



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DISPENSE DI IMMUNOPATOLOGIA
CORSO DI FISIOPATOLOGIA E PATOLOGIA GENERALE,
LAUREA MAGISTRALE BIOLOGIA DELLA SALUTE E NUTRIZIONE

PARTE 3 di 3

Docente
Prof. ADRIANO ANGELUCCI

ANNO ACCADEMICO
2017-2018

IMMUNOLOGIA DEI TUMORI (LEZIONE 19-04-18)

I tumori sono stati sempre studiati indipendentemente dal sistema immunitario, questo non significa che nella storia della biologia e della medicina non ci sia stato qualcuno che abbia proposto una possibile interazione tra i due aspetti.

- 1) Le prime evidenze suggeriscono che il sistema immunitario è coinvolto nella sorveglianza anche verso i tumori: nel 1800, quando il funzionamento del sistema immunitario era ancora ampiamente sconosciuto William Coley descrisse una modalità “anomala” per il trattamento del tumore: la cura consisteva nella somministrazione di agenti patogeni, di batteri, in particolare dello *Streptococcus pyogenes* (patogeno gram-positivo) e *Serratia marcescens* (patogeno facoltativo gram-negativo) mix di batteri in grado di indurre una forte risposta immunitaria. Il trattamento venne chiamato la “tossina di Coley” o il “vaccino di Coley” e nella formulazione poi adottata anche da altri studiosi prevedeva la presenza di batteri inattivati. Il trattamento con la tossina di Coley veniva descritto come in grado di migliorare la prognosi di alcuni tumori dopo inoculazione locale. Questa è una prima evidenza che ci suggerisce che, anche se indirettamente, la stimolazione del sistema immunitario aiuta anche a combattere il tumore: quando combattiamo un agente patogeno il sistema immunitario riesce a fronteggiare anche un'altra situazione che è quella tumorale.
- 2) Agli inizi del 1900 (quando la prima causa di morte non era il tumore ma gli agenti infettivi) Paul Ehrlich analizzando l'incidenza dei tumori si accorse che neoplasie venivano ritrovate anche in cadaveri che non erano morti a causa del tumore (i primi studi epidemiologici di incidenza dei tumori all'epoca venivano fatti proprio sulle autopsie). Per molti tumori frequenti come quello della prostata si evidenziava un numero enorme di soggetti che durante l'autopsia mostravano neoplasia prostatica anche senza accusare alcun sintomo dovuto al tumore. In questo contesto Ehrlich affermò che la carcinogenesi come patologia non è un evento raro, bensì frequente. Questo metteva in luce un altro aspetto: se il tumore non è un evento raro, vi dovrebbero essere dei meccanismi di controllo notevolmente efficienti che lo contengano.
- 3) L'ultimo tassello lo abbiamo verso la metà del 1900, quando Burnet conia un termine che viene usato anche oggi, IMMUNOSORVEGLIANZA: un sistema progettato sorvegliare il self potrebbe riconoscere anche cellule self anomale (“impazzite”), che per qualche motivo esprimono antigeni non-self. Immunosorveglianza perciò la possiamo definire anche come la capacità del sistema immunitario di controllare che le cellule non esprimano antigeni anomali.
- 4) Un'altra evidenza più recente è stata rilevata nel trattamento del tumore della vescica: una delle terapie consiste nell'iniettare direttamente all'interno della vescica un VACCINO, il

BCG (Bacillo Calmette Guérin), un vaccino usato per la tubercolosi, perché è un batterio simile a quello della tubercolosi ma che non presenta le stesse conseguenze cliniche. È perciò un vaccino vivo che può conferire resistenza verso il micobatterio della tubercolosi. Si è però osservato che inoculando questo bacillo, innocuo per l'uomo, in una vescica tumorale aiuta la remissione del tumore. Ovviamente bisogna scartare l'ipotesi che possa essere il batterio a combattere il tumore, perciò, vi deve essere qualcosa che permetta questa remissione nella risposta immunitaria.

Il sistema immunitario realmente riconosce le cellule tumorali come estranee e cerca di combatterle. Un esperimento che supporta questa ipotesi è stato fatto su animali da laboratorio: inducendo un tumore cutaneo con agenti chimici su un topo da laboratorio immunocompetente, si genera un tumore cutaneo. Questa massa tumorale viene isolata e disgregata per ottenere diverse unità che vengono in seguito inoculate nel topo originario: il più delle volte succede che il tumore non ricresce, quindi non abbiamo crescita tumorale. Se, invece, inoculiamo il tumore in un topo singenico (animali da laboratorio che hanno lo stesso patrimonio genetico), in questo caso la probabilità che cresca il tumore è molto più alta. Riusciamo ad abbassare la probabilità che il tumore riesca ad attecchire o crescere nel topo singenico solo quando facciamo un'operazione di isolamento dal topo originario di linfociti CD8⁺ e li trasferiamo nel topo ricevente. In questo caso abbiamo una probabilità di ricrescita molto vicina al caso dell'autotrapianto del tumore. Questa è una chiara dimostrazione che la causa della non crescita nello stesso topo era dovuto alla funzione dei linfociti T-citotossici del sistema immunitario. Quindi si potrebbe pensare a una cura del tumore basata sulla riattivazione del sistema immunitario: questo perché abbiamo almeno una specie cellulare che è in grado di riconoscere e distruggere le cellule tumorali.

8.1 Tumore visto dal sistema immunitario

Il tumore può essere definito come una massa cellulare che non risponde più ai segnali di arresto della proliferazione. L'organizzazione e il differenziamento cellulare nei vari tessuti ha portato di conseguenza alla presenza di sistemi di controllo affinché le cellule non proliferino oltre una certa misura: questo tipo di controllo avviene a tanti livelli, a livello delle stesse cellule, il limite di Hayflick, valido per tutte le cellule del nostro corpo. Tale limite, stabilito dall'evoluzione, era previsto proprio per evitare il superamento di un numero di divisioni stabilito. Una volta raggiunto il limite di replicazione la cellula differenziata si suicida tramite morte apoptotica. Quello che succede nel tumore è l'alterazione di questo tipo di meccanismo: le cellule tumorali agitano tutti questi sistemi di controllo andando perciò a formare un tessuto che non è più funzionale: nessuno stimolo interno o esterno viene sentito e il limite di Hayflick non vale più. Questo tipo di processo è a volte molto lungo: vi sono degli eventi mutazionali che concorrono sequenzialmente alla formazione del carcinoma (vedi storia naturale del tumore del Colon): si può individuare la sequenza di mutazione dei geni (l'INATTIVAZIONE di ONCOSOPPRESSORI e l'ATTIVAZIONE di ONCOGENI) che progressivamente nella storia clinica del tumore portano prima a displasia, adenoma e alla fine carcinoma.

