

P

IL PUNTO

Contro i tumori, per un controllo efficace del DNA sbagliato.

Giuseppe Luzi - Prof. Ass. di Med. Interna, Spec. Allergologia e Imm. Clinica - Consulente Gruppo Bios SpA

Nei paesi economicamente sviluppati nel corso di un secolo l'aspettativa di vita è sostanzialmente cambiata, passando dai 40 aa circa per gli uomini agli 80 anni attuali e dai circa 40 aa per il sesso femminile agli 84 anni dei nostri giorni. Cosa ha determinato questo passaggio? In generale il miglioramento della qualità della vita, che può essere definito da vari parametri. Questi sono riassumibili, in grandi linee, nei progressi delle condizioni igieniche ambientali con la diffusione dell'acqua potabile, il controllo delle malattie infettive mediante antibiotici, un'alimentazione completa e qualitativamente corretta.

Una condizione fondamentale nel combinato disposto che lega sviluppo economico a progresso nella gestione della salute per milioni di individui è stata la diffusione di vaccini contro vari agenti patogeni di numerose malattie infettive. Secondo alcune stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, calcolando il punto di partenza all'inizio del XXI secolo, gra-

zie al diffuso impiego dei vaccini saranno risparmiate circa 25 milioni di vite.

I progressi contro le malattie infettive e il controllo ambientale subiscono tuttavia cambiamenti continui che incidono profondamente nella nostra vita quotidiana: basti pensare alla contaminazione con plastica che sta sconvolgendo alcuni ecosistemi marini e al conseguente danno per la fauna ittica della quale ci nutriamo. Altre difficoltà nascono dalla resistenza microbica agli antibiotici con le implicazioni assistenziali che ne derivano e che sono ampiamente riportate nei vari mass-media. In questo contesto mutevole e per gran parte condizionato dal comportamento della nostra specie, la disponibilità dei vaccini non è solo un'arma storicamente acquisita contro le malattie infettive ma è un vero strumento di difesa in continua evoluzione grazie al parallelo sviluppo delle biotecnologie e delle tecnologie farmaceutiche.

Sappiamo bene che il vaccino è una preparazione



biologica che stimola la risposta immunitaria (la così detta immunità acquisita). La preparazione viene somministrata secondo varie modalità in un organismo per dare origine a una risposta specifica contro la malattia dalla quale ci si deve proteggere. In generale il preparato vaccinale contiene una struttura molecolare del tutto simile al microrganismo patogeno che causa la malattia. Le due “braccia” del sistema immunitario, l’immunità umorale (con produzione di anticorpi) e quella cellulare (con azione diretta sul bersaglio o produzione di citochine) vengono stimolate dal vaccino: così possono intervenire identificando il bersaglio come se fosse una vera minaccia alla salute. Grazie a questo riconoscimento “anticipato” il sistema immunitario si predispose a intervenire contro il microrganismo patogeno “vero” se questo aggredisce l’organismo. La forza del sistema immunitario risiede nella sua memoria, che si riattiva prontamente quando sollecitata dall’incontro con il bersaglio che deve essere eliminato.

La questione centrale

È possibile utilizzare il criterio con il quale ven-

gono preparati i vaccini anti-microrganismi per contrastare o eliminare le cellule cancerose? *È possibile costruire un vaccino anti-tumore?* La risposta a queste domande è complessa e implica alcune premesse. In generale i vaccini possono prevenire le infezioni croniche da parte di agenti patogeni (per esempio alcuni virus) che causano l’insorgenza di neoplasie. Un’immediata esperienza riguarda il carcinoma del fegato. Questo tumore insorge dopo infezione da virus dell’epatite B (in circa l’80% dei casi). Dati epidemiologici dimostrano che la vaccinazione contro il virus dell’epatite B conferisce all’organismo una protezione totale per il tumore correlato. Un altro tipo di tumore indotto da virus è quello della cervice uterina: in questo caso l’agente patogeno è il virus del papilloma umano (HPV, Human Papilloma Virus). La vaccinazione contro il virus HPV protegge dal tumore correlato.

Quando parliamo di effetto protettivo anti-tumorale di un vaccino che svolge la sua funzione per contrastare infezioni che hanno potere oncogeno ovviamente ci troviamo di fronte a un risultato “indiretto”: viene controllata l’infezione e il microrganismo coinvolto nella patogenesi dei tumori non è in grado

di manifestare il suo potenziale danno “collaterale”. Ma l’approccio concettuale cambia quando prendiamo in esame la crescita neoplastica “spontanea”, cioè quella che si verifica in un organismo che non ha avuto infezioni con patogeni noti e comunque indipendentemente da fattori causali identificati. Per questo aspetto vanno considerati diversi parametri, che possono essere riassunti in alcuni punti base:

- a) condizioni che inducono la crescita neoplastica;
- b) sviluppo delle cellule cancerose e loro estensione locale e/o diffusione metastatica;
- c) sistemi di difesa messi in atto dal tumore durante la sua crescita per bloccare le risposte difensive dell’organismo;
- d) ruolo del sistema immunitario nei confronti della crescita neoplastica con riconoscimento specifico delle cellule tumorali;
- e) attuazione di controllo da parte dello stesso sistema immunitario per bloccare la crescita neoplastica o eliminare del tutto il tumore che si sta sviluppando.

