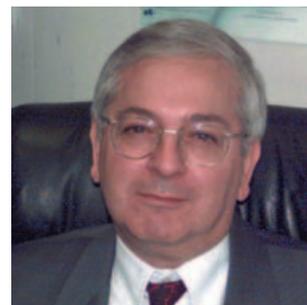


## Ingegneria genetica e nuove strategie di immunoterapia dei tumori



Paola Rizza, Maria Ferrantini, Imerio Capone e **Filippo Belardelli**

*Laboratorio di Virologia, ISS*

**L**a scoperta del DNA e delle tecniche di manipolazione genetica hanno fornito, in questi ultimi decenni, un potente strumento per il progredire delle conoscenze in tutti i settori della ricerca biomedica. In particolare, l'avvento delle tecniche di ingegneria genetica ha permesso di studiare e comprendere più a fondo quali sono i meccanismi che inducono l'insorgenza dei tumori, al fine di individuare strategie idonee per combatterli.

Verso la fine degli anni '70, i risultati di un insieme di studi nei modelli animali (tumori sperimentali del topo) avevano portato alla progressiva comprensione dell'importanza del sistema immunitario nel controllo dell'insorgenza e della progressione di tumori. Inoltre, studi su pazienti portatori di tumori indicavano lo sviluppo preferenziale di alcuni tipi di neoplasie in soggetti che mostravano scarse difese immunitarie, cioè immunodepressi. Più di recente, sono stati identificati dei marcatori presenti sulle cellule tumorali, denominati antigeni tumorali o tumore-associated, che contraddistinguono le cellule malate da quelle sane e che sono dei potenziali bersagli per il sistema immunitario. La scoperta di risposte immuni contro tali antigeni in pazienti oncologici ha fornito una solida base scientifica per lo sviluppo di nuove terapie basate sull'uso di sostanze, denominate citochine, che agiscono sul sistema immunitario (immunoterapia). Attualmente gli interferoni (IFN) di tipo I, in particolare l'IFN- $\alpha$ , rappresentano le citochine più ampiamente utilizzate nell'uomo per la terapia di alcuni tumori. Gli IFN di tipo I sono stati scoperti alla fine degli anni '50 come una miscela

di sostanze naturali prodotte dalle cellule in risposta alle infezioni virali e dotate di una potente attività antivirale. Solo di recente sono state individuate nuove attività potenzialmente importanti per lo sviluppo di applicazioni cliniche in campo oncologico.

Verso la metà degli anni '70, quando presso l'ISS sono iniziati i primi studi sull'attività biologica degli IFN, suscitava scetticismo da parte di ampi settori della comunità scientifica il fatto che preparazioni di queste citochine, prodotte mediante la stimolazione di colture cellulari con virus e successive fasi di purificazione, esercitassero effetti biologici aggiuntivi a quelli classici di inibizione della replicazione virale. Una svolta determinante per chiarire in modo inequivocabile la specificità delle molte attività biologiche degli IFN è stata possibile solo in seguito all'avvento dell'ingegneria genetica. L'isolamento dei diversi geni che codificano per gli IFN (clonaggio) e il loro inserimento in microrganismi per l'espressione proteica ha permesso, infatti, di produrre queste citochine su

“ Le tecniche di ingegneria genetica hanno permesso di studiare i meccanismi dell'isorgenza dei tumori ”

vasta scala e di caratterizzarne le proprietà biologiche. Già da diversi anni, citochine ricombinanti, quali gli IFN, l'IL-2 o il GM-CSF, sono prodotte in batteri e usate in protocolli di immunoterapia di pazienti oncologici. Le tecniche di ingegneria genetica hanno inoltre rivoluzionato gli approcci della ricerca sperimentale, permettendo, ad esempio, di valutare gli effetti del trasferimento di alcuni geni, inclusi quelli per alcune citochine, in cellule tumorali. Idealmente, il trasferimento genico di una determinata sostanza all'interno di una cellula maligna a scopo terapeutico (terapia genica) può alterare il comportamento della stessa cellula in modo da modificarne