Quindi possiamo dire che alla base della carcinogenesi c'è la mutazione di particolari geni con traduzione di proteine potenzialmente diverse da quelle originali per sequenza, oppure proteine che

vengono espresse in maniera aberrante: alla base della carcinogenesi abbiamo quindi una variazione dell'aspetto antigenico della cellula tumorale. L'idea ancora oggi è che il tumore nasca in maniera MONOCLONALE, ovvero che vi sia una cellula a dare inizio al processo, una cellula fondatrice a generare tutto il tessuto tumorale. Questa cellula poi con l'aumentare delle divisioni cambia radicalmente, perché anche nel tumore clinico che viene diagnosticato, vengono ritrovate varie tipologie di cellule tumorali (non solo cloni di quell'unica cellula mutata). Questa è uno degli aspetti clinicamente più pericolosi perché l'eterogeneità del tumore dal punto di vista fenotipico e genotipico, determina una minore capacità curativa. [Infatti, vengono curati in maniere più efficace i tumori monoclonali, come per esempio alcune leucemie, ma non riusciamo a debellare con altrettanta efficienza i tumori solidi in quanto presentano e possono manifestare questa eterogeneità.]

Da un'origine monoclonale a seguito di un'interazione con l'ambiente si parla proprio di STORIA NATURALE del tumore, in cui il tumore trova delle strade per continuare la sua proliferazione incontrollata, il tumore difende la sua esistenza come entità unica e perciò tende a sopravvivere nel tempo adattandosi all'ambiente, che diviene scarso di nutrienti di irrorazione sanguigna e si cerca di adattare anche alle terapie (pressione selettiva) ed al sistema immunitario. Questo alla fine porta ad una popolazione policlonale in grado di adattarsi a numerose pressioni ambientali molto facilmente.

Quindi il tumore è un produttore di nuova antigenicità. La trasformazione da protooncogene a oncogene riguarda la funzionalità e la struttura della proteina: un oncogene è tale quando è costitutivamente attivo, questo può essere ottenuto per mutazione, ovvero modifica della propria struttura, ma può anche essere dovuta ad un'amplificazione della sequenza genica, oppure può essere dovuto ad un riarrangiamento cromosomico che porta il protooncogene a valle di un promotore diverso.

- Produzione di un nuovo antigene (per mutazione)
- Aumento dell'espressione di un antigene (over-espressione)

Oggi sappiamo che il sistema immunitario è in grado di riconoscere il tumore come non self. Ne è la dimostrazione della presenza di cellule immunitarie, come macrofagi e linfociti all'interno del tumore (infiltrato infiammatorio). Nei pazienti tumorali si possono ritrovare anticorpi circolanti e linfociti T che riconoscono alcuni antigeni espressi dal tumore. Un ulteriore evidenza del collegamento è dato dal fatto che in tutte quelle situazioni in cui il sistema immunitario non funziona bene c'è un'incidenza maggiore di tumori: per esempio nei soggetti immunosoppressi (che hanno subito un trapianto) o immunodeficitari si ha un incremento dal 4 al 25% dell'incidenza tumorale rispetto alla popolazione generale.

Antigeni espressi dal tumore

ANTIGENI NON-SELF

1. **Antigeni tumore-specifici:** proteine mutate, per almeno un aminoacido, provenienti da geni mutati. Viene definito specifico perché lo produce unicamente il tumore, questo determina un vantaggio in quanto è un antigene non-self e quindi il sistema

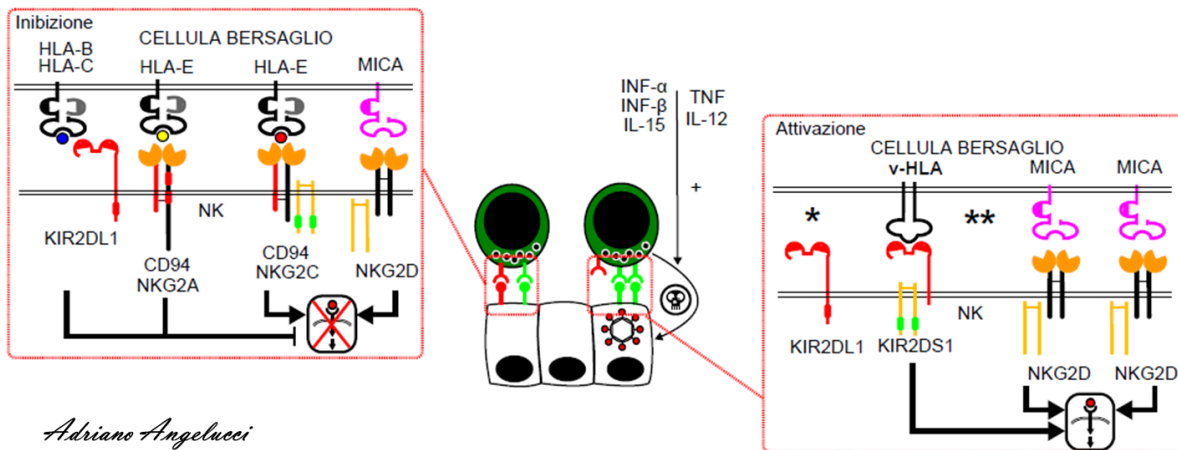
immunitario dovrebbe riconoscerlo. Viene portato da MHC I (che esprime il tumore stesso) o MHC II dove vi deve essere un evento scatenante che porta all'attivazione della cellula dendritica come la necrosi o apoptosi del tessuto con rilascio dell'antigene non-self.

2. **Antigeni tumore-associati:** questi sono antigeni che non vengono espressi solo dal tumore, però sono o antigeni iper-espressi, che normalmente non sono espressi in quantità così elevate nel tessuto normale (melanoma: la tirosinasi) e il sistema immunitario vede questa over produzione come potenzialmente pericolosa, oppure sono antigeni, proteine che normalmente non vengono espresse nell'adulto ma solo durante particolari periodi dello sviluppo, come nello sviluppo fetale (antigeni oncofetali: alfa-fetoproteina, AFP, carcinoma epatico; antigene carcinoembrionale CEA, carcinoma del colon), che possono essere utilizzati a scopo diagnostico. In questo caso il tumore stesso esporrà sul proprio MHC I ad elevata probabilità epitopi di tali antigeni così da mettere in allarme il sistema immunitario.
3. **Antigeni tessuto-ristretti:** come gli antigeni MAGE (antigeni legati al melanoma), espressi normalmente nel feto e nelle gonadi maschili testicolare, possono essere espressi in maniera aberrante da diversi tumori, e possono essere utilizzati a scopi diagnostici.
4. **Antigeni associati ad un virus:** parliamo di virus ONCOGENI, ovvero che possono indurre la formazione di un tumore dopo l'infezione, quindi agenti biologici del tumore. Per esempio il Papillomavirus o l'Epstein-Barr virus inducono la cellula ad esprimere particolari antigeni virali, sicuramente non-self, che poi vengono espressi comunque dal tumore (come le proteine E6 ed E7 espresse nel papilloma virus). Questi sono in realtà antigeni virali, che sono quelli che permettono il ciclo vitale del virus e sostengono la carcinogenesi, quindi divengono antigeni del tumore. Oppure possono modificare geni dell'ospite dopo inserzione sul DNA,
5. **Antigeni provenienti da eventi post-trasduzionali:** il tumore di solito produce glicoproteine (e glicolipidi) anomale soprattutto nella parte glucidica, che subiscono delle modificazioni nel processo di glicosilazione. In questo caso parliamo di gangliosidi o di mucine, quindi zuccheri, glicolipidi e glicoproteine, che possono essere utilizzati anche questi a scopi diagnostici (tumore alla mammella: CA19.9; carcinoma ovarico: CA125), in quanto sono proteine in cui la porzione glucidica è completamente aberrante. Questo lascia pensare che anche per quanto riguarda il metabolismo della glicosilazione il tumore presenti un'eterogeneità.
6. **Antigeni di differenziamento:** sono antigeni che vengono espressi in maniera specifica da certi tumori come memoria del tessuto di origine. Il caso classico è quello del tumore alla prostata, infatti, per la diagnosi può essere utilizzato il PSA sierico, l'antigene prostata specifico, che viene normalmente utilizzato dalla prostata. Il tumore crescendo in maniera incontrollata continua a produrre in maniera eccessiva, rilasciandolo nel sangue. Anche i linfomi B conservano marcatori antigenici delle cellule B, come il CD20 o gli IgD o IgM (BCR), essendo un tumore con moltiplicazione monoclonale, tutti i linfomi presentano lo stesso idiotipo immunoglobulinico sulla membrana. Gli antigeni perciò possono essere una reminiscenza fenotipica del tessuto di provenienza.