In buona sostanza i vaccini contro i tumori che siano in grado di indurre una memoria immunitaria operativamente efficace contro la crescita neoplastica possono consentire una prevenzione *primaria* (azione contro microrganismi che facilitano e causano lo sviluppo di cancro) o *secondaria* (in questo caso la reazione del sistema immunitario agisce contro le anomalie che si osservano durante la trasformazione neoplastica iniziale delle cellule e possono inibire l’evoluzione di stadi pre-neoplastici). I vaccini anti-tumorali possono anche essere progettati per curare tumori che risultino già clinicamente diagnosticati e anatomopatologicamente caratterizzati ed è su questi che si basa l’attuale approccio.

Evoluzione di un’idea

Il controllo della crescita neoplastica è uno dei temi centrali della ricerca biomedica e varie tappe sono state necessarie per arrivare al concetto di immunoterapia attiva. La terapia antitumorale dipende da numerosi fattori: la natura stessa della neoplasia, lo stato di evoluzione della massa neoplastica nei tu-

mori solidi, la sede anatomica e la vascolarizzazione. Sono noti gli approcci terapeutici classici per trattare il cancro: la chirurgia, le radiazioni, i farmaci. Nell’ambito farmacologico si utilizzano prodotti citotossici (la classica chemioterapia), ormoni e antiormoni (terapia endocrina), molecole a bersaglio specifico (*target therapy*), alcuni prodotti biologici e l’immunoterapia attiva quando possibile. Gli studi seguono varie strade ma è da tempo acquisito il concetto di ricorrere a terapie integrate che utilizzano i vari aspetti della crescita neoplastica per arrivare al suo contenimento o nei casi migliori al pieno successo con ablazione della massa tumorale stessa.

Perché ricorrere all’immunoterapia attiva? Il sistema immunitario ha un’azione selettiva contro le cellule neoplastiche ma non sempre la sorveglianza esercitata è efficace e risolutiva per attaccare il tumore e distruggerlo, quindi la ricerca si è orientata a identificare molecole in grado di ampliare la risposta immunitaria specifica per incrementare il potenziale terapeutico. Così nasce l’idea del vaccino antitumorale, basandosi sull’impiego di molecole capaci di attivare e/o stimolare una risposta specifica anti-tumorale.

Si usa l’espressione di immunoterapia attiva perché la finalità è quella di preparare vaccini in grado di stimolare una risposta immunitaria specifica. Parte di questa linea di intervento origina dalle conoscenze acquisite sulla struttura della cellula cancerosa: infatti le cellule del cancro presentano sulla loro superficie, oltre alle molecole del sistema maggiore di istocompatibilità [M.H.C.], strutture antigeniche che sono in grado di stimolare una risposta immunitaria diretta specificamente orientata proprio sul “bersaglio” tumore.

Cellule sane e cellule cancerose

Le cellule sane e quelle mutate in evoluzione neoplastica presentano sulla loro superficie antigeni propri. In linea di massima se le cellule restano “sane”, il sistema immunitario le identifica come appartenenti allo stesso organismo e non le aggredisce. Le cellule cancerose acquisiscono invece sulla loro superficie molecole nuove o trasformate, che costituiscono il se-

gnale per attivare la risposta del sistema immunitario. È essenziale che la risposta immunitaria venga indirizzata con grande precisione sugli antigeni delle cellule cancerose. Ma spesso gli antigeni “mutati” hanno piccole varianti rispetto alla condizione di normalità. Questo carattere strutturale rende più difficile il loro riconoscimento con la conseguente inattività delle cellule immunocompetenti e perdita di efficacia.

Allo stato attuale delle conoscenze costruire un vaccino anticancro non ha lo scopo di evitare la malattia neoplastica o di bloccare il manifestarsi di una nuova crescita tumorale. L’approccio è quello dei vaccini “terapeutici” con la finalità di rendere più aggressivo il sistema immunitario, rinforzando la capacità di riconoscere gli antigeni tumorali espressi dalle cellule maligne già presenti nell’organismo. Le cellule che nel sistema immunitario hanno la funzione esecutiva di distruggere il tumore sono principalmente i linfociti T citotossici, il compito dei quali si associa a quello di altre cellule e anticorpi che legandosi sulla superficie della massa neoplastica ne favoriscono l’eliminazione. Non si tratta quindi di una prevenzione, ma di un vero e proprio trattamento.

