PRINCIPI DI IMMUNOTERAPIA DEI TUMORI

A cura del **Dr Vincenzo Ricci** (medico-chirurgo specialista in oncologia) e della **Drssa Teresa Fabozzi** (medico-chirurgo specialista in oncologia)

L'immunoterapia agisce tramite l'uso di farmaci volti a ripristinare la normale attività antitumorale del sistema immunitario, patologicamente silenziato grazie a svariati meccanismi di "escape" immunologico messi in atto dal tumore stesso.

Le molecole immuno-checkpoints sono coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi immunologica contribuendo a mantenere la tolleranza periferica verso le molecole self. In un perfetto esempio di equilibrio stocastico queste molecole riescono ad aumentare od inibire il sistema immunitario. Attraverso la regolazione di questi checkpoint, coinvolti nei meccanismi di regolazione della tolleranza immunitaria, il tumore evade la sorveglianza immunitaria dell'ospite. Esistono sia molecole co-inibitorie come CTLA-4,PD-1,LAG-3 e sia molecole co-stimolatorie come OX40,CD134,CD137,TNFRSF4. I checkpoint immunitari maggiormente oggetto di studio negli ultimi anni sono l'antigene 4 dei linfociti-T attivati (CTAL-4) ed il sistema costituito da anti-programmed cell death protein 1 (PD-1) ed il suo ligando PD-L1. (1)

CTLA-4 regola l'attività dei linfociti prevalentemente nelle fasi precoci della malattia tumorale, mentre PD-1 limita l'attività delle T cells nel microambiente tumorale nelle fasi più avanzate della crescita della malattia.

Programmed Death Receptor-1 (conosciuto come PD-1) è un recettore di superficie cellulare che appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline correlate al CD28 e CTLA-4, ed è uno dei più importanti co-recettori inibitori espressi dalle cellule T. Ha dimostrato di avere un effetto di regolazione repressiva sul recettore per l'antigene attraverso il legame con i suoi ligandi, PD-L1 e/o PD-L2.

PD-1 è espresso su cellule T,B,monociti,cellule Natural Killer (NK), cellule dendritiche e molti linfociti infiltranti il tumore (TILs). Inoltre è espresso anche sulle cellule T regolatorie (Treg) ed è in grado di stimolare la proliferazione dei Treg contenendo la risposta immunitaria.

PD-1 ha due ligandi: PD-L1 (detto anche B7-H1) e PD-L2 (B7-DC) che sono entrambi co-inibitori. PD-L1 è espresso sulle restanti cellule T,cellule B, cellule dendritiche,macrofagi, cellule dell'endotelio vascolare e delle insule pancreatiche. L'espressione di PD-L2 è stata osservata su macrofagi e cellule dendritiche ed è decisamente meno prevalente di PD-L1 nei diversi tipi di tumore. PD-L1 è espresso in vari tipi di cancro, specialmente NSCLC, melanoma, carcinoma renale, gastrico, epatocarcinoma, tumori cutanei, varie leucemia, mieloma multiplo. L'espressione di PD-L1 è indotta da numerose molecole pro-infiammatorie come INF-gamma, TNF-alfa,VEGF,GM-CSF. Tramite l'espressione di PD-L1, il microambiente tumorale promuove l'immuno-soppressione. Il pathway di PD-1 e PD-L1 regola l'immunosoppressione con multipli meccanismi:

- Induce l'apoptosi delle cellule T attivate
- Facilita l'anergia e l'esaurimento delle cellule T (l'esaurimento dei TILs nel microambiente tumorale è strettamente correlato all'espressione di PD-L1 delle cellule tumorali

- Esalta al funzione delle cellule T regolatorie (generazione di Tregs indotta da down-regulation di mTOR,AKT e l'aumento di PTEN. Bloccando il pathway PD-1/PD-L1 è possibile incrementare la funzione dei T effettori CD8 e inibire la funzione dei Tregs con incremento della risposta antitumorale
- Inibisce la proliferazione delle cellule T
- Controlla la produzione di IL-2 : PD-1/P-L1 blocca i segnali a valle indotti dal legame di Ag MHC e T Cell Receptors (TCR) e la co-stimolazione attraverso CD28, con conseguente attivazione di cellule T danneggiate e produzione di IL-2. Inoltre il segnale attraverso PD-1 previene anche la conversione delle cellule T memory funzionali CD8+ in cellule CD8+ memory centrali e di conseguenza riduce la memoria immunitaria a lungo termine. (2)

L'interazione tra PD-1 e PD-L1 gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'omeostasi tumorale e della risposta immunitaria. PD-1 è normalmente espresso sule cellule T attivate e il suo legame con il ligando PD-L1 determina la soppressione della risposta immunitaria. PD-1 è un recettore appartenete alla famiglia delle immunoglobuline B7-CD28 ed è normalmente espresso su linfociti dell'infiltrato tumorale (TL), cellule natural killer,cellule mononucleate e cellule dendritiche.