8.1.1 Risposta effettrice contro il tumore

Quello che oggi sappiamo è che gli antigeni tumorali sono in grado di attivare una risposta contro il tumore stesso. Probabilmente non si tratta di un unico meccanismo ma di più meccanismi, sia cellulari con attacco diretto citotossico, sia umorale con il rilascio di anticorpi contro gli antigeni

tumorali. Allo stato attuale delle conoscenze, la risposta cellulare sembra comunque essere quella più importante. Le modalità di attivazione seguono i meccanismi canonici: gli antigeni tumorali possono essere fagocitati dalle cellule dendritiche in un ambiente pro-infiammatorio, come quello tumorale, si ha così un'attivazione della cellula presentante l'antigene e da qui si prosegue con stimolazione sui linfociti T-citotossici o linfociti T-helper [come avveniva nell'esperimento illustrato precedentemente: antigeni specifici tumorali, in un ambiente in cui vi è attivazione di cellule dendritiche, vi è successiva attivazione dei linfociti citotossici che vanno a lisare, con la risposta effettrice, le cellule tumorali che portano lo stesso antigene che le ha attivate]. Le cellule T-helper possono essere attivate e portare all'attivazione, tramite la via dell'interferone-gamma, dei fagociti: i macrofagi giocano un ruolo importante nella risposta immunitaria verso il tumore, li possiamo ritrovare anche nell'infiltrato infiammatorio tumorale, quindi sono tra i protagonisti del controllo della carcinogenesi. I linfociti T-helper possono attivare anche i linfociti B, anche se è una via meno praticata: spesso si trovano nell'individuo degli anticorpi anti-antigeni tumorali, ma non è un processo molto frequente. Le risposte più potenti e le più frequentemente adottate dal sistema immunitario contro il tumore sono l'attivazione dei linfociti T-citotossici, macrofagi e cellule NK. Le cellule NK possono essere attivate anche nel corso di una risposta acquisita (tramite IL-12), però essendo anche cellule dell'immunità innata si possono muovere indipendentemente dall'immunità acquisita: sono molto simili ai linfociti citotossici perciò sono capaci di lisare direttamente le cellule tumorali. Le NK possono distruggere le cellule tumorali sia attraverso il processo ADCC, citotossicità indotta da anticorpo, oppure possono riconoscere direttamente il tumore, indipendentemente dall'espressione di un antigene tumore specifico o tumore associato. Le cellule NK sono proprio cellule citotossiche presentano dei granuli all'interno che rilasciano enzimi litici e perforina. Il riconoscimento con la cellula bersaglio avviene, quando quest'ultima esprime segnali di STRESS (DAMP), oppure quando la cellula non esprime più MHC: queste sono le due situazioni che fanno attivare l'azione citotossica delle NK. Ad esempio proteine di stress sono le proteine MICA, MHC non canonici, molto simili come struttura agli MHC di classe I, ma non portano antigeni sulla superficie. Questi MHC-non canonici non vengono espressi nelle cellule in condizioni basali, le esprimono soltanto in una condizione di stress associata ad un'infezione virale, oppure per qualche malfunzionamento metabolico interno. L'espressione di questo segnale è in grado di attivare recettori specifici espressi dalle cellule NK (NKG2D), attivando la via citotossica. L'altro meccanismo di attivazione abbiamo detto essere l'assenza dell'espressione da parte delle cellule dell'MHC I: vi è una proteina KIR2DL1, che in condizioni fisiologiche lega le MHC, non nella porzione in cui si lega all'antigene ma in una porzione strutturale. Questo dimostra che le cellule NK possono essere attivate indipendentemente dall'antigene o dal tipo di antigene che venga esposto, ciò che importa è che venga espresso l'MHC che porta l'antigene. Durante il legame MHC-KIR2DL1, quest'ultimo funge da repressore dell'attivazione della cellula NK, quando non vi è questo legame ovviamente la repressione viene inibita e possono prevalere le vie di attivazione.



Modalità di attivazione delle cellule NK. HLA-E è un MHC non canonico a basso polimorfismo che è in grado di presentare il peptide segnale (pallino giallo) derivante dal processamento citoplasmatico di HLA-A,B,C. HLA-E può esporre anche un limitato repertorio di peptidi patogeni e proteine di stress (pallino rosso). Sul pannello di attivazione a destra gli asterischi indicano l'assenza di HLA-B,C e HLA-E.