Molti vaccini anticancro vengono preparati utilizzando le caratteristiche che il tumore stesso assume nei singoli malati. Si può realmente pensare a una forma di medicina personalizzata; infatti se due individui sono colpiti dallo stesso tipo istologico di tumore, questo non significa che gli antigeni siano gli stessi. È proprio utilizzando le differenti caratteristiche tumorali che si arriva ad avere un efficace vaccino anticancro.

La sorveglianza immunitaria contro i tumori

Per ottenere una risposta antitumorale messa in atto dal sistema immunitario non possiamo prescindere dai parametri che regolano l’interazione ospite-tumore. Durante il processo di tumorigenesi nelle cellule si osservano fenomeni di derepressione e repressione genica, con alterazioni dei geni stessi che mutano. Il sistema immunitario funziona contro un tumore quando “vede” gli antigeni del tumore stesso come estranei, *non-self*. I linfociti T sono in grado di rico-

noscere diversi tipi di antigeni associati a tumori. In pratica la risposta più efficace la espletano i linfociti T CD8+ citotossici. Altre cellule coinvolte sono le *natural killer*, i macrofagi, le cellule che presentano l’antigene (Antigen Presenting Cell). L’intervento degli anticorpi, pur chiaramente dimostrato “in vitro”, non sembra avere una reale efficacia “in vivo”.

Se è vero che uno stato di deficit della risposta immunitaria è predisponente allo sviluppo del cancro è altrettanto evidente che la crescita neoplastica si osserva di solito in soggetti che non hanno manifesta immunodepressione. *C’è allora una contraddizione?* La risposta sta nel fatto che le cellule tumorali elaborano vari meccanismi di “fuga” dal controllo immunitario. Per contenere il fenomeno della fuga o, come ormai si usa dire, dell’*escape* tumorale, sono state proposte soluzioni che utilizzano la stessa natura dell’interazione ospite-tumore.

Per ottenere un vaccino, per esempio, è stato proposto di utilizzare le cellule dendritiche. Queste cellule inducono l’attivazione di linfociti T specifici, possono essere “rinforzate” con antigeni del tumore e usate come un vaccino vero e proprio diretto all’attivazione dei linfociti citotossici. In altri approcci si può utilizzare il DNA che codifica per l’antigene tumorale interessato. Per mezzo di un plasmide si può inserire nella cellula dendritica il codice genetico dell’antigene. Questo verrà poi espresso sulla superficie della cellula APC e presentato ai linfociti T. In alcuni casi le cellule tumorali non sono in grado di stimolare in modo efficace i linfociti T. Utilizzando direttamente le stesse cellule neoplastiche si inseriscono, per esempio, molecole di costimolazione sulla loro superficie. Quando la cellula tumorale “rinforzata” viene reintrodotta nell’organismo diventa più efficace la sua capacità di stimolare la risposta specifica T citotossica.

Le implicazioni cliniche e l’esperienza acquisita nei vari trial che hanno utilizzato l’immunoterapia attiva dimostrano sia l’efficacia potenziale di alcuni protocolli sia la complessità della gestione d’insieme nell’affrontare modalità e tempi di una terapia integrata. Per esempio, se confrontiamo l’approccio chemioterapico con quello di una stimolazione immuni-

taria vediamo subito le differenze da considerare: la chemioterapia ha in generale un'azione immediata, mentre una risposta immunomediata richiede tempo, anche mesi. Sebbene con una relativa selettività d'azione la chemioterapia ha un bersaglio definito mentre nell'evolvere della risposta immunitaria vanno prese in esame varie fasi e variabili effetti sul bersaglio. In buona sostanza i parametri di tossicità, dose ed efficacia terapeutica che possiamo considerare tipici di un trattamento chemioterapico non sono utilizzabili in immunoterapia attiva e la dose biologica ottimale spesso non è la dose massima tollerata.

Un esempio: contro il melanoma un segnale incoraggiante.

Il melanoma cutaneo è un tumore che deriva dalla trasformazione tumorale dei melanociti, alcune delle cellule che formano gli strati della pelle. I melanociti fanno parte, insieme ai cheratinociti, dell'epidermide e hanno il compito di produrre melanina, un pigmento che protegge dagli **effetti dannosi dei raggi solari**. In condizioni normali i melanociti possono dar luogo ad agglomerati scuri visibili sulla superficie della pelle noti come **nevi**. L'età più colpita per il melanoma è attorno ai 45-50 anni, anche se l'età media alla diagnosi sembra essere più bassa secondo quanto segnalato nell'ultimo ventennio. I melanomi cutanei si sviluppano sia da cute integra sia da nevi pre-esistenti, che sono cioè presenti fin dalla nascita o dalla prima infanzia (congeniti) o compaiono durante il corso della vita (acquisiti).