Le cellule tumorali possono eludere la loro distruzione da parte del sistema immune (immuno-escape) attraverso molteplici meccanismi, che includono l'espressione sulla loro superficie cellulare di molecole ad attività immunosoppressiva, la secrezione di fattori di crescita immunosoppressori ed il reclutamento di una popolazione di cellule immunitarie ad attività soppressoria (linfociti Treg) nel microambiente tumorale.

L'immunoediting è una sorta di rimodellamento continuo delle caratteristiche antigeniche del tumore da parte del sistema immunitario dell'ospite. Nell'ambito del fenomeno di immunoediting si distinguono tre fasi nell'interazione tra tumore ed ospite:

1) L'eliminazione di cloni fortemente immunogenici, che corrisponde al classico concetto di immunosorveglianza
2) Fase di equilibrio in cui il sistema immunitario seleziona varianti tumorali con aumentata capacità di resistere alla risposta immunitaria
3) Fase di escape attraverso il quale i cloni tumorali rimodellati dal sistema immunitario si espandono in modo incontrollato portando allo sviluppo del tumore. (3,4)

I principali meccanismi mediante cui i tumori divengono in grado di superare le difese immunitarie sono rappresentati da:

- **Riduzione o perdita dell'espressione sulla superficie cellule di molecole HLA (complessi di istocompatibilità - MHC) di classe I** e conseguente mancato riconoscimento della cellula da parte dei linfociti I citotossici. Esistono due molecole che appartengono al complesso HLA di tipo I e che hanno funzioni opposte. MICA che è una molecola alla famiglia delle Heat-Shoch Proteins (HSP), attraverso la quale il sistema immunitario può riconoscere e distruggere cellule danneggiate o trasformate. HLA-G è una molecola che media un potente segnale negativo che permette al tumore di sfuggire all'immunosorveglianza. Le cellule che esprimono sulla loro superficie HLA compatibili non vengono attaccate. Se gli antigeni HLA sono debolmente espressi, come nel caso di cellule

tumorali, il sistema si attiva e le cellule vengono distrutte (sorveglianza immunologica). La perdita di molecole HLA di classe I, da un lato rappresenta un meccanismo di escape antigene-dipendente nei confronti dei linfociti citotossici CD8+, ma dall'altra parte può incrementare la suscettibilità alla citotossicità da parte delle NK.

- **Riduzione nell'espressione di antigeni tumorali immunogenici e assente espressione di molecole co-stimolatorie con conseguente anergia o induzionedell'apoptosi dei linfociti T:**
  Le proteine MHC-I sono a sua volte associate a ICAM-1. ICAM-1 e MHC-I sono i rispettivi ligandi di LFA-1 e TCR (T cell receptor). ICAM-1 è una glicoproteina di membrana appartenente alla famiglia delle immunoglobuline ed espressa su linfociti,cellule endoteliali,piastrine,fibroblasti,cellule epiteliali,gliali e periciti. E' espresso sia su cellule T che su APC e può funzionare da recettore co-stimolatorio su APC. ICAM-1 è co-stimolatorio dei CD8+ attraverso LFA-1. Questa glicoproteina è coinvolta nell'importante meccanismo di "Transendothelial migration" (TEM) o diapedesi, evento chiave nello sviluppo di infiammazione e metastatizzazione tumorale. ICAM-1 favorisce il traffico di linfociti attraverso la barriera vascolare. Si arriva alla stimolazione di integrine leucocitarie quali LFA-1 e MAC1 che legano il ligando endoteliale ICAM-1. La migrazione leucocitaria dipende dall'interazione tra citoscheletro e proteine transmembrana di adesione (integrine,caderine e molecole di adesione cellulare). L' upregulation di ICAM-1 può aumentare l'invasività e la capacità di metastatizzazione da parte delle cellule tumorali promuovendo l'adesione tra le cellule tumorali e le cellule endoteliali vascolari o del circolo linfatico. La maggior espressione sul fronte tumorale potrebbe essere dovuto al TNF-alfa. La mancanza di ICAM-1 sulle APC può causare scarsa attivazione e proliferazione delle cellule T. ICAM-2 è anch'essa importante per la ricircolazione dei leucociti attraverso l'endotelio di tessuti non infiammati. ICAM-2 è membro della superfamiglia delle immunoglobuline e gioca un ruolo essenziale nell'interazione tra cellule dendritiche (DC) e cellule T, il trasporto di DC attraverso le barriere endoteliali e l'inibizione dell'apoptosi.
  PD-L1 (B7-H1) è il ligando del recettore PD-1 sulla superficie delle cellule T ed è nota per regolare negativamente l'attivazione delle cellule T. L'up-regulation delle inibitorie B7 rappresenta un importante strategia immunosoppressiva di escape da parte delle cellule tumorali.(5)
  CTLA-4, membro della superfamiglia delle immunoglobuline, molecola co-inibitoria espressa sulla superficie dei linfociti T Helper (segnale inibitorio in seguito a legame con B7-1 e B7-2 sulla superficie di APC) funzionando come immune check-point (anticorpi antagonisti di CTLA-4 come Ipilimumab e Tremelimumab) (6)
- **Stimolazione del sistema enzimatico di IDO** (enzima coinvolto nel catabolismo del triptofano). La deplezione e l'impoverimento del microambiente cellulare del triptofano, necessario ai linfociti T effettori per proliferare ed espandersi, causa un effetto inibitorio sulla risposta immunitaria. La sua stimolazione inoltre causa la produzione di cataboliti che causano l'apoptosi dei linfociti T helper ed inoltre stimola la differenziazione di cellule T naive in cellule Treg (così come TGF-b,VEGF, IL10), contribuendo allo spegnimento della risposta immunitaria. Il legame CTLA4/B7 nella cellula dendritica amplifica l'espressione di IDO.
- **Stimolazione del sistema enzimatico di ARG** (enzima in grado di convertire arginina ed ornitina in urea). Questo sistema enzimatico può svolgere un ruolo critico nell'attività immunosoppressiva da parte del tumore attraverso le cellule soppressorie di derivazione mieloide indotte dal tumore (MDSCs). L'attivazione delle MDSCs rappresenta un importante meccanismo di immunoescape

