

USO RAZIONALE DELLA CHEMIOTERAPIA IN COMBINAZIONE CON L'IMMUNOTERAPIA DEI TUMORI

Enrico Proietti, Laura Bracci, Federica Moschella

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

Introduzione

Tra le varie discipline mediche, l'immunologia ha avuto un grande impatto sulla qualità della vita dell'uomo, si pensi all'eradicazione del vaiolo, al controllo della poliomielite e dell'epatite virale di tipo B, per citare solo alcuni dei grandi successi. Ma sebbene la vaccinazione profilattica (somministrata prima che la malattia insorga) sia applicata su larga scala in molte malattie infettive, non è ancora facile ottenere una protezione quando i vaccini sono usati come strumenti terapeutici. Una delle grandi sfide degli immunologi contemporanei è diretta a contrastare il cancro dopo la sua insorgenza. Le complesse interrelazioni tra crescita tumorale e ospite, divenute nel corso del tempo sempre più chiare, costituiscono un ostacolo difficile da superare. Tuttavia, la conoscenza sempre più estesa degli antigeni caratteristici delle cellule tumorali e la definizione sempre più accurata dei meccanismi che governano il controllo delle risposte immunitarie cominciano ora a dare i loro frutti e a rendere più concreta la possibilità di affiancare alle correnti terapie del cancro (chirurgia, chemioterapia e radioterapia) anche l'immunoterapia. Il problema principale consiste nel superare l'azione soppressiva che il tumore, crescendo, esercita nei confronti del sistema immunitario (*cancer immunoediting*) (1) e che persiste anche quando il tumore sia stato rimosso. Le strategie per superare questo scoglio sono sostanzialmente basate su due approcci. Un primo approccio prevede il potenziamento delle fasi iniziali della risposta immunitaria al vaccino. Un esempio è dato dall'uso di vaccini somministrati alle cellule dendritiche (DC), cellule deputate a innescare la risposta immunitaria. Queste cellule, prelevate dal paziente, dopo essere state messe in contatto con il vaccino *in vitro*, vengono reinoculate nello stesso soggetto per avviare potenti risposte immunitarie contro il suo tumore. Un secondo approccio prevede l'abbattimento della barriera della immunosoppressione mediante l'uso di chemioterapici somministrati prima della vaccinazione. Questo approccio, ideato nel nostro laboratorio, ha dato risultati sperimentali di notevole rilievo e ha permesso di elaborare nuove strategie terapeutiche che sono, attualmente, al vaglio in diversi *trial* clinici in pazienti oncologici.

Stato di sviluppo

L'effetto paradossale della chemioterapia

Negli anni '90, durante le ricerche condotte nel nostro laboratorio sull'effetto antitumorale della combinazione di interferon alfa/beta con un chemioterapico, il gruppo degli animali di controllo, trattati con la sola ciclofosfamide (CTX), uno dei chemioterapici antineoplastici più diffusi, mostrava che il trattamento era tanto più efficace quanto più grande era il tumore.

Questo comportamento paradossale ha attirato la nostra attenzione. I primi studi, condotti in quegli anni, ci hanno permesso di verificare che la CTX, ben conosciuta anche per le sue proprietà immunosoppressive, poteva ridurre, se somministrata saltuariamente, la immunosoppressione indotta dai tumori. Quanto più grande (entro certi limiti) era il tumore e quindi l'immunosoppressione da esso indotta, tanto maggiore l'effetto di ripristino della risposta immunitaria antitumorale indotto dalla CTX (2). Questi ultimi venti anni, sono stati spesi in gran parte per sostanziare di prove sperimentali questo semplice concetto e per scoprire i meccanismi che ne sono alla base. Il modello sperimentale da noi scelto è stato quello del trasferimento adottivo di linfociti provenienti da animali donatori immunizzati contro un determinato tumore ad animali già ammalati dello stesso tumore (Figura 1). Questo trattamento risulta efficace solo se viene applicato dopo la somministrazione di CTX. Paradossalmente, in questo modello sperimentale, la CTX, nota per avere effetti immunosoppressivi, potenzia la risposta immune trasferita adottivamente al punto da renderla terapeutica e gli animali guariscono definitivamente (3). Anche altri agenti mielotossici, come i raggi gamma possono indurre effetti simili alla CTX e potenziare l'effetto terapeutico del trasferimento adottivo.