Ai fini terapeutici e prognostici i melanomi cutanei sono di solito divisi in 4 stadi. In generale la prognosi è correlata allo spessore della lesione al momento della diagnosi: se il riscontro è inferiore a un mm la risposta è ottima, peggiorando progressivamente con l'aumentare dello spessore. Nel corso del 2017 due vaccini "personalizzati" si sono rivelati sicuri e hanno dato benefici clinici in pazienti analizzati in due differenti studi clinici di fase I descritti sulla rivista *Nature*. Lo studio si è focalizzato sulle mutazioni che si accumulano nelle cellule neoplastiche: queste nel corso del tempo formano proteine anomale, specifiche

nel singolo paziente, che sono poi in grado di essere attaccate dal sistema immunitario.

I vaccini anti-tumorali sono realizzati ricorrendo a cellule tumorali autologhe o allogeniche, utilizzando lisati cellulari, cellule dendritiche o APC, piccoli frammenti proteici o DNA. Di solito nella composizione si inseriscono anche sostanze chimiche adiuvanti che potenziano la risposta immunitaria. In conclusione lo scopo della vaccinoterapia è quello di stimolare una risposta efficace contro gli antigeni tumorali: si tratta ovviamente di una stimolazione in "presenza" della malattia neoplastica, quando il tumore si è già sviluppato nell'organismo.

Genetica e controllo della crescita neoplastica

Le armi anti-cancro si vanno sempre più raffinando e, come prevedibile, l'approccio al controllo genetico della crescita neoplastica ha ottenuto progressi crescenti grazie a nuove biotecnologie. In questo ambito entrano in scena nuove e linguaggi di nicchia, ma a parte il grande lavoro svolto dai ricercatori, si tratta probabilmente di un futuro già iniziato. Vediamo come.

Sappiamo che l'informazione genetica contenuta nel DNA si concretizza nella sintesi di molecole che vengono assemblate per mezzo dell'acido ribonucleico, in sigla RNA. Sappiamo che la **trascrizione** dei geni avviene nel nucleo, dove viene sintetizzato l'mRNA. La **traduzione** dell'mRNA si verifica nel citoplasma. Se una mutazione nel DNA altera la cellula sana trasformandola in cellula neoplastica l'approccio vaccinale consiste, concettualmente, nel rinforzare la risposta del sistema immunitario contro il bersaglio potenzialmente mortale rappresentato da un tumore maligno in espansione.

Sostanzialmente tutto l'approccio medico-chirurgico si fonda sul criterio dell'eliminazione del tumore. Ma un'idea ancora migliore è quella di andare a correggere il DNA "sbagliato". In pratica riposizionando nel punto giusto quella parte di messaggio che ha danneggiato la cellula. In questo ambito i contributi della ricerca sono stati eccezionali e nel mese di febbraio 2018 altri successi fanno ben sperare. Ma come si fa ad andare dentro una molecola, prendere il pezzo sba-



gliato e introdurre il DNA giusto? La parola magica è CRISPR, un vero e proprio “taglia e incolla” genetico, un po’ come facciamo tutti al computer quando vogliamo ricomporre un pensiero e sistemarlo meglio nel testo, magari prendendo la fonte da altri archivi del sistema. **CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari)** è il nome che è stato dato a una famiglia di brevi sequenze ripetute di DNA. In pratica si utilizza un enzima che può tagliare il DNA che si associa al CRISPR. Ne esce un’altra sigla nota come Crispr-Cas9 molto “pubblicizzata” di recente per le sue specifiche qualità e per i progressi che sono stati fatti sul suo fun-

zionamento da gruppi di lavoro italiani. Ma andiamo per ordine: l’RNA intercetta la sequenza di DNA del gene che si vuole distruggere o sostituire. Agganciato in modo altamente selettivo il DNA sul quale si deve agire, entra in gioco l’enzima Cas9, che taglia il DNA. Accade però che se il riconoscimento RNA DNA è buono ma non ottimale l’enzima può danneggiare anche punti del DNA che si vogliono salvaguardare. La scoperta dei ricercatori consiste nell’aver “costruito” un Cas9 particolare, chiamato evo-Cas9, in grado di entrare in azione, di tagliare cioè il frammento di Dna (il gene) soltanto quando l’Rna lo identifica con una precisione assoluta. È un passo avanti sostanziale per le ovvie implicazioni che ne derivano.