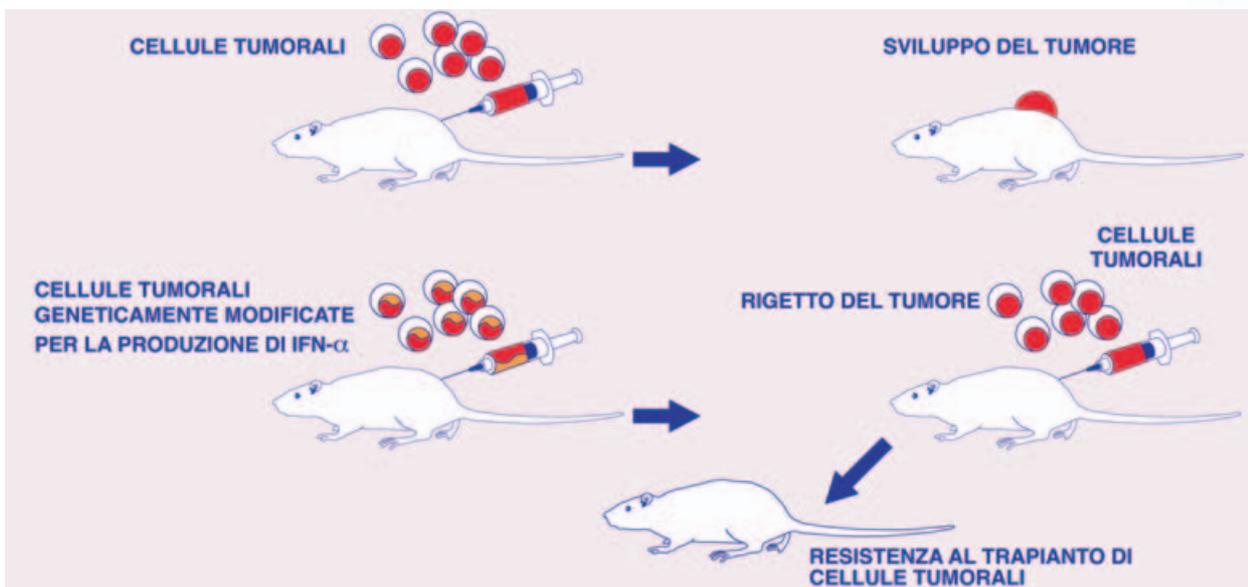
la capacità proliferativa o di invasione, oppure può provocare la produzione di sostanze (quali le citochine) che agiscono sulle cellule del sistema immunitario dell'ospite in modo tale da innescare un processo di rigetto del tumore.

Una linea di ricerca sviluppata all'Istituto dal nostro gruppo è stata quella di trasferire geni per gli IFN di tipo I in cellule tumorali di topo o umane al fine di studiare in sistemi sperimentali il comportamento delle cellule geneticamente modificate e producenti le citochine. I primi esperimenti utilizzando l'IFN- $\alpha$ , sono stati condotti in modelli di tumori sperimentali nel topo. Le cellule di un particolare tipo di tumore, ad esempio una eritroleucemia o un adenocarcinoma, sono state geneticamente modificate introducendo il gene che codifica per l'IFN- $\alpha$ , attraverso l'uso di vari vettori (agenti che fungono da "navetta" per il trasporto del gene all'interno della cellula). Questa manipolazione rende le cellule capaci di produrre l'IFN- $\alpha$ . Tali cellule, inoculate in topi immunocompetenti, dotati cioè di un sistema immunitario funzionale, si comportavano diversamente rispetto alle cellule tumorali parentali non modificate. Infatti, queste ultime formavano una massa tumorale nel sito di inoculo, mentre le cellule tumorali producenti IFN- $\alpha$  non attecchivano, cioè venivano rigettate. Inoltre, gli animali che erano stati inoculati con le cellule geneticamente modificate risultavano protetti da un secondo inoculo con le cellule tumorali parentali. Questa osservazione dimostrava che l'effetto della produzione di IFN- $\alpha$  da parte delle cellule tumorali non era tanto quello di modificare la capacità intrinseca di tali cellule di proliferare, quanto invece quello di stimolare nei