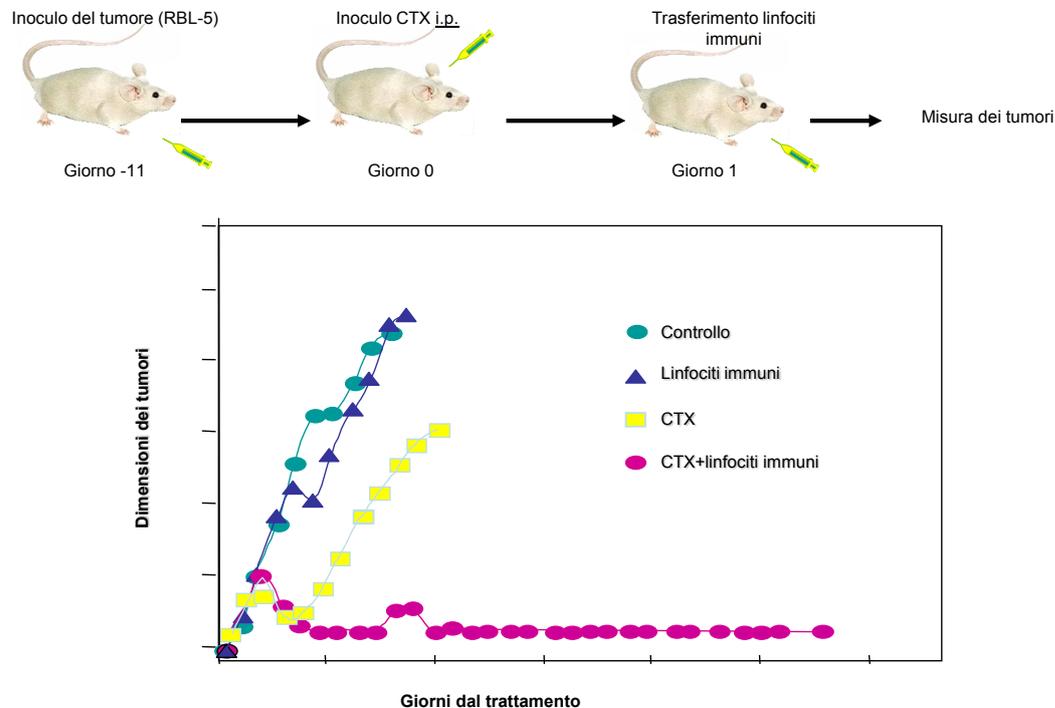


Figura 1. Modello di immunoterapia adottiva dopo CTX

Il rimbalzo omeostatico

Uno degli effetti evidenti della CTX è la sua tossicità verso i globuli bianchi del sangue. Anche un solo trattamento di 100 mg/Kg riduce il numero dei leucociti, ma dopo pochi giorni il loro numero tende a salire anche oltre i valori basali per poi stabilizzarsi definitivamente (Figura 2). In seguito all'azione linfodepletiva, il sistema emo-linfopoietico ritrova il suo equilibrio

attraverso meccanismi omeostatici. La proliferazione dei leucociti danneggiati viene infatti definita “proliferazione omeostatica”.