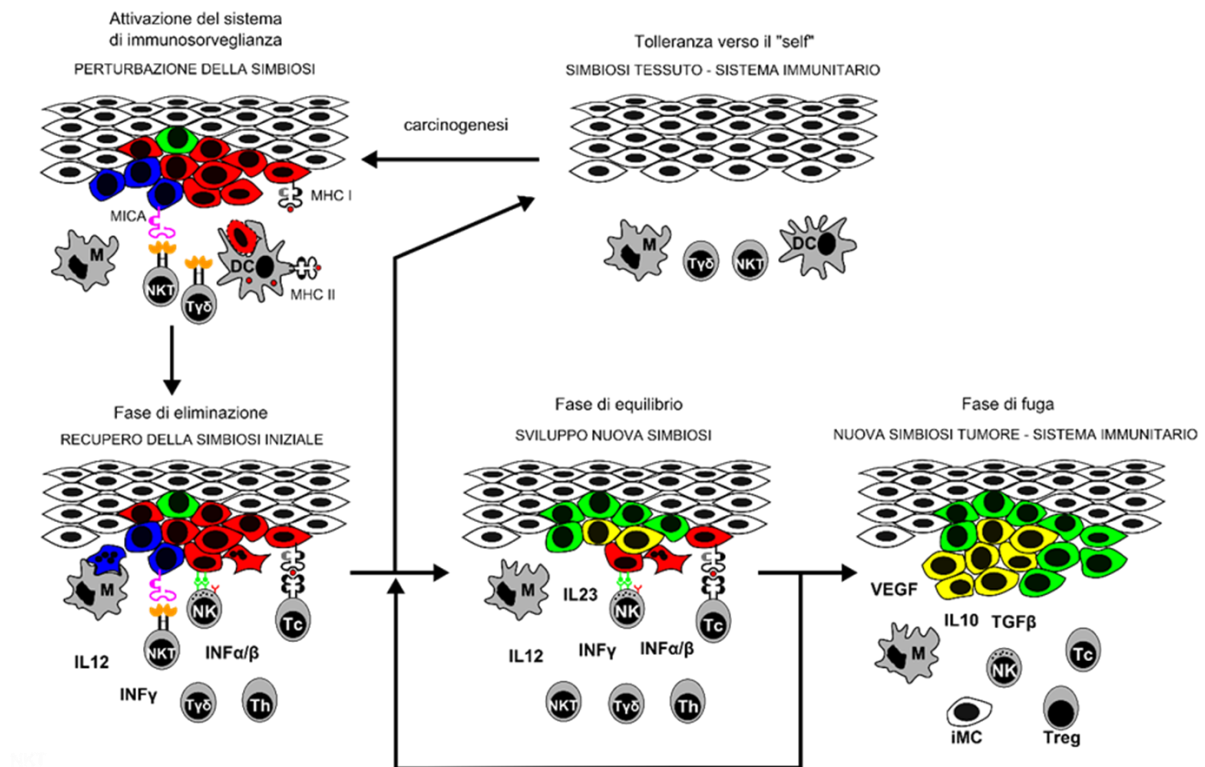
8.1.2 Come il tumore resiste al sistema immunitario

Abbiamo mostrato una serie di modalità con cui il sistema immunitario combatte il tumore, la domanda da porsi è come mai il tumore, nonostante l'attivazione di questi sistemi notevolmente potenti, non venga eliminato? Il tumore non viene eliminato per un fenomeno che viene chiamato IMMUNO-EDITING, ovvero di riprogrammazione del sistema immunitario, chiaramente questo avviene quando il tumore arriva alla fase clinica e il sistema immunitario non è più in grado di combatterlo. L'ipotesi più accettata è che inizialmente vi è una fase in cui il sistema immunitario funziona bene con richiamo di cellule NK, i linfociti CD8+, i linfociti CD4+, macrofagi e possibilmente una parte del tumore viene eliminata. Ad un certo punto il tumore raggiunge uno stato di equilibrio con il sistema immunitario, dovuto alla presenza di alcuni cloni cellulari tumorali che vengono selezionati positivamente. Il clone o i cloni che vengono selezionati sono quelli in grado di resistere all'attacco del sistema immunitario. L'immunoediting quindi si realizza attraverso tre fasi principali:

- 1) **ELIMINAZIONE:** in cui il sistema immunitario combatte il tumore per ristabilire la simbiosi iniziale con il tessuto fisiologico (Pressione selettiva), e prevede l'eliminazione delle cellule tumorali
- 2) **EQUILIBRIO:** La popolazione tumorale risente della pressione selettiva esercitata dal sistema immunitario, e cominciano ad emergere meccanismi di adattamento o di selezioni di cloni tumorali che meglio riescono a proteggersi dall'attacco immunitario. Si tratta di una fase in cui il sistema immunitario riesce ancora a controllare la crescita della massa tumorale.

- 3) FUGA: nel momento in cui emerge un meccanismo di adattamento efficace da parte del tumore questo può continuare a proliferare. Il sistema immunitario non riesce più a realizzare un processo di difesa capace di rallentare la crescita della massa tumorale.

Lo studio di tale processo è alla base dell'immunoterapia attuale sui tumori, terapie volte proprio alla riattivazione del sistema immunitario contro il tumore.



MECCANISMI CHE PERMETTONO L'EQUILIBRIO

Le nuove frontiere della ricerca sono orientate proprio sulla scoperta dei meccanismi attuati dal tumore per mascherarsi o per inattivare il sistema immunitario. alcuni meccanismi già sono noti, altri dovranno essere ancora chiariti. Partiamo da una situazione di attivazione del sistema immunitario dovuta al fatto che il tumore esprime sulla propria superficie un antigene riconosciuto come non-self.

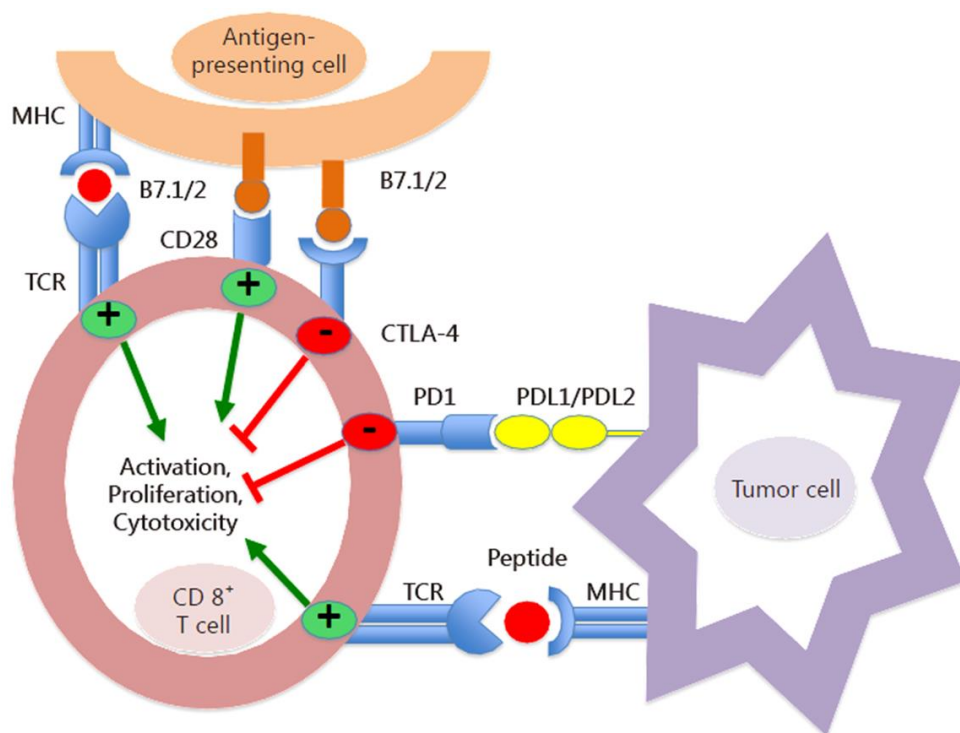
- Una prima modalità con cui il tumore inganna il sistema immunitario è la non espressione di antigeni non-self: questo è l'evento più semplice in quanto una cellula tumorale non viene più riconosciuta come estranea e perciò non viene più combattuta, in quanto smette di esprimere antigeni non-self. Nella pressione selettiva, il sistema immunitario elimina tutte le cellule tumorali che esprimono antigeni non-self, ed una quota di cellule tumorali rimane in

vita in quanto non esprime o esprime molto poco antigeni tumore-specifici e perciò viene selezionata dalla massa tumorale proliferando illimitatamente, mascherata nei confronti del sistema immunitario. La non espressione può riguardare anche le molecole di stress.

