



**UNIVERSITÀ
DI SIENA**
1240

DIPARTIMENTO DI
**MEDICINA MOLECOLARE
E DELLO SVILUPPO**
— DMMS

Università degli Studi di Siena
Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Scheda Relazione Annuale Dottorando
(da redigere in lingua inglese)

Siena, 30.09.2025

Al Collegio Docenti del Dottorato in Medicina Molecolare

dott./dr.ssa **Melanie Paccagnella**

ciclo XL° tutor Prof.ssa Federica Gemignani, dott.ssa Antonella Conforti

Attività scientifica svolta nel 1°/2° anno di Dottorato, Anno Accademico **2024/2025**

(massimo 2000 caratteri totali, spazi inclusi) descrivere brevemente la propria ricerca, suddividendola in:

- Introduzione
- Metodiche utilizzate
- Risultati ottenuti
- Elencare eventuali Pubblicazioni scientifiche: autori, titolo della pubblicazione, nome e numero della rivista, anno di pubblicazione

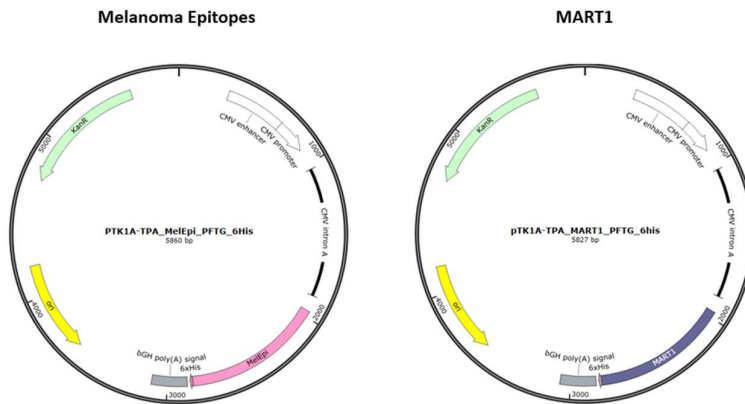
Introduction

During the first year of my PhD, I developed DNA-based vaccines targeting melanoma-associated antigens to induce tumor-specific CD8⁺ T cell responses. A literature review identified three relevant TAAs: Trp-2, gp100, and MART-1. Their cDNAs were cloned into the pTK1A-TPA vector, containing a CMV promoter, BGH terminator, TPA leader sequence to enhance secretion, and the *Toxoplasma gondii* Profilin-like sequence (PFTG) as a genetic adjuvant. Two vaccine constructs were designed: (1) a MART-1 full-length antigen fused to TPA and PFTG, and (2) a "string-of-beads" vaccine combining immunogenic epitopes from the three TAAs. Epitope selection was performed using NetMHC and IEDB, with appropriate spacers to improve antigen processing and avoid junctional epitopes. In silico analysis (AllerTop, ToxDL) confirmed the constructs were non-allergenic and non-toxic. Plasmids were amplified in *E. coli* and validated by restriction enzyme digestion. Vaccines were then tested *in vivo*.



UNIVERSITÀ
DI SIENA
1240

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA MOLECOLARE
E DELLO SVILUPPO
— DMMS



Results

The two vaccines were tested with a 3-dose schedule, administered 14 days apart. One week after the final boost, intracellular cytokine staining (ICS) by flow cytometry was performed on PBMCs stimulated with peptide pools representing each plasmid insert. Positive results led to animal sacrifice and full T cell characterization via ICS and ELISPOT.