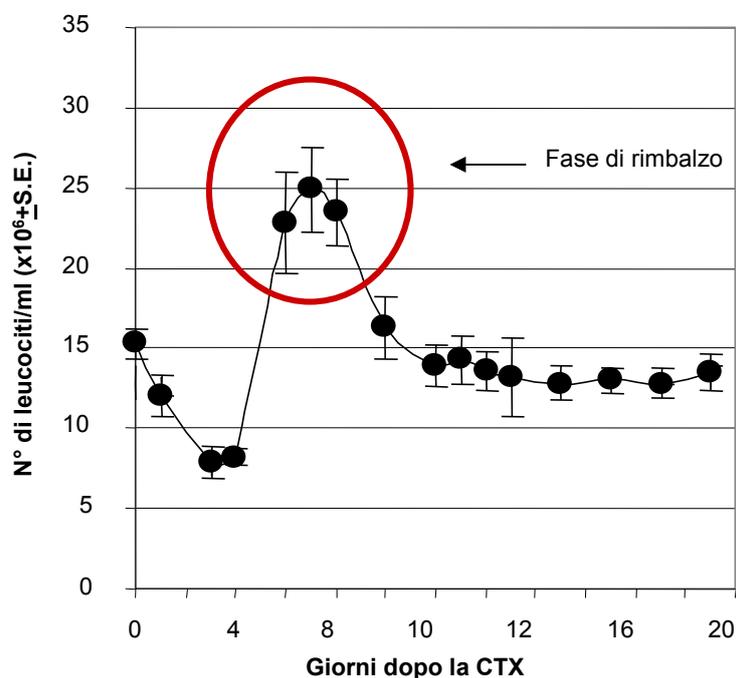


Figura 2. Proliferazione omeostatica dopo linfo-deplezione indotta da CTX

La proliferazione omeostatica coinvolge i linfociti trasferiti adottivamente

L'effetto proliferativo indotto dal danno mielotossico provocato dal breve trattamento chemioterapico agisce anche sulle cellule del sistema immunitario inoculate endovena nel topo portatore di tumore. Gli splenociti trasferiti raggiungono rapidamente gli organi linfoidi secondari (milza e linfonodi) e vanno incontro ad una proliferazione considerevole, misurabile sia con la tecnica della incorporazione di timidina triziata, sia con la tecnica della diluizione del Carboxyfluorescein succinimidile estere (CFSE). Quest'ultima tecnica permette di marcare solo le cellule trasferite adottivamente e di seguire il loro destino negli organi linfoidi e anche nel tessuto tumorale. Infatti, sebbene tutte le cellule del sistema immunitario, trasferite adottivamente vadano incontro a proliferazione omeostatica dopo trattamento del ricevente con CTX, solo i linfociti provenienti da animali immunizzati contro il tumore migrano, colonizzano e proliferano nel letto tumorale dell'animale ricevente e ne determinano il rigetto (4). Di particolare interesse, l'osservazione che per trasferire un'efficace attività antitumorale sono essenziali i linfociti CD4 anche se sono i linfociti CD8 e B a determinare il rigetto del tumore.

La proliferazione omeostatica è indotta da fattori che controllano la risposta immunitaria