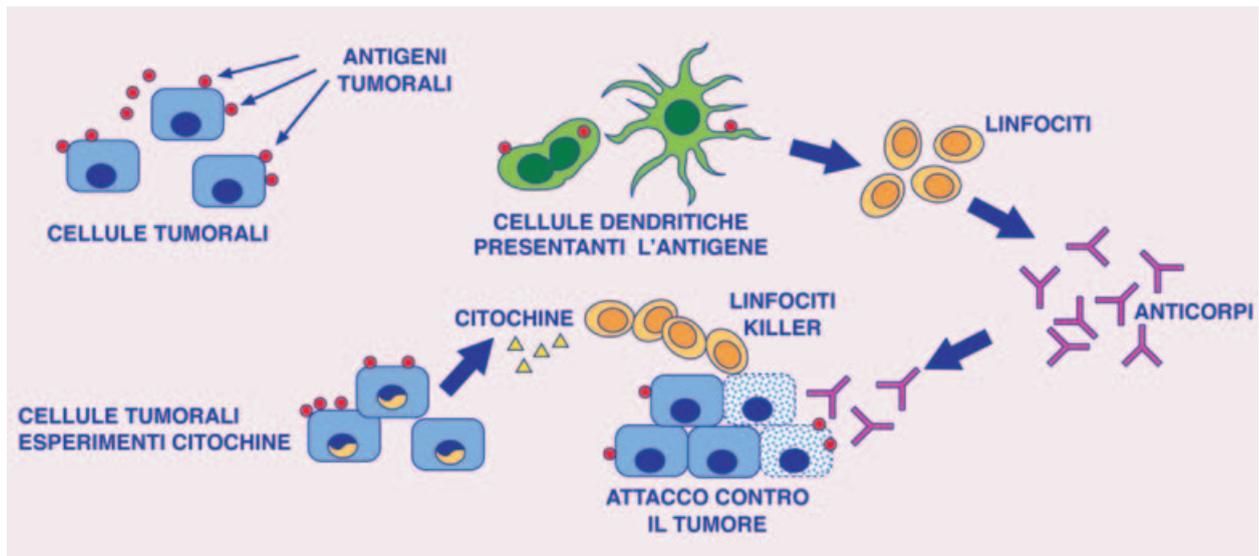
topi una risposta protettiva in grado di conferire immunità al tumore. La Figura 1 mostra uno schema esemplificativo del modello sperimentale descritto.

Tale sperimentazione ha dimostrato attività nuove e potenzialmente importanti di IFN- $\alpha$ : la capacità di indurre un'immunità contro patogeni e tumori attraverso meccanismi diversi, che includono l'attivazione di cellule del sistema immunitario, quali i linfociti, e di particolari cellule dell'organismo denominate cellule dendritiche (DC), che svolgono un ruolo fondamentale nella presentazione degli antigeni ai linfociti e quindi nell'induzione di una risposta immune protettiva. L'insieme di questi risultati ha portato il nostro gruppo a considerare tali citochine come adiuvanti (sostanze che potenziano la risposta immune) per lo sviluppo di vaccini contro il cancro.

L'obiettivo di un vaccino antitumorale è quello di provocare l'attacco del tumore da parte dei sistemi di difesa dell'organismo. A differenza della maggior parte dei vaccini contro le malattie infettive, la vaccinazione contro il cancro è generalmente terapeutica, cioè diretta ad attivare risposte difensive in un organismo già portatore di tumore. Le ricerche miranti allo sviluppo di vaccini contro il cancro non hanno finora portato a un trasferimento clinico corrente in pazienti oncologici. In generale, si può sostenere tuttavia che un avanzamento sostanziale delle prospettive di realizzazione di vaccini antitumorali è stato possibile grazie a due tipi di ricerche condotte in questi ultimi 15 anni: le ricerche che hanno portato all'identificazione di nuovi antigeni tumorali nell'uomo, fornendo nuovi reagenti per lo sviluppo di vaccini antitumorali; il complesso di sperimentazione su cellule tumorali geneticamente modificate per la produzione di citochine, che



**Figura 1** - L'inoculo di cellule tumorali producenti IFN- $\alpha$  genera nei topi uno stato di immunità al tumore



**Figura 2** - Lo schema mostra i meccanismi immunologici innescati da alcuni vaccini anti-tumorali: vaccini costituiti da cellule tumorali o da antigeni tumorali o da cellule dendritiche "caricate" con antigeni tumorali

ha permesso di comprendere come il sistema immunitario può essere orientato verso una risposta protettiva contro i tumori.

