valutati come predittori di risposta il maggior focus è sicuramente incentrato sull'espressione di PDL-1 sulle cellule tumorali e sulle cellule del TME, anche se ad oggi non tutti i pazienti con una overespressione di PDL-1 beneficiano dal trattamento con ICIs, così come ci sono pazienti le cui cellule tumorali non esprimono PDL-1 che ottengono comunque risposte: questo spiega la miriade di indicazioni non univoche per gli ICIs nei vari istotipi tumorali e nei vari setting. Inoltre, anche il metodo di determinazione di PDL-1 non è standardizzato per i vari istotipi ⁷⁵⁻⁷⁸. Nel caso del NSCLC, attualmente, l'unico biomarcatore usato nella pratica clinica per selezionare i pazienti che hanno maggiori probabilità di ottenere risultati duraturi dall'immunoterapia è proprio il livello di espressione di PD-L1 sulle cellule tumorali. L'espressione di PD-L1, però, non è sempre un marcatore predittivo efficace; infatti, anche nei pazienti con un'elevata espressione di PD-L1, circa il 50% non risponde alla terapia con ICIs e alcuni pazienti negativi per PD-L1 sperimentano risposte forti e

durature. Tassi di risposta migliori, a parità di espressione di PD-L1, sono stati osservati nei fumatori rispetto ai non fumatori, sono, quindi, associati a tumori che presentano un elevato carico di mutazioni. Negli ultimi anni, sono emersi dati su possibili nuovi biomarcatori che riflettono il microambiente immunitario del tumore e le caratteristiche intrinseche delle cellule tumorali, ottenuti direttamente da campioni di tumore, ad esempio TMB, la *immune gene signatures*, i TILs, e altri fattori periferici. Tuttavia, questi marcatori richiedono metodiche invasive e il rapporto rischio/beneficio per il monitoraggio della risposta al trattamento è elevato.

I biomarcatori circolanti sono promettenti metriche predittive della risposta all'immunoterapia, in quanto si ottengono con prelievi non invasivi per i pazienti e possono essere ripetuti nel tempo. Tra i marcatori circolanti possiamo identificare i valori dei diversi leucociti del paziente e i rapporti tra loro, come ad esempio il rapporto neutrofilo/linfociti (NLR) prognostico di un aumento di sopravvivenza se il valore è alto, la conta assoluta dei linfociti (ALC) positivamente correlata alla sopravvivenza e la lattato deidrogenasi sierica (LDH), correlata invece ad una prognosi negativa se aumentata. Le varianti di splicing di PD-L1 portano alla secrezione di PD-L1 solubile (sPD-L1), che potrebbe diventare uno dei marcatori circolanti per il monitoraggio della terapia con ICIs: analogamente a PD-L1 legato alla membrana, anche sPD-L1 ostacola l'attivazione e la proliferazione delle cellule T. Un aumento del livello di sPD-L1 prima del trattamento si associa a una prognosi sfavorevole, attribuita all'elevato carico tumorale, all'elevato splicing alternativo e all'esaurimento della risposta immunitaria. Recenti studi hanno riscontrato che un elevato sPD-L1 al basale si correla ad un maggior rischio di progressione del tumore. Altri potenziali biomarcatori correlati positivamente con una risposta attiva sono gli antigeni tumorali mutati e le diverse citochine. Le citochine sono proteine che svolgono il ruolo di messaggeri dell'immunità innata e adattativa, consentendo alle cellule del sistema immunitario di comunicare a breve distanza, in modo paracrino o autocrino. Nel contesto tumorale, le citochine possono sia aumentare la crescita (citochine oncogene), sia limitarla (citochine antitumorali), regolando le relative vie di segnalazione come la proliferazione, la crescita, le metastasi e l'apoptosi. Inoltre, la conta cellulare periferica sembra essere promettente come nuovo biomarcatore di tossicità agli ICIs ⁷³.