Che cosa induce la proliferazione omeostatica dopo il danno mielotossico determinato dal trattamento con CTX? Per rispondere a questa domanda, in uno dei primi esperimenti, abbiamo co-coltivato *in vitro* cellule di midollo osseo di topi trattati con una dose di CTX o trattati con soluzione fisiologica insieme a splenociti provenienti da topi normali o portatori di tumore. Le due colture venivano tenute separate da una membrana semipermeabile che permetteva lo scambio di elementi solubili, anche di elevato peso molecolare, ma non il passaggio di cellule. Soltanto le cellule di midollo osseo di topi trattati un giorno prima con CTX determinavano la proliferazione degli splenociti provenienti da topi portatori di tumore. Quest'effetto non si aveva se i topi erano stati trattati con CTX tre o cinque giorni prima e se gli splenociti provenivano da topi normali. In questo modo abbiamo dimostrato che le cellule di midollo osseo, trattate con CTX rilasciavano fattori solubili in grado di promuovere l'attivazione e la proliferazione di linfociti che avevano incontrato cellule tumorali ma che erano tenuti in uno stato silente dai meccanismi di controllo innescati dal tumore. La produzione di questi fattori, tuttavia, era transitoria e di breve durata (1-2 giorni) (4). I numerosi esperimenti condotti successivamente hanno avuto lo scopo di caratterizzare questi fattori. Tra essi, alcuni come l'interferon di tipo I e l'IL-7 hanno mostrato di avere un ruolo cruciale nel determinare l'effetto terapeutico antitumorale del trasferimento adottivo combinato a chemioterapia (4, 5). Molti altri fattori sono stati caratterizzati attraverso tecniche di *real time* PCR da cellule di midollo osseo, milza o linfonodi. Un'aumentata espressione della maggior parte di essi è stata osservata soprattutto nel midollo osseo dopo 2 giorni dal trattamento *in vivo* con CTX (GM-CSF, IL-1beta, IL-7, IL-2, IL-15, IL-21, IFN-gamma, IL-10 e IL-13) (4). Un'analisi ancor più estesa è stata condotta mediante saggio di *microarray* per valutare la modulazione dell'espressione di circa 13.000 geni sugli stessi tessuti. La valutazione dei risultati ha mostrato che dei circa 400 geni attivati dal trattamento, la maggior parte erano legati al controllo di numerosissime risposte immunitarie, includendo numerose citochine, chemochine e loro recettori, fattori emopoietici e fattori legati alla induzione di apoptosi immunogenica (6).

La ciclofosfamide riduce il numero e l'attività dei linfociti T regolatori

Già alla fine degli anni '80, Bob North aveva ipotizzato e parzialmente dimostrato che la CTX riducesse in modo selettivo l'attività immunosoppressoria nelle risposte immunologiche (7). All'epoca i linfociti T regolatori non erano ancora stati scoperti. Solo di recente François Ghiringhelli, nel laboratorio di Laurence Zitvogel, ha confermato che la CTX riduce effettivamente il numero dei linfociti T regolatori (8). Abbiamo potuto osservare che questo fenomeno avviene anche nei nostri modelli sperimentali. Allo stesso modo la CTX riduce il numero di cellule appartenenti ad un'altra sottopopolazione con proprietà immunosoppressive: le cellule soppressorie di derivazione mieloide (*Myeloid-derived Suppressor Cells*, MDSC) (9).

Anche le cellule dendritiche subiscono l'effetto dei fattori rilasciati durante la proliferazione omeostatica

Tra i fattori che abbiamo provato essere indotti dal trattamento *in vivo* con CTX, alcuni, in particolare il GM-CSF, l'IFN alfa e l'IL-15, hanno un effetto sul differenziamento e la maturazione delle cellule dendritiche (DC) provenienti dai monociti circolanti. In questi ultimi anni le DC hanno assunto un ruolo molto importante nell'attivazione dell'immunità innata e

nell'innescare delle risposte adattative antigeniche specifiche. Il loro ruolo nell'attivare risposte immunitarie efficaci piuttosto che ignorare la presenza di antigeni privi di potenziali effetti dannosi per l'organismo è divenuto sempre più chiaro. È divenuto, così, possibile avviare risposte immunitarie *in vitro* "caricando" le DC ottenute dai monociti circolanti e maturate con un opportuno cocktail di citochine tra cui l'IFN alfa. Le DC, in sostanza, rappresentano i più potenti adiuvanti naturali della risposta immunologica. In un recente studio abbiamo potuto mettere in evidenza che in topi trattati con una dose di CTX l'effetto mielotossico del chemioterapico risparmia le DC e che queste ultime vanno incontro ad un processo maturativo e differenziativo, principalmente mediato da IFN alfa che le rende estremamente efficienti nell'indurre una risposta immunitaria antitumorale, se caricate con antigeni tumorali (9).