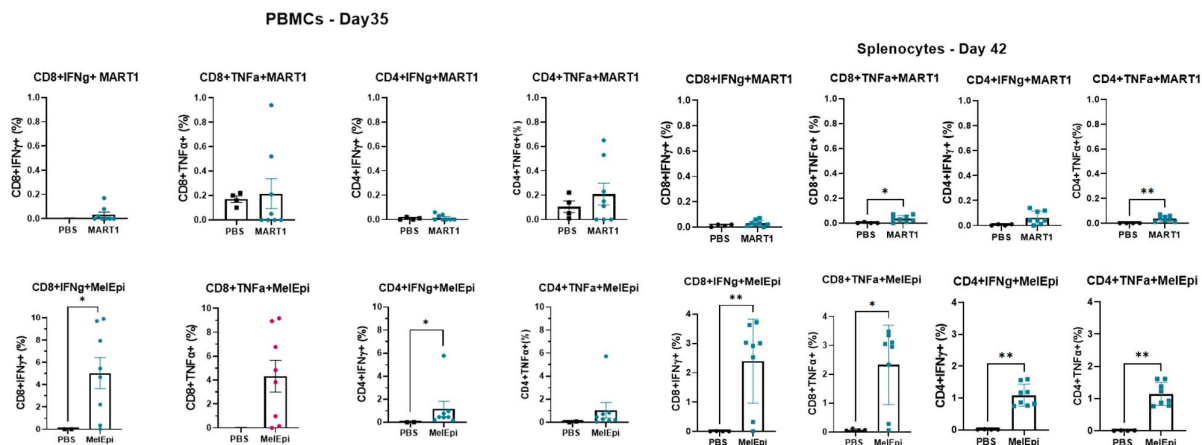


Fig.1 Intracellular staining (ICS) of IFN- γ producing cells in PBMCs at day 35.

Fig.2 ICS of IFN- γ producing cells in splenocytes at day 42 (sacrifice).

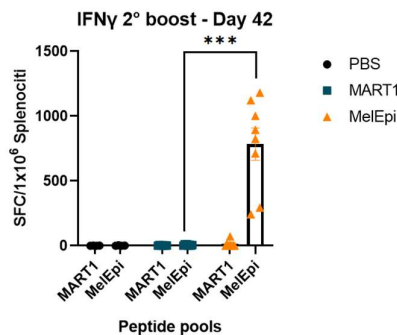


Fig.3 Analysis of IFN- γ secreting cells in splenocytes by ELISpot assay at day 42.



**UNIVERSITÀ
DI SIENA**
1240

DIPARTIMENTO DI
**MEDICINA MOLECOLARE
E DELLO SVILUPPO**
— DMMS

To exclude junctional epitopes, single epitopes (not pooled) were later used to assess specific responses.

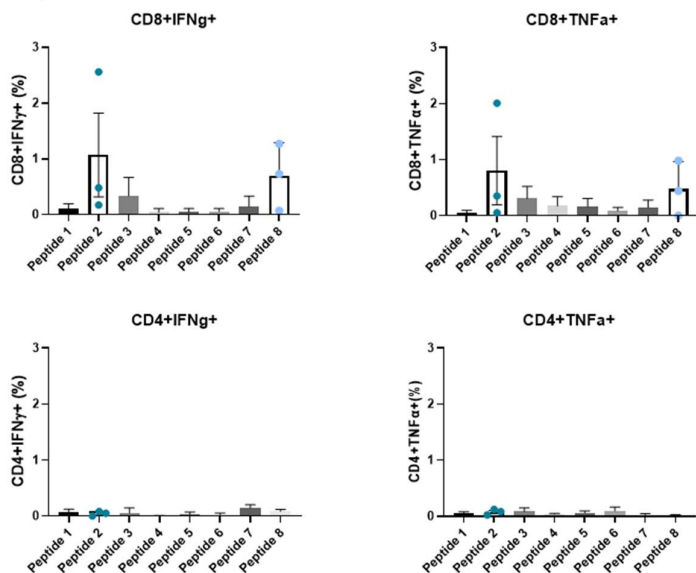


Fig.4 ICS of IFN- γ producing cells in splenocytes, after stimulation with single epitopes.