- **Produzione di molecole che inibiscono direttamente la funzione macrofagica e linfocitaria.**
  Induzione di fattori immunosoppressori come IL-10, TGF-beta, TNFalfa e VEGF che sono in grado di inibire la maturazione, il traffico e la differenziazione delle DC e la presentazione dell'antigene.
  Il TGF-beta è un membro di una famiglia di citochine altamente conservate e connesse con funzioni pleiotropiche, coinvolta in molteplici processi fisiologici, tra cui immunoregolazione. TGF-beta regola la crescita, la differenziazione o il funzionamento di quasi tutti i tipi di cellule tra cui linfociti e monociti. TGF-beta è un potente regolatore di proliferazione cellulare endoteliale / angiogenesi e uno stimolatore di formazione di matrice extracellulare mediante azione diretta o stimolando altre cellule a secernere citochine / chemochine che stimolano queste attività. Le NK possono secernere TGF-beta e mentre TGF-beta ha poco o nessun effetto sulla capacità citolitica delle cellule NK già attivate, l'espansione e la generazione di cellule NK con capacità citolitica è inibita dal TGF-b attivo.
  TGF-b1 è un potente fattore chemiotattico per le cellule polimorfonucleati (PMN) e monociti. Inibisce PMN-transmigrazione, la down-regulation di E-selectina sulle cellule endoteliali e da una riduzione di IL-8 sintesi, e ha effetti sullo stato di maturazione di monociti / macrofagi e DC. I tumori possono eludere la sorveglianza immunitaria producendo la citochina immunosoppressiva TGF-beta. TGF-beta gioca un ruolo critico nella generazione / conversione extratimica delle cellule Treg sia attraverso meccanismi diretti o indiretti. Lo dimostra la conversione diretta delle cellule Treg da parte del TGF-beta derivato dal tumore. Il meccanismo indiretto comporta l'induzione delle cellule dendritiche immature da parte del TGF-beta derivato dal tumore, che a sua volta incrementa la conversione delle cellule Treg. Le cellule tumorali possono eludere il sistema immunitario, mediante la conversione delle cellule Treg, attraverso la produzione di alti livelli di TGF-beta.
  L'interleuchina-2 è una citochina prodotta dai linfociti T attivati, in grado di stimolarne la crescita e l'espansione cellulare. Agisce da modulatore del sistema immunitario in grado di stimolare i linfociti CTL e le cellule NK. Grazie all'attivazione e l'espansione dei Treg può favorire il meccanismo di immunoescape e quindi la progressione tumorale (azione principale sulla produzione di cell Treg a livello del timo). L'azione terapeutica dell'IL-2 nei pazienti affetti da tumore pertanto dipende dal bilanciamento tra attivazione ed espansione delle cell T effettrici rispetto alle cell T regolatorie. L'esperienza dello studio di fase III Golfig-2 ha dimostrato, in pazienti affetti da mCRC, che un regime di CT di I linea con Folfox+Gemcitabina+GM-CSF+IL-2 a basse dosi (0.5MIU) è in grado di aumentare le risposte,la PFS e con trend favorevole in OS rispetto alla CT tradizionale con FOLFOX.
  Il legame di PD-L1 con il recettore PD-1 è in grado di downregolare il segnale attivante del TCR e annullare la produzione di citochine stimolatorie come l'IL-2.
- **Induzione/espansione di cellule immunosoppressive Tregs cells (CD3+,CD4+,CD25+,Foxp3) ed MDSCs**
- **Mediante la ridotta espressione di chemochine (citochine chemotattiche).** CCL22,CCL5,CXCL8 e CCL28 contribuiscono allo stimolo direzionale dei leucociti ed al traffico dei Tregs. CCL28 è anche chiamata MEC (chemochina epiteliale associata alla mucosa). La soppressione dei livelli di CCL28 può rappresentare un meccanismo di escape nei confronti dell'infiltrato leucocitario nel tumore. CCL28 è up-regolata dall'ipossia attraverso HIF-alfa. A sua volta la condizione ipossica recluta Tregs e promuove la progressione tumorale.