Nella Figura 2 sono illustrati i meccanismi immunologici che dovrebbero essere innescati da un vaccino antitumorale. Vaccini costituiti da cellule tumorali modificate attraverso le tecniche di ingegneria genetica, per la produzione di sostanze in grado di manipolare la risposta immunitaria, quali alcune citochine, sono già stati sperimentati nell'uomo in studi clinici preliminari. Altri tipi di vaccini terapeutici sviluppati recentemente si basano sull'impiego degli antigeni tumorali come potenziali bersagli contro cui scatenare il sistema immunitario. Risposte efficaci sono state ottenute contro diversi tipi di tumori in modelli sperimentali, mediante vaccinazione con microrganismi non patogeni geneticamente modificati per contenere l'antigene tumorale di interesse.

I risultati finora disponibili indicano la necessità di considerare l'associazione tra più strategie per aumentare l'efficacia dei diversi approcci vaccinali finora sperimentati. In questo senso, l'uso di citochine ad attività adiuvante, in grado cioè di potenziare la risposta immunitaria, appare particolarmente promettente per lo sviluppo di protocolli di vaccinazione antitumorale nell'uomo. In tale ambito, il nostro gruppo, sulla base di risultati di ricerche precliniche condotte in ISS soprattutto in questi ultimi 15 anni, ha recentemente promosso l'avvio di uno studio clinico di vaccinazione di pazienti con melanoma mediante l'uso di antigeni tumore-associati in combinazione con IFN- $\alpha$ , utilizzato in questo protocollo per la prima volta come adiuvante del vaccino stesso. Un altro approccio di emergente interesse è costituito dall'uso di DC del pa-

ziente portatore del tumore, caricate con antigeni tumorali o geneticamente modificate per esprimere l'antigene tumorale di interesse. In particolare, studi condotti dal nostro gruppo in modelli preclinici hanno dimostrato l'efficacia di vaccini cellulari costituiti da DC preparate mediante l'uso di IFN nella stimolazione di una risposta immune protettiva, aprendo nuove prospettive di utilizzo di queste preparazioni per la vaccinazione terapeutica in pazienti oncologici.

Infine, risultati di potenziale interesse per lo sviluppo di vaccini profilattici contro il cancro, in grado cioè di prevenire l'insorgenza del tumore, sono stati ottenuti in sistemi sperimentali mediante vaccinazione a DNA, cioè lo stesso materiale genetico che utilizza l'organismo per "fabbricare" l'antigene contro cui si vuole generare una risposta protettiva.

L'identificazione di nuovi antigeni tumore-associati e la comprensione dei meccanismi tumorali di evasione dal controllo immunologico offriranno, parallelamente al progredire delle conoscenze dell'immunologia di base, ulteriori possibilità per lo sviluppo di vaccini contro il cancro. Il progresso della ricerca di nuovi interventi terapeutici per la lotta contro il cancro sta ricevendo attualmente un grande impulso dalla recente invenzione di un potente dispositivo tecnologico: i *microarray* a DNA, noti anche come *chip* genici. Questi strumenti di ricerca stanno contribuendo a farci capire che cosa accade a livello molecolare in caso di malattia e nel contempo stanno facilitando la scoperta di nuovi farmaci e di antigeni tumorali. L'applicazione di questo mezzo di indagine in campo oncologico genererà nuove conoscenze che saranno cruciali per l'individuazione di nuovi reagenti e modalità d'intervento e per la loro traduzione in applicazioni cliniche innovative.