La conta eosinofila in particolare è un parametro semplice e routinariamente eseguito in pratica clinica nei pazienti in trattamento con ICIs. L'accumulo di eosinofili sia nel sangue periferico che nei tessuti tumorali (definita come eosinofilia tumore

associata, TATE) sembrano essere markers prognostici di miglior prognosi nei pazienti trattati con ICIs⁷⁹. I primi studi in questo senso sono prevalentemente nel melanoma, in cui lo sviluppo di ipereosinofilia periferica correla con miglior prognosi, indipendentemente dal trattamento. L'aumento della AEC durante il trattamento con ICIs sembrerebbe correlata con OS superiori⁸⁰. Inoltre, dati preliminari indicano che l'eosinofilia correla con lo sviluppo degli irAES in diverse patologie⁶⁷.

Lo studio condotto nell'ambito del presente progetto di Dottorato, è stato disegnato, approvato e condotto per valutare in un setting di *real-world* di applicazione dell'immunoterapia, al fine di individuare l'andamento della comparsa e di sviluppo degli irAEs in popolazione non selezionata, la loro eventuale correlazione con il tipo istologico, il trattamento e la durata dello stesso, e per valutare percorsi di gestione multidisciplinare degli stessi. L'osservazione degli irAES rende possibile la correlazione con fattori clinico-biochimici basali che possono essere individuati come fattori predittivi di sviluppo e di gravità degli irAEs stessi. Il progetto nasce altresì per selezionare dei fattori predittivi che possano essere di facile acquisizione, misurabili e riproducibili, valutarne l'effettivo valore prognostico e predittivo di risposta e tossicità. Il nostro interesse si è focalizzato principalmente su conte cellulari periferiche, e le prime analisi si sono incentrate sul ruolo degli eosinofili, in quanto come già noto, sono attenzionati come correlati con lo sviluppo di AEs e con la risposta al trattamento.

L'interesse per la popolazione eosinofila è sostenuto da studi che hanno analizzato la correlazione tra eosinofili e cancro, focalizzandosi sul possibile ruolo degli eosinofili infiltranti il tumore: essi producono elevate quantità di chemochine, quali CCL5, CXCL9 e CXCL10, reclutando linfociti CD8+, determinando, di conseguenza, da una parte una migliore risposta al trattamento immunoterapico e dall'altra, però, lo sviluppo di tossicità. Queste esperienze suggeriscono come i pazienti che sperimentano irAES, sembrano avere una maggiore probabilità di sviluppare eosinofilia durante il corso del trattamento con ICIs⁸¹.

I dati retrospettivi della nostra popolazione evidenziano come la quasi totalità di pazienti che sviluppano irAEs, sia nel mM che nell'RCC che nel NSCLC trattati con ICIs, abbiano livelli di eosinofili aumentati al basale (>50 cellule/ μ L).

Successivamente abbiamo esplorato la correlazione tra AEC e comparsa di irAEs in queste tre coorti di pazienti con tumori solidi in trattamento con ICIs. È stato proposto un cutoff di AEC basale di 135/ μ L, ed è stata evidenziata una forte associazione tra AEC basale > 135/ μ L e sviluppo di irAEs. In particolare, sono state evidenziate profonde