- In un altro caso non vengono più espressi gli MHC, perciò non vi è il caricamento dell'antigene non-self. In questo caso non vi è la capacità di riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici. Qui dovrebbe intervenire il sistema NK, ma in questo caso abbiamo già eliminato una quota importante del sistema acquisito.
- Il tumore può produrre citochine immunosoppressive: è stato visto che molti tumori producono il TGF-beta. Il TGF-beta può servire alla progressione del tumore, e per il sistema immunitario è una citochina antiinfiammatoria. Perciò nel momento in cui il tumore incomincia a produrre questa citochina induce una progressione tumorale (per un vantaggio diretto) e crea un ambiente immunosoppressivo (vantaggio indiretto).
- Altri meccanismi di evasione dal sistema immunitario, prevedono la produzione di un glicocalice di matrice zuccherina che protegge dal contatto con le cellule immunitarie, oppure attiva l'espressione di FASL che manda in apoptosi i linfociti che esprimono il FAS.

L'ultima frontiera della terapia immunologica contro il tumore riguardano l'indagine dei check-point immunologici: quei meccanismi posseduti normalmente dal sistema immunitario, che regolano la soppressione dell'attività immunitaria. Si tratta di meccanismi che negano al sistema immunitario di rimanere attivo per troppo tempo, in quanto potrebbero creare reazioni indesiderate (sono dei meccanismi di tolleranza periferica): questi, però, vengono sfruttati dallo stesso tumore per proliferare indisturbato.

- Nel momento in cui un linfocita citotossico o T-helper viene attivato inizia ad esprimere dei recettori che ne condizionano la vita successiva: questo è stato visto per il CTLA4 e per il PD1, i due principali recettori che controllano i check-point immunologici. CTLA4 compete con CD28 per il legame con B7-1/2 presente su una cellula APC, impedendo la necessaria costimolazione. PD1 serve come segnale di immunosoppressione in periferia, probabilmente nelle fasi di terminazione dell'infiammazione. Sono delle specie di FRENI FISIOLOGICI ad un'eccessiva risposta immunologica, possono, però, essere sfruttati dal tumore proprio per proteggersi dall'attività immunitaria. Se il tumore, oltre ad esprimere un antigene non-self sulla superficie esprime anche il ligando del recettore del PD1 (PDL1/2) può sopprimere la risposta cellulare citotossica.



Le nuove terapie tumorali allo studio prevedono l'interruzione di questo messaggio inibitorio sul sistema immunitario affinché quest'ultimo possa continuare a combattere il tumore.

- Un altro meccanismo di immunosoppressione ben conosciuto, riguarda i macrofagi. I macrofagi si trovano spesso infiltrati nel tessuto tumorale, cosa che non sorprende visto che i macrofagi sono ubiquitari e non hanno bisogno di un'attivazione da parte dell'immunità acquisita, ma possono agire direttamente. Il tumore creando zone di necrosi ed infiammazione con rilascio di materiale intracellulare, attiva inevitabilmente i macrofagi, che svolgono la loro azione di spazzini. I macrofagi che presentano la funzione di "spazzini" (che perciò eliminano residui di necrosi o apoptosi cellulari) vengono definiti M1, la cui attività è regolata da tutta una serie di citochine pro-infiammatorie (IL1 e TNF). Questi M1 hanno un'azione efficace contro le cellule tumorali, riescono a debellare in maniera efficace cellule tumorali. In realtà dall'esame istologico del tessuto tumorale, si possono individuare macrofagi M2, un altro stato fenotipico dei macrofagi che non è così aggressivo ed efficace nei confronti del tumore rispetto a M1

Fisiologicamente esiste una distinzione importante tra queste due popolazioni di macrofagi in quanto l'M1, rappresenta la popolazione di macrofagi che intervengono inizialmente nell'infiammazione, eliminano il materiale di degradazione cellulare, eliminano le cellule infette e danneggiate; gli M2 invece sono i macrofagi di riparo che intervengono in un secondo momento nel sito di lesione, sono pro-angiogenici e possono anche produrre citochine anti-infiammatorie.

Questo dimostra che il tumore "impara" anche a stimolare la produzione di macrofagi M2, piuttosto che M1. Normalmente un monocita proveniente dal sangue si differenzia in M1 o M2 a seconda dell'ambiente esterno che trova: un ambiente in cui prevalgono IL4-10-13, il monocita dà vita ad un macrofago M2. Se un tumore produce tali citochine, esso stesso spinge per la produzione di macrofagi M2 che di fatto sono pro-tumoral, quindi promuovono il tumore, l'angiogenesi ed

inibiscono la risposta immunitaria, in quanto sono quelli che sedano fisiologicamente il sistema immunitario.

In conclusione, possiamo comprendere perché la tossina di Coley o il BCG possano dimostrarsi utili nel combattere alcuni tumori: inducendo uno stato pro-infiammatorio associato all'azione immunogena degli antigeni batterici, si ha una parziale riattivazione del sistema immunitario anche nei confronti del tumore, superando quindi la fase di equilibrio indotta dal tumore tramite l'immunoediting e la creazione di un ambiente immunosoppressivo.

IMMUNIZZAZIONE ATTIVA E VACCINI (LEZIONE 26-04-18)

9.1 I vaccini

I vaccini sono tra i farmaci di più grande successo nella storia della medicina. Ciononostante, sono stati storicamente sempre considerati con diffidenza da parte della popolazione. Il vaccino è una medicina PREVENTIVA e deve essere assunta prima dell'incontro con il patogeno. Tra le problematiche associate alla comprensione dell'importanza della vaccinazione annoveriamo in primis la **mancata percezione del rischio**. Alla fine del 2014, alla Princeton University, dopo il verificarsi di diversi casi di meningite da Meningococco B, le autorità hanno permesso la distribuzione eccezionale del vaccino, allora non ancora autorizzato negli Stati Uniti dalla FDA, per bloccare l'epidemia tra gli studenti. Quindi, uno degli aspetti legati al fatto che i vaccini non siano ritenuti importanti è la percezione del rischio cioè la conoscenza diretta della malattia, che è proprio quella prevenuta dal vaccino. Si può dire in questo caso che i vaccini siano vittima del loro successo. Un'altra problematica è legata alla considerazione del **rapporto DANNO-BENEFICIO** associato alla somministrazione del vaccino. Nessun farmaco è privo di effetti collaterali; nel caso del vaccino il fatto che esso sia un farmaco percepito come non necessario, in quanto è somministrato quando la malattia non c'è e per patologie ai più largamente sconosciute, tende ad amplificare l'importanza degli effetti collaterali che si possano verificare.