La ciclofosfamide induce apoptosi immunogenica delle cellule tumorali e permette il rilascio di antigeni che attivano la risposta immunitaria antitumorale

L'effetto diretto dei chemioterapici sulle cellule tumorali è teso a provocarne l'arresto della crescita o la morte per necrosi o apoptosi. L'apoptosi è un fenomeno per cui le cellule che vanno incontro a morte vengono eliminate senza che i loro detriti provochino infiammazione. Per definizione l'apoptosi non deve indurre risposte immunitarie contro i componenti cellulari. Tuttavia alcuni chemioterapici possono indurre un tipo di apoptosi immunogenica che induce forti risposte immunitarie contro antigeni tumorali, che partecipano, così, al processo di distruzione del tumore (9). La calreticulina e l'HMGB1 sono dei marcatori di apoptosi immunogenica. La CTX induce, *in vivo*, nelle cellule tumorali, nei modelli da noi studiati, l'espressione di questi marcatori. Abbiamo potuto anche dimostrare che cellule tumorali trattate *in vitro* con CTX vanno incontro ad apoptosi immunogenica e, una volta inoculate nel topo, inducono una forte immunità antitumorale che impedisce la crescita delle stesse cellule impiantate successivamente nello stesso animale (9).

Conclusioni e prospettive future

L'insieme degli studi condotti per suffragare la prima ipotesi di interazione sinergica tra chemioterapia e immunoterapia, formulata quasi 20 anni orsono, ha permesso di caratterizzare, in modelli sperimentali murini, un complesso di meccanismi, indotti dalla somministrazione acuta (una singola iniezione) di un particolare chemioterapico, la ciclofosfamide, facente parte della famiglia degli agenti alchilanti. L'elemento centrale di questo quadro è costituito dalla percezione di danno che il sistema emopoietico riceve dal trattamento chemioterapico. I meccanismi di controllo omeostatico del sistema emopoietico si attivano molto rapidamente (già dopo 24 ore, a livello molecolare) per mettere in atto meccanismi di riparazione che possono coinvolgere nella loro azione una risposta immunitaria nascente, indotta contro determinati antigeni. La tempesta citochinica risultante agisce attivando le numerose sottopopolazioni del sistema immunitario coinvolte nella risposta attiva, come i linfociti T *helper*, i linfociti T citotossici, i linfociti B e le cellule dendritiche, e riducendo l'azione dei linfociti T regolatori e delle MDSC dotati di azione soppressiva. L'induzione di apoptosi immunogenica delle cellule tumorali e il conseguente rilascio di antigeni tumore-associati, unitamente al potenziamento delle cellule professionali presentanti l'antigene (DC) determina un incremento della risposta immune naturale, seguito da un successivo ulteriore potenziamento di quella adattativa,

sostenuto dalla tempesta citochinica e dalla riduzione dei meccanismi di regolazione negativa (Figura 3).

Tutto questo si traduce nella trasformazione di una risposta immunitaria antitumorale, presente ma non efficiente, in una risposta immunitaria terapeutica capace di superare i meccanismi di *tumor escape* messi in atto dal processo di *tumor editing* indotto durante la crescita tumorale.