differenze tra l'AEC basale dei pazienti che hanno sviluppato irAEs, rispetto a chi non ha sviluppato tossicità: nei pazienti che non hanno sviluppato irAEs, la mediana di AEC basale risultava $>135/\mu\text{L}$ solamente in coloro con diagnosi di melanoma (AEC=150/ μL), mentre nei restanti tumori la mediana era inferiore al cutoff (mRCC=100, mNSCLC=60). Nei pazienti che hanno sviluppato irAEs, invece, la mediana di AEC basale era notevolmente superiore rispetto al cutoff. Questo sembra confermare l'ipotesi di come l'eosinofilia basale possa essere correlata allo sviluppo di tossicità e possa essere valutata come fattore predittivo di sviluppo di irAE durante il percorso terapeutico. Inoltre, è stato evidenziato come un'AEC basale elevata correlava con un miglior outcome dei pazienti in termini di ORR: i pazienti con un'AEC $> 135/\mu\text{L}$, presentavano un ORR più alto rispetto ai pazienti con un'AEC basale inferiore al cutoff, suggerendo come l'AEC basale possa essere un possibile biomarcatore predittivo di risposta al trattamento con ICIs. Come passo ulteriore, lo studio ha cercato di costruire un modello matematico che potesse prevedere le tossicità correlate al trattamento immunoterapico, sulla base di fattori di rischio noti come l'età, il tipo di trattamento e la sede del tumore. Il modello predittivo di questo studio, integra diverse variabili: AEC, età, farmaci e tipologia tumorale, sviluppando una formula matematica che permette di calcolare il valore assumibile di previsione (Y_0), utilizzato per valutare il numero di tossicità previste, catalogate per sede e trattamento. Una valutazione precoce delle tossicità, fornita dal modello, dovrebbe essere associata ad una migliore aderenza al trattamento e a risultati favorevoli, con l'obiettivo di identificare i pazienti ad alto rischio di sviluppo di irAEs prima di iniziare il trattamento immunoterapico, prevenendo possibili eventi avversi gravi (G3-G4), in modo tale da evitare un'eventuale sospensione temporanea o permanente del trattamento immunoterapico. Per le intrinseche limitazioni legate alla natura retrospettiva-osservazionale e monocentrica dello studio, alla numerosità del campione, alla eterogeneità dei trattamenti e delle patologie in studio, tali ipotesi necessitano di conferme in eventuali esperienze prospettiche.

La validazione del nostro modello matematico con la potenzialità intrinseca di poter individualizzare il monitoraggio e la diagnosi precoce di eventi avversi, anticipandone il percorso multidisciplinare di cura, garantendo la prosecuzione dei trattamenti oncologici attivi e il miglior risultato in termini di aderenza e quindi di risposta e di sopravvivenza potrebbe essere la forza della parte prospettica della nostra esperienza.

Per quanto riguarda la parte prospettica dello studio, focalizzandoci sul NSCLC, abbiamo evidenziato una correlazione significativa tra AEC basale e espressione di PDL-1 $\geq 50\%$ ($p = 0.018$). Inoltre, una AEC basale $> 130/\mu\text{L}$ e lo sviluppo di un irAE durante la terapia sono associati con PFS e OS migliori. Abbiamo descritto un aumento dell'AEC all'inizio del trattamento e un decremento in occasione della progressione; alta AEC, PS ECOG ≤ 1 , irAEs sviluppati e tossicità polmonari sono risultati essere fattori prognostici indipendenti di miglior sopravvivenza.

In linea con i dati di letteratura il nostro studio evidenzia un aumento significativo della conta eosinofila dal basale a dopo la prima e la seconda somministrazione di ICI e c'è un trend nell'aumento del rischio di sviluppare irAEs nel gruppo con alto AEC al basale. Anche in questa popolazione abbiamo evidenziato come lo sviluppo di irAE correli con una sopravvivenza migliore.

Se validato, il ruolo di AEC come fattore predittivo di risposta e di tossicità potrebbe avere una importanza strategica in quanto facilmente misurabile e ripetibile in pratica clinica quotidiana, sia nel NSCLC che negli altri istotipi. Inoltre, stiamo valutando il potere predittivo del trend longitudinale di AEC durante il trattamento, cercando di confermare prospetticamente che l'incremento rispetto al basale correli effettivamente con l'outcome e lo sviluppo di irAEs, nonché se l'ipereosinofilia periferica sia davvero associata con un altro numero di eosinofili nel TME.