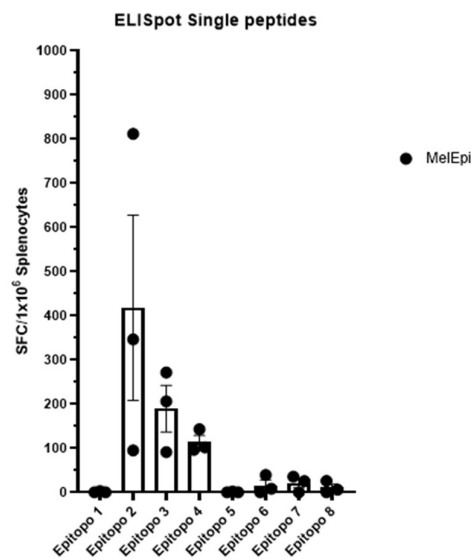


Fig.5 Analysis of IFN- γ secreting cells in splenocytes by ELISpot assay after stimulation with single epitopes.

Materials and Methods

Plasmid construction: melanoma antigen cDNAs cloned into pTK1A-TPA, validated by restriction digestion and agarose gel.

Amplification: transformed in *E. coli* DH5 α , expanded, purified with endotoxin-free kits.

Transfection: HEK293T cells, expression confirmed.

Vaccination: C57BL/6 mice, 50 μ g DNA i.m. + electroporation, 3 doses at 14-day intervals.

Analysis: PBMCs/splenocytes collected; T cell responses assessed by IFN- γ ELISpot and ICS/flow cytometry.

Publications

From ex vivo to in vivo chimeric antigen T cells manufacturing: new horizons for CAR T-cell based therapy

E. Pinto, L. Lione, M. Compagnone, M. Paccagnella, E. Salvatori, M. Greco, V. Frezza, E. Marra, L. Aurisicchio, G. Roscilli & A. Conforti

Journal of Translational Medicine 23, 10 (2025).

<https://doi.org/10.1186/s12967-024-06052-3>



**UNIVERSITÀ
DI SIENA
1240**

DIPARTIMENTO DI
**MEDICINA MOLECOLARE
E DELLO SVILUPPO
— DMMS**

Attività didattica (seguire le indicazioni [1](#) e [2](#) online per il calcolo CFU. Deve essere congruente con le schede mensili)

- CFU **totali** conseguiti per le frequenze di didattica frontale: **12 + 1 (phD day)**
- Seminari (indicare relatore e data del/i seminario/i. Aggiungere righe se necessario)
 1. Data: 19.5.25 Speaker: Prof. Elisabetta Affabris
Titolo: Introduzione ai vettori retrovirali e lentivirali.
Organizzato da: Università degli Studi di Roma Tre
Online – 0.5 CFU
 2. Data: 28.5.25 Speaker: Prof. Gennaro Ciliberto, Prof. Fabio Palombo
Titolo: Cancer Immunotherapy and Vaccines
Organizzato da: Accademia Medica di Roma – Policlinico Umberto I
Presenza – 1 CFU
 3. Data: 3 Marzo 2025 Speaker: Prof.ssa Aurelia Rughetti
Titolo: Interrogare il sistema immunitario per la scelta di percorsi terapeutici personalizzati in oncologia
Organizzato da: Fabio Palombo – Neomatrix Biotech
Presenza – 1 CFU
 4. Data: 14 Marzo 2025 Speaker: Prof. Massimo Massaia
Titolo: The renaissance of T-cell redirected immunotherapy in hematology"
Organizzato da: Nouscom
Presenza – 1 CFU
 5. Data: 16 Settembre 2025 Speaker: Jean Oak MD, PhD
Titolo: Effects of cellular and immunotherapy on disease detection by flow cytometry
Online – 0.5 CFU
 6. Data: 2 Ottobre 2025 Speaker: Paul Danny, David C J Carpentier
Titolo: A guide to UniProt for students
Organizzato da: EMBL- EBI
Online – 0.5 CFU

CFU conseguiti per questa attività: **4.5 CFU** (indicare CFU **totali** da Novembre '24 a Ottobre '25)

