

## STUDI CLINICI DI COMBINAZIONE DI CHEMIOTERAPIA E IMMUNOTERAPIA IN PAZIENTI CON MELANOMA

Enrico Proietti, Francesca Urbani, Iole Macchia, Imerio Capone

*Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### Introduzione

Il concetto di immunoterapia dei tumori si basa sulla capacità del sistema immunitario di controllare la crescita tumorale.

Il sistema immunitario partecipa costantemente al controllo della crescita cellulare eliminando quei cloni che possono generare tumori. Basti pensare che i nostri linfociti, inoculati in topi immunodepressi possono dare origine a linfomi con una frequenza che arriva, talvolta al 30%. Questa funzione di controllo, definita “immunosorveglianza” si esplica attraverso il riconoscimento di antigeni propri delle cellule tumorali (TAA, *Tumor Associated Antigens*), la cui emergenza spesso accompagna il processo di trasformazione neoplastica.

L'idea di potenziare le risposte naturali del sistema immunitario per contrastare il cancro risale a più di un secolo fa con le osservazioni di W. Coley sull'efficacia antitumorale di estratti batterici in alcuni pazienti con tumore (1). Studi successivi provarono l'efficacia immunostimolante aspecifica di estratti di *Corynebacterium Parvum* e BCG (batterio di Calmette Guérin) nel contrastare lo sviluppo del carcinoma superficiale della vescica (2-3). Ancora oggi il BCG è utilizzato come trattamento di prima linea in questo tipo di cancro (4).

Deve essere comunque sottolineato che il tumore è, talvolta, in grado di sfuggire alle risposte immunitarie. È possibile che tumori clinicamente apprezzabili si siano evoluti in modo da divenire resistenti alla immunosorveglianza con un meccanismo di influenza reciproca tra cellule precancerose e sistema immunitario che è stato definito recentemente con il nome di *cancer immunoediting* (5).

Per questa ragione la storia dell'immunoterapia dei tumori è stata caratterizzata da un alternarsi di momenti di ottimismo e di delusione. L'identificazione di un numero sempre maggiore di TAA (5, 6) e il progresso nelle conoscenze del sistema immunitario hanno reso, tuttavia, possibile l'elaborazione di nuove strategie di immunoterapia alcune delle quali sono già incluse in alcuni protocolli terapeutici standard. Una volta identificati gli antigeni associati al tumore, è possibile produrre vaccini specifici, ma per ottenere un successo terapeutico è necessario superare l'azione soppressiva che il tumore, crescendo, esercita nei confronti del sistema immunitario e che persiste anche quando il tumore sia stato rimosso o ridotto con chemio o radio terapia.

Numerose sono le strategie elaborate per superare questo scoglio, ma sostanzialmente sono due gli approcci sperimentali che stanno prendendo piede in questi ultimi anni.

Un primo approccio si basa sull'uso delle cellule dendritiche (DC) come adiuvanti naturali per avviare la fase iniziale della risposta immunitaria (risposta innata) e favorire l'insorgenza di una potente risposta cellulare (adattativa) contro il tumore. Un secondo approccio prevede l'uso combinato di immunoterapia e chemioterapia con l'intento di ridurre il numero dei linfociti T regolatori (con attività immunosoppressiva) e attivare ed espandere i linfociti T citotossici. L'approfondimento delle conoscenze dell'azione ormetica di alcuni chemioterapici ha permesso inoltre di disegnare, in questi ultimissimi anni, una strategia di combinazione che prevede il trattamento chemioterapico in associazione alla vaccinazione con cellule dendritiche.

## Stato di sviluppo

Una notevole mole di studi preclinici ha dimostrato che alcuni chemioterapici possono aumentare fortemente la risposta immunitaria a vaccini antitumorali o al trasferimento adottivo di linfociti immuni verso un determinato tumore (*adoptive cell transfer*, ACT). Questo fenomeno che si manifesta in netto contrasto con la più nota attività antiproliferativa e immunosoppressiva ascritta alla maggior parte di questi farmaci antineoplastici, dipende dalla dose, dalla frequenza e dalla modalità di combinazione dei due trattamenti. I meccanismi coinvolti nella azione immunoadiuvante di alcuni chemioterapici sono molteplici e spaziano dalla riduzione temporanea dei linfociti T regolatori, alla induzione di numerose citochine e fattori immunostimolanti (7), alla induzione di apoptosi immunogenica delle cellule tumorali (8). Tuttavia questi fenomeni sembrano manifestarsi in modo transitorio e la finestra di combinazione tra chemio e immunoterapia è molto stretta risultando tale combinazione massimamente efficace quando il chemioterapico viene somministrato entro poche ore o al massimo un giorno prima del vaccino o della somministrazione adottiva di linfociti immuni (9).