Ovviamente sarà necessario investigare sulla caratterizzazione funzionale degli eosinofili e delle altre cellule immunitarie coinvolte nella risposta immune, al di là della pura conta, investendo in studi di ricerca traslazionale che possano profilare le cellule del sistema immunitario e confermarne o meno il coinvolgimento e il ruolo che possono avere sullo sviluppo delle tossicità e sull'effetto della risposta.

Il lavoro proseguirà nella parte prospettica dello studio e potrà rispondere a quesiti sul ruolo di potenziali biomarcatori di risposta agli ICI e sulla validazione di fattori misurabili che possano aiutare a prevedere, monitorare e gestirne le tossicità.

Infine, l'esperienza della AOU Careggi registrata nell'ambito di questo studio, è stata volta a creare delle unità di competenza multidisciplinare intra aziendale per la gestione di AEs agli ICI, rappresentando una esperienza pilota che potrebbe diventare un modello strutturato e riproducibile in pratica clinica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Tan S, Li D, Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother.* 2020;124. doi:10.1016/j.biopha.2020.109821
2. Zhang H, Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J Cancer.* 2018;9(10):1773-1781. doi:10.7150/jca.24577
3. Fay AB, Moreira RB, Nunes Filho PRS, Albuquerque C, Barrios CH. The management of immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade. *Expert Rev Qual Life Cancer Care.* 2016;1(1):89-97. doi:10.1080/23809000.2016.114282
4. Maleki Vareki S, Garrigós C, Duran I. Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;116:116-124. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.06.00
5. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials.* 2016;39(1):98-106. doi:10.1097/COC.0000000000000239
6. Maleki Vareki S, Garrigós C, Duran I. Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;116:116-124. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.06.001
7. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials.* 2016;39(1):98-106. doi:10.1097/COC.0000000000000239
8. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yervoy-epar-product-information_it.pdf

9. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_it.pdf
10. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_it.pdf
11. Weber JS, Yang JC, Atkins MB, Disis ML. Toxicities of immunotherapy for the practitioner. *J Clin Oncol*. Published online 2015.
doi:10.1200/JCO.2014.60.0379
12. Nakamura Y, Tanaka R, Maruyama H, et al. Correlation between blood cell count and outcome of melanoma patients treated with anti-PD-1 antibodies. *Jpn J Clin Oncol*. 2019;49(5):431-437. doi:10.1093/jjco/hyy201
13. National Cancer Institute. *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0*. versione 4.; 2009.
14. Pavan A, Calvetti L, Dal Maso A, et al. Peripheral Blood Markers Identify Risk of Immune-Related Toxicity in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immune-Checkpoint Inhibitors. *Oncologist*. 2019;24(8):1128-1136.
doi:10.1634/theoncologist.2018-0563
15. Patil PD, Burotto M, Velcheti V. Biomarkers for immune-related toxicities of checkpoint inhibitors: current progress and the road ahead. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018. doi:10.1080/14737159.2018.1440209
16. Hopkins AM, Rowland A, Kichenadasse G, et al. Predicting response and toxicity to immune checkpoint inhibitors using routinely available blood and clinical markers. *Br J Cancer*. 2017. doi:10.1038/bjc.2017.274
17. Gowen MF, Giles KM, Simpson D, et al. Baseline antibody profiles predict toxicity in melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors. *J Transl Med*. Published online 2018. doi:10.1186/s12967-018-1452-4