Anche in questo caso però conviene esaminare qual è la pericolosità della malattia che viene evitata. Vediamo il caso del morbillo. Il morbillo è causa di morte anche su 1 caso per 1000, il 10% dei malati può manifestare otite, polmonite e diarrea. L'encefalite che si può sviluppare in una percentuale di infetti, può causare danni cerebrali permanenti. Il vaccino vede come effetti indesiderati comuni la febbre e reazione infiammatoria nel sito di iniezione. Conseguenze più gravi sono state descritte solo in una casistica rara o molto rara.

Patologia del morbillo

Morbillo	
Otite media	7-9%
Polmonite	1-6%
Diarrea	6%
Encefalite	0,05-1% (di questi, 15% muore e 25% ha sequele cerebrali permanenti)
Panencefalite subacuta sclerosante (SSPE)	0,001%
Letalità	0,01- 0,1%

Effetti indesiderati del vaccino contro il morbillo

Morbillo		
febbre	5-10%	da comune a molto comune
rash	5%	comune
reazione nel sito di iniezione	17-30%	molto comune
Convulsioni febbrili	1/2.000-3.000	rare
encefalomielite	1/106	molto raro
trombocitopenia	1/30.000	molto raro
anafilassi	1-3,5/ 10 ⁶	molto raro

Come altro esempio consideriamo il Papillomavirus (HPV). Esistono vari ceppi di Papillomavirus, anche se i ceppi legati a tumore rappresentano un numero più ristretto.

Genital HPV Types

<u>HPV TYPE</u>	<u>CLINICAL FINDINGS</u>	<u>CANCER POTENTIAL</u>
6, 11	genital warts, low grade genital lesions, RRP	Low (negligible)
40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 71, 72, 81	low grade genital lesions	Low (negligible)
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82	low & high grade genital lesions, cancer	High
Uncertain cancer potential: HPV 26, 34, 53, 57, 66, 83		

La trasmissione è per via sessuale, per contatto diretto. I segni clinici (in generale di tutta la categoria), fanno riferimento ad una infezione transitoria spesso asintomatica con lesioni della pelle e delle mucose. Poi ci sono i ceppi oncogeni associati al cancro della cervice uterina. L' infezione da

HPV non è infrequente, meno frequente è la trasmissione degli dei ceppi oncogeni, come nel caso di HPV 16 e 18. Ma questa piccola percentuale è responsabile di 2000 casi di tumore alla cervice uterina in Italia ogni anno. Quasi tutti i casi di tumore della cervice (90%) sono riconducibili all'infezione HPV, essendo uno dei tumori a base virale più frequente (quinto tumore delle donne sotto i 50 anni). Si tratta, allora, di un tumore che ha un agente eziologico virale. Per questo, il vaccino contro il patogeno conferisce protezione anche verso il tumore della cervice uterina.

Sono disponibili varie formulazioni di vaccini contro HPV:

HPV VACCINE	HPV TYPES COVERED	ROLE OF HPV TYPES IN DISEASE
Quadrivalent	6, 11, 16, 18	6, 11 - most genital warts. 16, 18 - approx. 70 % cervical cancers. >50 % vulvar, vaginal, penile cancers; 16 - Approx. 85% anal cancers. In the US >50% oropharyngeal (middle part of throat) cancers.
Bivalent	16, 18	See above.
Nonavalent (FDA approved in Dec 2014)	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58	> 99% of cervical cancers attributed to persistent infection by HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68, in that order of frequency.

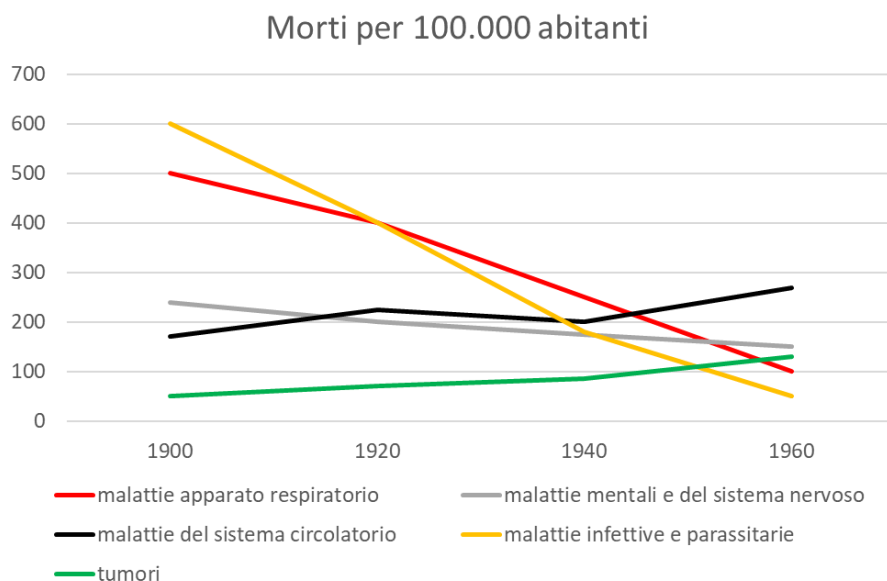
Vediamo ora gli effetti collaterali di questi vaccini anti-HPV. Ad esempio, nel caso del vaccino quadrivalente, che quindi copre 4 ceppi di HPV, gli effetti indesiderati comuni sono:

- febbre e cefalea: 13-26% (molto comune)
- dolore e rossore nel sito di infezione 6%
- orticaria 3%
- artralgia, mialgia 2%
- disordini gastrointestinali 17%

La maggior parte di questi sono effetti comuni, transitori e di impatto limitato. L'anafilassi è la situazione più pericolosa, ma è molto rara (1.7 - 2.6 ogni milione di vaccinazioni).

Inoltre, i vaccini, così come tutti gli altri farmaci, sono posti sotto sorveglianza e quindi gli effetti collaterali e i casi più gravi sono comunque segnalati alle autorità sanitarie.

La percezione del rischio per molte delle malattie per cui esistono i vaccini è bassa. Eppure andando a vedere le cause di mortalità in Italia a livello storico:



si può apprezzare come sia cambiata la mortalità per le diverse cause di malattia. Agli inizi del '900 le malattie infettive e parassitarie rappresentavano la prima causa di morte, mentre ora non hanno una così elevata importanza. Nel mondo invece, le malattie infettive rappresentano ancora collettivamente la prima causa di morte.