La maggior parte degli studi di combinazione di chemio e immunoterapia è stata eseguita utilizzando la ciclofosfamide, un agente alchilante con spiccata attività mielosoppressiva. Una condizione di profonda, ma transitoria linfodeplezione (*non myeloablative lymphodepletion*) è risultata necessaria come prerequisito dei trattamenti ideati dal gruppo di Steven Rosenberg per ottenere un effetto terapeutico utilizzando linfociti infiltranti il tumore in pazienti con melanoma avanzato. Con il progredire degli studi clinici, il gruppo di Rosenberg sta ottenendo risultati di grande rilievo (con risposte complete che variano dal 50 al 70%) e sta proponendo questo trattamento anche in tumori diversi dal melanoma (10).

Gli studi condotti a partire dagli anni '90, dal nostro gruppo, presso l'Istituto Superiore di Sanità, hanno permesso di disegnare una strategia di combinazione del trattamento con ciclofosfamide e una vaccinazione peptidica in pazienti con melanoma avanzato (stadio III-IV) ma privi di tumore al momento del trattamento. La finalità di questo approccio era quella di prevenire, in questi pazienti, l'insorgere delle recidive della malattia, fenomeno assai frequente e temibile per l'assenza di trattamenti standard efficaci (11).

Un primo studio di fase I/II è stato concluso. Lo studio prevedeva l'arruolamento complessivo di 10 pazienti con melanoma stadio III-IV ma resecati e privi di malattia. I pazienti erano stati suddivisi in due bracci: un braccio prevedeva il trattamento con dacarbazina (DTIC, un agente alchilante simile alla ciclofosfamide), seguito dopo 24h e dopo 7 giorni dalla somministrazione sottocutanea di un vaccino peptidico costituito da due peptidi rappresentativi di TAA del melanoma (MART-1:26-35 e gp100:209-217). Questo schema di trattamento era ripetuto per sei volte a distanza di 21 giorni.

Nel secondo braccio i pazienti erano trattati con il solo vaccino ma senza la somministrazione di DTIC. In entrambi i bracci, ogni inoculo di vaccino era accompagnato dalla iniezione nello stesso sito di  $3 \times 10^6$  UI di interferon alfa.

Il trattamento è stato tollerato ottimamente e l'analisi immunologica dei linfociti T ha mostrato un forte incremento delle risposte immunitarie contro il vaccino e contro le cellule di melanoma nei pazienti trattati con DTIC e vaccino mentre in quelli trattati con solo vaccino le risposte sono state molto deboli. È stato così possibile dimostrare che l'associazione di un blando chemioterapico alla somministrazione di un vaccino cambia completamente l'efficacia di quest'ultimo. Sebbene non fosse tra gli obiettivi principali dello studio, si è potuto osservare che dei 5 pazienti trattati con la combinazione, i 3 che avevano avuto le risposte immunologiche più forti non hanno avuto recidive metastatiche e sono ancora liberi da malattia dopo 6 anni dal trattamento (12).

Sebbene lo studio sia stato eseguito su un numero molto piccolo di pazienti, esso ha dimostrato che i principi di combinazione di chemio-immunoterapia tratti dagli studi preclinici in modelli animali sono applicabili all'uomo e, soprattutto, che un breve trattamento chemioterapico è in grado di trasformare una vaccinazione poco efficace in uno strumento terapeutico capace di prevenire la recidiva metastatica in pazienti privi di altre opzioni terapeutiche.

Gli ottimi risultati di questo primo studio ci hanno incoraggiato a proseguire con uno studio di fase II per valutare l'efficacia del trattamento su un numero statisticamente rilevante di pazienti. Questo studio è già stato avviato in collaborazione con gli Istituti Regina Elena e San Gallicano di Roma e 21 dei 50 pazienti previsti sono stati arruolati.