18. Fujimura T, Sato Y, Tanita K, et al. Serum levels of soluble CD163 and CXCL5 may be predictive markers for immune-related adverse events in patients with advanced melanoma treated with nivolumab: A pilot study. *Oncotarget*. Published online 2018. doi:10.18632/oncotarget.24509
19. Zahoor H, Barata PC, Jia X, et al. Patterns, predictors and subsequent outcomes of disease progression in metastatic renal cell carcinoma patients treated with nivolumab. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1). doi:10.1186/s40425-018-0425-8
20. Passiglia F, Bronte G, Bazan V, et al. PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: A pooled analysis. *Oncotarget*. Published online 2016. doi:10.18632/oncotarget.7582
21. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. Published online 2015. doi:10.1056/NEJMoa1500596
22. Kambayashi Y, Fujimura T, Hidaka T, Aiba S. Biomarkers for Predicting Efficacies of Anti-PD1 Antibodies. *Front Med*. 2019;6.
23. Chasseuil E, Saint-Jean M, Chasseuil H, et al. Blood predictive biomarkers for nivolumab in advanced melanoma. *Acta Derm Venereol*. Published online 2018. doi:10.2340/00015555-2872
24. Fujisawa Y, Yoshino K, Otsuka A, et al. Baseline neutrophil to lymphocyte ratio combined with serum lactate dehydrogenase level associated with outcome of nivolumab immunotherapy in a Japanese advanced melanoma population. *Br J Dermatol*. Published online 2018. doi:10.1111/bjd.16427
25. Cao D, Xu H, Xu X, Guo T, Ge W. A reliable and feasible way to predict the benefits of Nivolumab in patients with non-small cell lung cancer: a pooled analysis of 14 retrospective studies. *Oncoimmunology*. Published online 2018. doi:10.1080/2162402X.2018.1507262

26. Diem S, Kasenda B, Spain L, et al. Serum lactate dehydrogenase as an early marker for outcome in patients treated with anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. Published online 2016. doi:10.1038/bjc.2015.467
27. Ishihara H, Tachibana H, Takagi T, et al. Predictive Impact of Peripheral Blood Markers and C-Reactive Protein in Nivolumab Therapy for Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Target Oncol*. 2019;14(4):453-463. doi:10.1007/s11523-019-00660-6
28. Nakaya A, Kurata T, Yoshioka H, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an early marker of outcomes in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with nivolumab. *Int J Clin Oncol*. Published online 2018. doi:10.1007/s10147-018-1250-2
29. Russo A, Franchina T, Ricciardi GRR, et al. Baseline neutrophilia, derived neutrophil-to-lymphocyte ratio (dNLR), platelet-to-lymphocyte ratio (PLR), and outcome in non small cell lung cancer (NSCLC) treated with Nivolumab or Docetaxel. *J Cell Physiol*. Published online 2018. doi:10.1002/jcp.26609
30. Mezquita L, Auclin E, Ferrara R, et al. Association of the lung immune prognostic index with immune checkpoint inhibitor outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol*. Published online 2018. doi:10.1001/jamaoncol.2017.4771
31. Sander Kelderman S, Heemskerk B, Van Tinteren H et al. Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 63(5), 449-458 - March 2014.
32. Di Giacomo AM, Calabrò L, Danielli R, et al. Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who responded to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access programme. *Cancer Immunol Immunother*. Published online 2013. doi:10.1007/s00262-013-1418-6

33. Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, et al. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: A nearly increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol*. Published online 2013. doi:10.1093/annonc/mdt027
34. Ku GY, Yuan J, Page DB, et al. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer*. Published online 2010. doi:10.1002/cncr.24951
35. Ferrucci PF, Ascierto PA, Pigozzo J, et al. Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: Prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann Oncol*. Published online 2016. doi:10.1093/annonc/mdw016
36. Khoja L, Atenafu EG, Templeton A, et al. The full blood count as a biomarker of outcome and toxicity in ipilimumab-treated cutaneous metastatic melanoma. *Cancer Med*. Published online 2016. doi:10.1002/cam4.878
37. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Foppen MG, et al. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin Cancer Res*. 2016;22(12):2908-2918. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2412
38. Gowen MF, Giles KM, Simpson D, et al. Baseline antibody profiles predict toxicity in melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors. *J Transl Med*. Published online 2018. doi:10.1186/s12967-018-1452-4
39. Fujimura T, Sato Y, Tanita K, et al. Serum levels of soluble CD163 and CXCL5 may be predictive markers for immune-related adverse events in patients with advanced melanoma treated with nivolumab: A pilot study. *Oncotarget*. Published online 2018. doi:10.18632/oncotarget.24509