- Soft Skills (indicare nome e data del/i corso/i. Aggiungere righe se necessario)
 1. 12 MAGGIO 2025
Demystifying false myths around dyslexic minds
Susanne Cederquist, International Dyslexia Strengths Network (1 CFU)



**UNIVERSITÀ
DI SIENA**
1240

DIPARTIMENTO DI
**MEDICINA MOLECOLARE
E DELLO SVILUPPO**
— DMMS

2. 21 MAGGIO 2025
International Perspective on Teaching and Learning Center
Janette Brunstein, Centro de Excelência em Ensino e Aprendizagem
Transformadora, Mackenzie Presbyterian University (1 CFU)
3. 28/29 MAGGIO 2025
How to organize qualitative assessment in the study course?
Maddalena Corsini, Università di Siena
Rudite Koka, Riga Stradinš university Latvia (0.5 CFU)
4. 17 giugno 2025
Aula Magna Storica e diretta streaming
Docente Niccolò Fiorini, "Il Piano Economico Finanziario del business plan" (0.5 CFU)
5. 19 giugno 2025
Aula Magna Storica e diretta streaming
Docente Alessandra Romeo, "Nozioni base sulla tutela della proprietà intellettuale" (0.5 CFU)
6. Data: 25 GIUGNO 2025
Speaker: Serena Cheren
Titolo: Come scrivere una proposta Marie-Sklodowska Curie Actions Doctoral Networks
Organizzato da: Università degli studi di Siena – APRE (1 CFU)
7. Data: 25 GIUGNO 2025
Speaker: Fabrizio Di Fuccia e Angelica Lo Sauro
Titolo: Learning Technologically – Esperienze reali e artificiali per la didattica: SLIDO E GOOGLE FORM
Organizzato da: Università degli studi di Siena – TLC UNISI (1 CFU)
8. Data: 30 SETTEMBRE 2025
Titolo: Learning Technologically – Esperienze reali e artificiali per la didattica: IA E DIDATTICA.
Organizzato da: Università degli studi di Siena – TLC UNISI (1 CFU)
9. Data: 6 Ottobre 2025
Titolo: Embase
Organizzato da: UniFi (0.5 CFU)



**UNIVERSITÀ
DI SIENA**
1240

DIPARTIMENTO DI
**MEDICINA MOLECOLARE
E DELLO SVILUPPO**
— DMMS

10. Data: 7 Ottobre 2025
Titolo: Bench to Boardroom: My Startup Journey
Prof. Gennaro Prota
Organizzato da: USiena (0.5 CFU)
11. Data: 14 Ottobre 2025
Titolo: CONSORTIUM AGREEMENT E PROPRIETÀ INTELLETTUALE
Organizzato da: Università degli studi di Siena – APRE (1 CFU)

CFU conseguiti per questa attività: **8.5 CFU** (indicare CFU **totali** da Novembre '24 a Ottobre '25)

- Partecipazione a congressi (indicare nome e data del/i congressi/i, titolo della/e presentazione-i/poster/abstract, autori)
 1. 15th Milan Congress on Innovative Anticancer Therapy
Milano, 23-24 Gennaio 2025
Auditore (0.5 CFU)
 2. 9th National Congress of the Italian Society for Virology. One Virology One Health
Torino, 22-24 Giugno 2025
Presentatore Poster "DEVELOPMENT OF NOVEL GENETIC VACCINE PLATFORMS FOR EPIDEMIC PREPAREDNESS: FROM THE IDEA TO GMP PRODUCTION"
M Paccagnella, L Lione, E Salvatori, E Pinto, M Greco, Bucci F, G Roscilli, L Aurisicchio, and A Conforti (1 CFU)

CFU conseguiti per questa attività: **1.5 CFU** (indicare CFU **totali** da Novembre '24 a Ottobre '25)

- Eventuali soggiorni in altri laboratori italiani o esteri