L'impiego degli Ab monoclonali in grado di bloccare molecole dell' immuno-checkpoint ad attività inibitoria, come CTLA-4 e PD-1, può incrementare la risposta immunitaria contro il tumore.(7)

Tuttavia l'inibizione di tali molecole dell'immuno-chekpoint può portare a squilibri nella tolleranza immunologica che possono causare una risposta incontrollata. Pertanto possono manifestarsi degli eventi avversi immuno-relati (irAEs) a causa di danni verso organi e tessuti come la cute, l'apparato gastroenterico, fegato, polmone, apparato mucocutaneo e sistema endocrino. Altre cellule immunitarie possono svolgere un ruolo nello sviluppo di irAEs come linfociti B e granulociti in grado di produrre mediatori infiammatori e citochine. In generale la tossicità dei farmaci anti-PD1/PD-L1 (circa 7-12% AEs grado 3-4) appare meno comune e severa degli anti-CTLA-4 (circa 10-18% AEs grado 3-4).Gli eventi avversi generici più comuni sono costituiti da astenia,febbre,brividi,reazioni infusionali. I più comuni eventi avversi organo-specifici sono costituiti da un rash maculopapulare, follicolare, dermatite orticarioide, prurito,vitiligine (in circa 34% dei pz che ricevono nivolumab e circa 39% dei pz che ricevono pembrolizumab). Diarrea/coliti (di grado 3-4 circa il 5% con farmaci anti-CTLA-4 ed 1-3% con anti-PD-1/PD-L1) insorgono generalmente dopo 6-8 settimane dopo l'inizio del trattamento. Consigliata in caso di casi severi terapia con corticosteroidi e addizionali immunosoppressori con anti-TNF come infliximab (5mg/Kg), quest'ultimo consigliato se i corticosteroidi appaiono meno efficaci nei primi 3 giorni (nuova dose di infliximab dopo 3 settimane in caso di persistenza dei sintomi). Sindromi endocrine come ipofisite (incidenza di 1-6% con farmaco anti-PD1/PD-L1), ipotiroidismo,ipertiroidismo,tiroidite e insufficienza surrenalica. Tossicità epatica con incremento delle transaminasi (AST, ALT) (circa 1-2% di grado 3-4 con anti-PD-1/PD-L1). Polmoniti sono descritte in <10% di paz trattati con anti-PD-1/PD-L1 (in casi gravi richiesta ospedalizzazione, terapia con corticosteoidi ev ed altri farmaci immunosoppressori come infliximab,ciclofosfamide o micofenolato mofetile). Sono stati riscontrati isolati casi di miastenia grave, mieliti trasverse, neuropatia enterica, meningiti asettiche e casi di sindrome di Guillain-Barre. Riscontrate inoltre nefriti interstiziali, pancreatiti ed incremento delle lipasi. (8)

BIBLIOGRAFIA

1. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity. 2004 Aug;21(2):137-48. Review.
2. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. Nat Rev Immunol. 2006 Oct;6(10):715-27.
3. Vesely MD, Schreiber RD. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. Ann N Y Acad Sci. 2013 May;1284:1-5.
4. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol. 2004;22:329-60. Review.
5. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. Curr Opin Immunol. 2012 Apr;24(2):207-12
6. O'Day SJ, Hamid O, Urba WJ. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. Cancer. 2007 Dec 15;110(12):2614-27.
7. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22;12(4):252-64.
8. Naidoo J, Page DB, Li BT, Connell LC et al Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. Ann Oncol. 2015 Dec;26(12):2375-91.