40. Kourie HR, Paesmans M, Klastersky J. Biomarkers for adverse events associated with immune checkpoint inhibitors. *Biomark Med.* 2016;10(10):1029-1031. doi:10.2217/bmm-2016-0211
41. Shahabi V, Berman D, Chasalow SD, et al. Gene expression profiling of whole blood in ipilimumab-treated patients for identification of potential biomarkers of immune-related gastrointestinal adverse events. *J Transl Med.* Published online 2013. doi:10.1186/1479-5876-11-75
42. Tarhini AA, Zahoor H, Lin Y, et al. Baseline circulating IL-17 predicts toxicity while TGF- β 1 and IL-10 are prognostic of relapse in ipilimumab neoadjuvant therapy of melanoma. *J Immunother Cancer.* Published online 2015. doi:10.1186/s40425-015-0081-1
43. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and T H 17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* Published online 2012. doi:10.1038/nrd3794
44. Fujisawa Y, Yoshino K, Otsuka A, et al. Fluctuations in routine blood count might signal severe immune-related adverse events in melanoma patients treated with nivolumab. *J Dermatol Sci.* 2017;88(2):225-231. doi:10.1016/j.jdermsci.2017.07.007
45. Jaber SH, Cowen EW, Haworth LR, et al. Skin reactions in a subset of patients with stage IV melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 monoclonal antibody as a single agent. *Arch Dermatol.* 2006. doi:10.1001/archderm.142.2.166
46. Simson L, Ellyard JI, Dent LA, et al. Regulation of Carcinogenesis by IL-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumor Immune Surveillance. *J Immunol.* Published online 2007. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4222

47. Cormier SA. Pivotal Advance: Eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. *J Leukoc Biol*. Published online 2006. doi:10.1189/jlb.0106027
48. Lotfi R, Herzog GI, DeMarco RA, et al. Eosinophils Oxidize Damage-Associated Molecular Pattern Molecules Derived from Stressed Cells. *J Immunol*. Published online 2009. doi:10.4049/jimmunol.0900504
49. Lotfi R, Lee JJ, Lotze MT. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): Role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother*. Published online 2007. doi:10.1097/01.cji.0000211324.53396.f6
50. Davis BP, Rothenberg ME. Eosinophils and cancer. *Cancer Immunol Res*. Published online 2014. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0196
51. Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S, Capron M. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy*. ; 2012. doi:10.1007/s00262-012-1288-3
52. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science (80-)*. Published online 1992. doi:10.1126/science.1636093
53. Valent P, Klion AD, Horny HP, et al. Contemporary consensus proposal on criteria and classification of eosinophilic disorders and related syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2012. doi:10.1016/j.jaci.2012.02.019
54. Moreira A, Leisgang W, Schuler G, Heinzerling L. Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immunotherapy. *Immunotherapy*. 2017;9(2):115-121. doi:10.2217/imt-2016-0138

55. Rosner S, Kwong E, Shoushtari AN, et al. Peripheral blood clinical laboratory variables associated with outcomes following combination nivolumab and ipilimumab immunotherapy in melanoma. *Cancer Med.* 2018. doi:10.1002/cam4.1356
56. Weide B, Martens A, Hassel JC, et al. Baseline biomarkers for outcome of melanoma patients treated with pembrolizumab. *Clin Cancer Res.* 2016. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0127
57. Bernard-Tessier A, Jeanville P, Champiat S, et al. Immune-related eosinophilia induced by anti-programmed death 1 or death-ligand 1 antibodies. *Eur J Cancer.* 2017. doi:10.1016/j.ejca.2017.05.017
58. Scanvion Q, Béné J, Gautier S, et al. Moderate-to-severe eosinophilia induced by treatment with immune checkpoint inhibitors: 37 cases from a national reference center for hypereosinophilic syndromes and the French pharmacovigilance database. *Oncoimmunology.* 2020;9(1). doi:10.1080/2162402X.2020.1722022
59. Schindler K, Harmankaya K, Kuk D, et al. Correlation of absolute and relative eosinophil counts with immune-related adverse events in melanoma patients treated with ipilimumab. *J Clin Oncol.* Published online 2014. doi:10.1200/jco.2014.32.15_suppl.9096
60. Montgomery ND, Dunphy CH, Mooberry M, et al. Diagnostic complexities of eosinophilia. *Arch Pathol Lab Med.* Published online 2013. doi:10.5858/arpa.2011-0597-RA
61. Spry C. Eosinophilia in Addison's disease. *Yale J Biol Med.* Published online 1976.
62. Geisinger KR, Hartle EO, Warren T. Eosinophilic Replacement Infiltrates in Cystic Hashimoto's Thyroiditis: a Potential Diagnostic Pitfall. *Endocr Pathol.* 2014. doi:10.1007/s12022-014-9304-0