PATOLOGIA	MORTI PER ANNO
Malattie cardiovascolari	12 milioni
Diarree batteriche e virali	5 milioni
Cancro	4,8 milioni
Polmonite	4,8 milioni
Tubercolosi	3 milioni
Malattie polmonari cronico ostruttive	2,7 milioni
Morbillo	1,5 milioni
Malaria	1-2 milioni
Epatite B	1-2 milioni
Tetano neonatale	500'000
Pertosse	500'000
AIDS	200'000

Le malattie infettive rimangono, quindi, la principale minaccia per il genere umano, ed hanno avuto un ruolo decisivo anche a livello storico. Tra le epidemie che hanno segnato la storia dell'uomo annoveriamo:

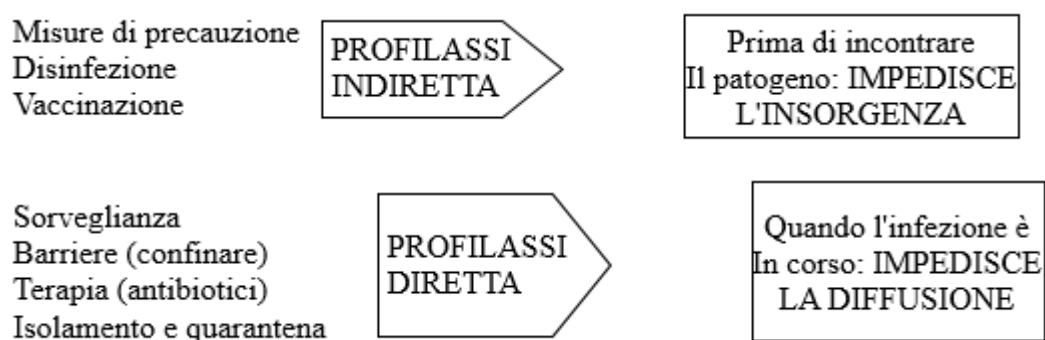
- La conquista dell'America: i conquistatori europei in America ebbero la meglio sugli indigeni proprio grazie ai microorganismi patogeni che portarono nel continente americano e che sterminarono milioni di indigeni. Stiamo parlando dell'epidemia di vaiolo (1519-1520)

avutasi in Messico: i morti furono 5-8 milioni (1/5 della popolazione è stato decimato). Ma il vaiolo, nel XX secolo, ha causato la morte di almeno 500 milioni di persone in tutto il mondo.

- Nel '300 la Pesta Nera causò da 20-25 milioni di morti (1/3 in Europa)
- In Europa, si sono succedute varie pandemie influenzali ricorrenti con milioni di vittime
 - 1918-1919 > Spagnola (50 milioni di vittime)
 - 1957 > Asiatica
 - 1968 > Hong Kong
- Negli anni '50, in Italia ci furono 8000 casi di poliomielite, in America se ne annoverarono all'epoca 21000. Oggi la poliomielite ha una incidenza molto bassa, ed infatti nel 2002 l'Europa è stata dichiarata "Polio free".

La poliomielite è una grave malattia infettiva a carico del sistema nervoso centrale che colpisce soprattutto i neuroni motori del midollo spinale, determinando quindi paralisi. La malattia è causata da tre tipi di polio-virus (1,2 e 3), appartenenti al genere enterovirus, che invade il sistema nervoso nel giro di poche ore, distruggendo le cellule neurali colpite e causando una paralisi che può diventare, nei casi più gravi, totale. In generale, la polio ha effetti più devastanti sui muscoli delle gambe che su quelli delle braccia. Le gambe perdono tono muscolare e diventano flaccide, una condizione nota, appunto, come paralisi flaccida. In casi di infezione estesa a tutti gli arti, il malato può diventare tetraplegico. Nella forma più grave, quella bulbare, blocca la contrazione dei muscoli innervate dai nervi craniali, riducendo la capacità respiratoria, di ingestione e di parola. In questo caso, è necessario supportare il malato con ausili nella respirazione. Negli anni '50, erano molto diffusi a questo scopo i polmoni d'acciaio, dispositivi che aiutavano i malati nella respirazione.

9.2 Profilassi e controllo delle malattie trasmissibili



La profilassi indiretta ha avuto un ruolo fondamentale per combattere gli agenti patogeni. La profilassi diretta agisce a valle dell'infezione, e, soprattutto al giorno d'oggi, agisce anche su scala mondiale, per confinare geograficamente un'epidemia ed impedirne la diffusione. Gli antibiotici sono farmaci efficaci, poco tossici, ma uno dei problemi è che il numero di antibiotici disponibile non è aumentato negli ultimi anni. In parallelo si stanno registrando sempre nuovi casi di resistenza agli antibiotici da parte dei batteri patogeni.

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

Ciascun batterio è sensibile solo ad alcuni antibiotici, quindi esiste il fenomeno della resistenza naturale. Ogni classe di antibiotici ha infatti uno specifico bersaglio. Ogni classe ha uno specifico spettro di azione antifungina o antibatterica:

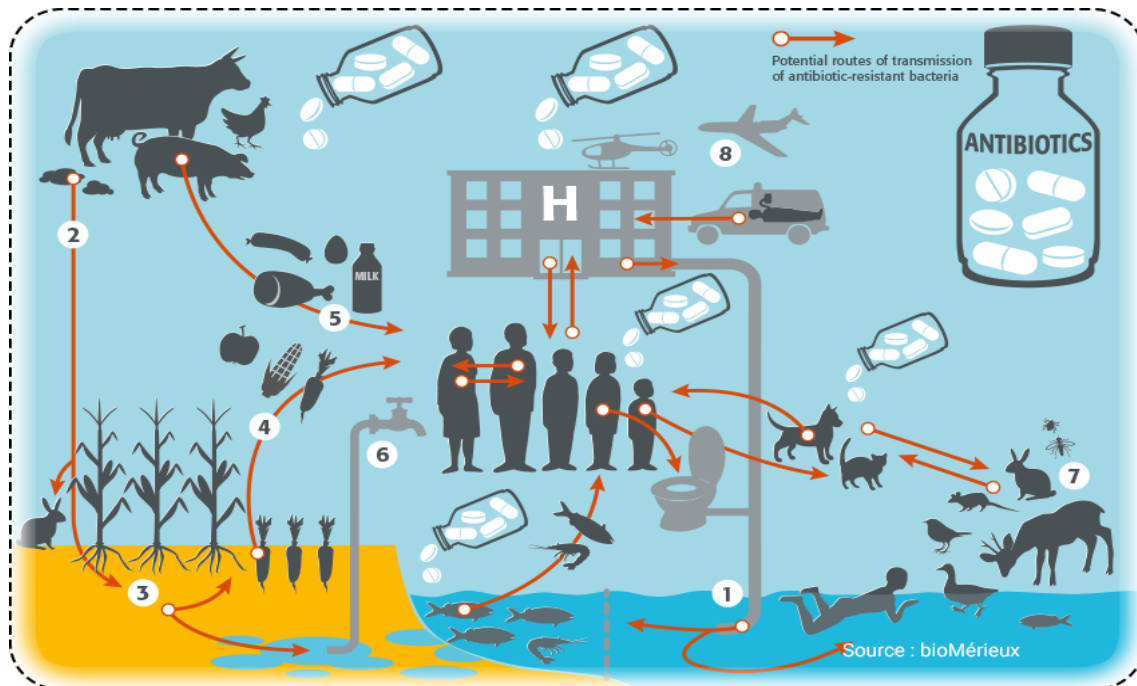
- Sintesi parete batterica (penicilline, cefalosporine, bacitracina, vancomicina);
- Permeabilità membrana (nistatina);
- Sintesi proteica (cloramfenicolo, streptomina);
- Sintesi acidi nucleici (actinomicina, griseofulvina);