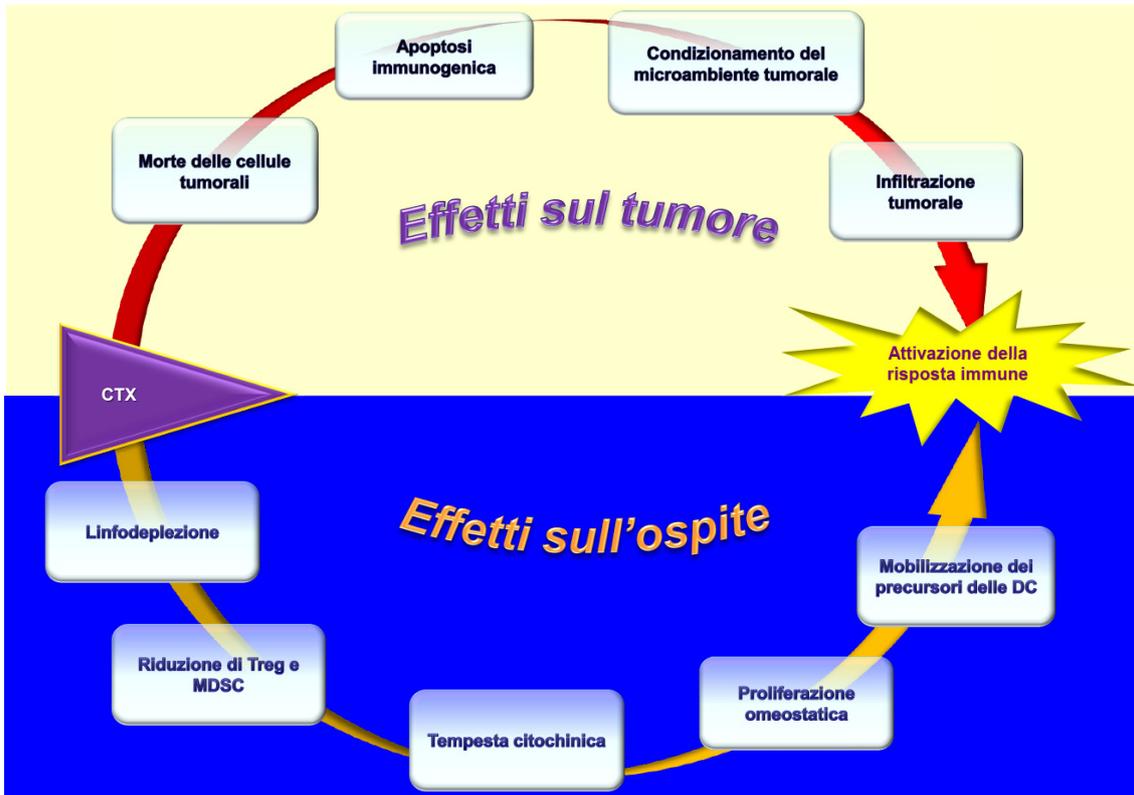


Figura 3. Rappresentazione schematica dei complessi meccanismi responsabili dell'effetto "immunoadiuvante" della CTX

La conoscenza dei meccanismi di interazione tra chemio e immunoterapia permetterà di disegnare nuovi protocolli di immunoterapia per la prevenzione secondaria della recidiva tumorale e per il trattamento di malattie infettive croniche. Le strategie prevedibili possono essere le seguenti:

- trasferimento adottivo di linfociti immuni contro il tumore un giorno dopo chemioterapia;
- somministrazione di vaccini peptidici o derivati da cellule tumorali un giorno dopo chemioterapia;
- iniezione intraliesionale di DC autologhe un giorno dopo chemioterapia.

Bibliografia

1. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011;331:1565-70.
2. Proietti E, Tritarelli E, Gabriele L, *et al.* Combined interleukin 1 beta/interleukin 2 treatment in mice: synergistic myelostimulatory activity and protection against cyclophosphamide-induced myelosuppression. *Cancer Res* 1993;53:569-76.
3. Proietti E, Greco G, Garrone B, Baccarini S, Mauri C, Venditti M, Carlei D, Belardelli F. Importance of cyclophosphamide-induced bystander effect on T cells for a successful tumor eradication in response to adoptive immunotherapy in mice. *J Clin Invest* 1998;101:429-41.
4. 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.
5. Schiavoni G, Mattei F, Di Pucchio T, *et al.* Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood* 2000;95:2024-30.
6. 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.
7. Awwad, M. & R.J. North. Cyclophosphamide (Cy)-facilitated adoptive immunotherapy of a Cy-resistant tumour. Evidence that Cy permits the expression of adoptive T-cell mediated immunity by removing suppressor T cells rather than by reducing tumour burden. *Immunology* 1988;65:87-92.
8. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004;34:336-44.
9. 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.