63. E.A. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts P, et al. , New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1) . Eur J Cancer 45 (2009) 228 – 247
64. World Medical Association. Dichiarazione di Helsinki Principi etici per la ricerca biomedica che coinvolge gli esseri umani. Evidence 2013;5(10): e1000059
65. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research/development/compliance/good-clinical-practice>
66. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Foppen MG, et al. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):2908-2918. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2412
67. Giommoni E, Giorgione R, Paderi A , et al. *Eosinophil Count as Predictive Biomarker of Immune-Related Adverse Events (irAEs) in Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) Therapies in Oncological Patients.* Immuno 2021, 1(3), 253-263
68. Paderi A, Giorgione R, Giommoni E, et al. *Association between Immune Related Adverse Events and Outcome in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Immune Checkpoint Inhibitors;* Cancers 2021 Feb 18;13(4):860
69. Paderi A, Gambale E, Botteri C, et al. *Association of Systemic Steroid Treatment and Outcome in Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors: A Real-World Analysis.* Molecules 2021, 26, 5789
70. Caliman E, Fancelli S, Ottanelli C , et al: *Absolute Eosinophil Count predicts clinical outcomes and toxicity in non-small cell lung cancer patients treated with immunotherapy.* Can Treat and Res Comm, 2022;32:100603
71. Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, et al., *Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review,* Eur. J. Cancer 54 (2016) 139–148, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.016>

72. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD, *Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade*, N. Engl. J. Med. 378 (2018) 158–168, <https://doi.org/10.1056/nejmra1703481>
73. Hopkins AM, Rowland A, Kichenadasse G, et al, *Predicting response and toxicity to immune checkpoint inhibitors using routinely available blood and clinical markers*, Br. J. Cancer 117 (2017) 913–920, <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.274>.
74. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. *Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy*, Lancet Oncol 17 (2016) e542–e551, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30406-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30406-5).
75. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al. *Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy*, Clin. Cancer Res. 20 (2014) 5064–5074, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3271>
76. Herbst J, Soria M, Kowanzet GD et al. *Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A*, Nature 515 (2016) 563–567, <https://doi.org/10.1038/nature1401>
77. Abdel-Rahman O, *Correlation between PD-L1 expression and outcome of NSCLC patients treated with anti-PD-1/PD-L1 agents: a meta-analysis*, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 101 (2016) 75–85
78. Grigg C, Rizvi NA, *PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction?* J. Immunother. Cancer 4 (2016) 1–10, <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0153-x>
79. Davis BP, Rothenberg ME, *Eosinophils and cancer*, Cancer Immunol. Res. 2 (2014) 1–8, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0196>

80. Moreira A, Leisgang W, Schuler G, et al. *Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immunotherapy*, *Immunotherapy* 9 (2017) 115–121, <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0138>
81. Simon SCS, Xiaoying Hu, et al. *Eosinophil accumulation predicts response to melanoma treatment with immune checkpoint inhibitors*. *Oncoimmunology* 2020 Feb 15;9(1):1727116.doi: 10.1080/2162402X.2020.1727116.