Il limite dello studio appena esposto consiste nel fatto che la vaccinazione peptidica può essere fatta soltanto in pazienti con aplotipo HLA definito, nella fattispecie HLA.A2.1. I pazienti con aplotipo diverso (ca il 50% nella popolazione italiana) non possono beneficiare del trattamento. Per superare questo problema, è stata messa a punto una strategia di vaccinazione con particolari DC. Le DC sono cellule specializzate nella presentazione degli antigeni (*antigen presenting cell*, APC) e costituiscono il sistema più efficace nella stimolazione delle cellule B e T antigene-specifiche, per cui svolgono un ruolo chiave nell'innescare le risposte immunitarie adattative. Un metodo di produzione delle DC, messo a punto nel nostro laboratorio, a partire da precursori monocitari in presenza di interferon di tipo I e GM-CSF, ha prodotto cellule molto migliori in termini di capacità di presentare l'antigene. Le DC così ottenute sono chiamate IFN-DC.

Inoculate direttamente nella lesione tumorale dopo trattamento con DTIC, le IFN DC sono in grado di trovare da sole l'antigene tumorale e di iniziare una potente risposta immunitaria contro il tumore. La somministrazione del chemioterapico viene fatta con il duplice scopo di aumentare la disponibilità di corpi apoptotici immunogenici del tumore e favorire la loro captazione e presentazione degli antigeni TAA al sistema immunitario. Questa strategia di "vaccinazione senza vaccino" è stata applicata ad uno studio clinico di fase I in pazienti con lesioni melanomatose cutanee multiple non resecabili. Questo studio è stato appena attivato in collaborazione con l'Ospedale-Policlinico S. Andrea e con l'Istituto Dermatopatico dell'Immacolata di Roma e prevede l'arruolamento di 10 pzienti. I pazienti saranno trattati con IFN-DC autologhe ottenute da prelievo aferetico dal paziente stesso e saranno inoculate sottocutanea un giorno dopo infusione endovenosa di DTIC (800 mg/mq). Il trattamento con DTIC e IFN-DC sarà ripetuto 6 volte ad intervalli di 21 giorni.

## Conclusioni e prospettive future

Dopo quasi un secolo di tentativi per ottenere un vaccino contro il cancro, le nuove conoscenze in campo immunologico hanno permesso di disegnare strategie di immunoterapia dei tumori che hanno ottime possibilità di superare la fase sperimentale e di entrare a pieno diritto nell'armamentario terapeutico antineoplastico. Lo sfruttamento delle proprietà propulsive della risposta immunitaria di alcuni chemioterapici ha permesso di trasformare trattamenti immunoterapeutici soltanto immunogenici in strumenti altamente efficaci per la cura di alcuni tumori. L'associazione di chemioterapia con ACT, con vaccini peptidici e con IFN-DC viene utilizzata già per la cura di pazienti con melanoma.

Altri studi sono stati pianificati dal nostro gruppo, all'Istituto Superiore di Sanità, per trattare con IFN-DC, pazienti con linfomi non Hodgkin indolenti e con carcinoma della cervice uterina.

Più in generale un grande sforzo è in corso da parte degli immunologi per portare al letto del paziente oncologico la grande mole di conoscenze che è stata sviluppata nel corso di questi ultimi anni.

## Bibliografia

1. Coley WB. *Am J Med Sci* 1893;105:487-511.
2. Lipton A, Harvey HA, Balch CM, Antle CE, Heckard R, Bartolucci AA. *Corynebacterium parvum* versus bacille Calmette-Guérin adjuvant immunotherapy of stage II malignant melanoma. *Clin Oncol* 1991; 9:1151-56.
3. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976;116:180-3.
4. Marincola FM, White DE, Wise AP, Rosenberg SA. Combination therapy with interferon alfa-2a and interleukin-2 for the treatment of metastatic cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:1110-22.
5. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer Immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991-8.
6. Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli CJ. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *Immunol* 2007;178:1975-79.
7. Bracci L, Moschella F, Sestili P, La Sorsa V, Valentini M, Canini I, Baccarini S, Maccari S, Ramoni C, Belardelli F, Proietti E. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clin Cancer Res* 2007;13:644-53.
8. Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F, Sanchez M, Lorenzi S, D'Urso MT, Belardelli F, Gabriele L, Proietti E, Bracci L. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res* 2011;71:768-78.
9. Moschella F, Valentini M, Aricò E, Macchia I, Sestili P, D'Urso MT, Alessandri C, Belardelli F, Proietti E. Unraveling cancer chemoimmunotherapy mechanisms by gene and protein expression profiling of responses to cyclophosphamide. *Cancer Res* 2011;71:3528-39.
10. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011;17:4550-57.
11. Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* 1995;181:193-201.
12. Nisticò P, Capone I, Palermo B, Del Bello D, Ferraresi V, Moschella F, *et al.* Chemotherapy enhances vaccine-induced antitumor immunity in melanoma patients. *Int J Cancer* 2009;124:130-9.