7.GLOSSARIO

ACI: adoptive cellular immunotherapy
AEC: conta eosinofila assoluta
APCs: cellule presentanti l'antigene
CAR: chimeric antigen receptor
CPS: combined-positive score
CRC: carcinoma del colon-retto
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CTLs: Linfociti T citotossici
Eo-irAEs: eosinophil-induced adverse events
Eo-ir: eosinofilia indotta da immunoterapia
ESCC: carcinoma a cellule squamose esofageo
GC: carcinoma gastrico
HSCC: carcinoma squamoso della testa e del collo
ICI: immune checkpoint inhibitor
IL-2: Interleuchina-2
irAE: immune-related adverse events
mAbs: anticorpi monoclonali
mM: melanoma metastatico
MSI: instabilità microsatellitare
NLR: neutrophil/lymphocyte ratio
NSCLC: tumore polmonare non a piccole cellule
ORR: overall response ratio
OS: overall survival
PD-1: Programmed Death-1
PDL-1: Programmed Death-1 Ligand
PFS: progression free survival
PLR: platelets/lymphocyte ratio
PS: performance status
RCC: carcinoma a cellule renali
TATE: eosinofilia tumore associata
TAAs: Tumor Associated Antigens
TMB: tumor mutational burden

TME: microambiente tumorale
 TNBC: carcinoma mammario triple negative
 TPS: tumor proportion score
 UCC: carcinoma uroteliale
 WBC: conta dei globuli bianchi

8. APPENDICE

8.1 ECOG PS

ECOG PERFORMANCE STATUS*	
Grade	ECOG
0	Fully active, able to carry on all pre-disease performance without restriction
1	Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out work of a light or sedentary nature, e.g., light house work, office work
2	Ambulatory and capable of all selfcare but unable to carry out any work activities. Up and about more than 50% of waking hours
3	Capable of only limited selfcare, confined to bed or chair more than 50% of waking hours
4	Completely disabled. Cannot carry on any selfcare. Totally confined to bed or chair
5	Dead

* As published in Am. J. Clin. Oncol.:
 Oken, M.M., Creech, R.H., Tormey, D.C., Horton, J., Davis, T.E., McFadden, E.T., Carbone, P.P.:
 Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol
 5:649-655, 1982.

Ringraziamenti

Questa è la mia vita, il mio sogno realizzato. Ho desiderato fare il Medico, poi l'Oncologo, e adesso sono qui a costruire altre parti del mio sogno.

Ringrazio chi quel sogno lo ha reso possibile, e dedico tutto il mio percorso a mia madre, che con la sua dolcezza e la dignità di donna forte mi ha insegnato il rigore e l'abnegazione al lavoro. Dedico questo lavoro a mio padre, che mi ha trasmesso l'onestà intellettuale, la generosità e il rispetto per i sogni, ma anche l'ambizione, la forza e il coraggio per realizzarli.

A loro, i miei angeli volati via troppo presto, devo tutto. Anche avermi reso reale il cancro come nemico da combattere, perché vederlo me lo ha fatto credere più vulnerabile.

Un ringraziamento particolare va a chi negli anni il lavoro me lo ha insegnato davvero: ai miei colleghi, ormai amici e seconda famiglia.

In particolare, grazie alla Dottoressa Serena Pillozzi, mente e anima del mio Dottorato, perché senza di lei portare avanti il progetto sarebbe stato impossibile.

Grazie al Prof Antonuzzo, per avermi dato amicizia, fiducia, possibilità concrete e insegnamenti continui, di lavoro e di vita.

Grazie al Prof Matucci Cerinic, per la sua elegante presenza, l'indirizzo e l'esempio.

Grazie a mio fratello Lorenzo, che è stato la mia forza in tutti questi anni.

E a Riccardo, per esserci.

Per tutti, *Pan di Stelle*.

Elisa