Gli antibiotici hanno una bassa tossicità per l'organismo umano e si diffondono facilmente in tutti i tessuti. La cosa più preoccupante è che si sta manifestando una resistenza acquisita, ossia il micro organismo ha mutato le proprie caratteristiche per non essere più sensibile a quell' antibiotico. Questa resistenza è acquisita secondo diverse modalità:

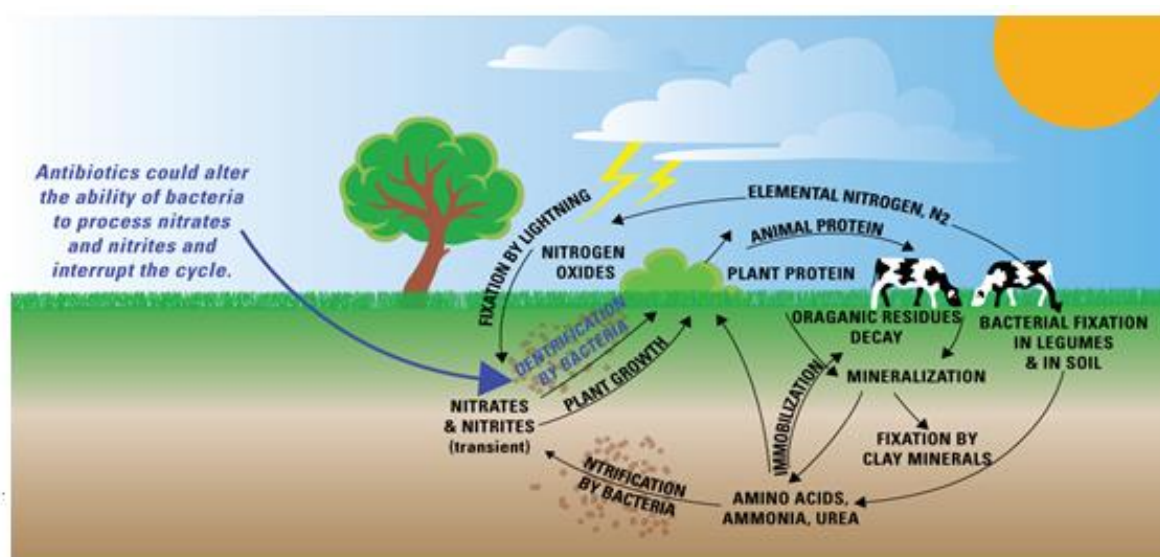
- ❖ **MUTAZIONI:** cambia la proteina bersaglio o la proteina che ne regola l'assorbimento. L'antibiotico è allontanato tramite canali presenti nel batterio così che non permanga al suo interno.
- ❖ **TRASDUZIONE:** trasferimento della resistenza tramite virus (fagi) da un batterio all'altro.
- ❖ **CONIUGAZIONE:** tramite pili sessuali si possono trasferire geni di resistenza presenti sui plasmidi.

Dunque, a fronte della pressione selettiva determinata dagli antibiotici è ovviamente favorita la sopravvivenza dei batteri resistenti, la cui resistenza può essere trasferita. Come si è sviluppata questa resistenza?

Il discorso è complesso: è necessario far riferimento all'uso medico (ospedali come prima sede di resistenza), ma anche a quello zootecnico. Di solito, negli allevamenti se ne fa un uso eccessivo, come profilassi indiretta, e questo eccesso non metabolizzato può finire nell' ambiente. Le industrie farmaceutiche sono una terza possibilità: rilasciano in modo accidentale di antibiotici nell'ambiente.



La pressione quindi è anche a livello ambientale. Gli antibiotici compromettono i normali cicli ecologici: i batteri nel terreno sono fondamentali nella fissazione e nel recupero di azoto; questi batteri ricevono una pressione negativa tale da sbilanciare tutto il sistema ecologico.



4.1 Composizione dei vaccini

Il vaccino è una formulazione con:

- **componente attivo o principio attivo**, costituito da antigeni verso cui si vuole instaurare un'immunità (antigeni protettivi)
- **adiuvanti**: molte volte la presenza del solo antigene non determina immunizzazione, perciò occorre l'utilizzo di adiuvanti. Gli adiuvanti svolgono due funzioni principali. Stimolano

l'infiammazione e proteggono l'antigene dall'immediata degradazione.

- idrossido di alluminio
- fosfato di alluminio

Potenziano la Risposta immunitaria

La somministrazione dell'antigene tal quale presenta diverse problematiche: il sistema immunitario non lo percepisce come potenzialmente pericoloso ed inoltre le proteine sono facilmente degradate nell'organismo. I sali di alluminio sono proprio degli agenti stimolanti dell'infiammazione locale. La stimolazione dell'infiammazione è un elemento fondamentale perchè rappresenta il segnale di attivazione delle cellule dell'immunità acquisita. Le cellule dendritiche quindi si attivano durante questo stadio infiammatorio, portando l'antigene verso gli organi linfoidi secondari.

Il problema della degradazione della proteina (o antigene) può essere risolto in un altro modo, tramite la costruzione di una capsula lipofila intorno alla proteina stessa.

- **Detergenti, colesterolo, liposomi o virosomi:** proteggono gli antigeni e ne favoriscono il rilascio graduale. Hanno diverse funzioni:
 - proteggono l'antigene dalla degradazione;
 - veicolano l'antigene nelle cellule, favoriscono l'assorbimento e l'esposizione in tempi più lunghi, probabilmente tramite MHC I;
 - ritardano il rilascio dell'antigene.Sono quindi degli elementi immunostimolanti: ISCOM- IMMUNOSTIMOLATING COMPLEX > DETERGENTI E COLESTEROLO.
- **Antibiotici:** sono usati nei processi di fabbricazione del vaccino, per prevenire la contaminazione batterica ed a volte sono eliminati alla fine del processo, altre volte rimangono in tracce.
 - Gentamicina
 - Neomicina
- **Conservanti** (thiomersal, fenolo, fenoxietanolo)
- **Stabilizzanti**, che non fanno precipitare il vaccino e lo rendono stabile, come il solfato di magnesio o il sorbitolo.
- **Tracce di metalli e formaldeide:** componenti che derivano dal processo industriale di lavorazione del vaccino.

Il vaccino quindi ha delle caratteristiche peculiari nell'ambito della somministrazione e dell'efficacia:

1. si deve trattare di una somministrazione di un componente innocuo dell'agente infettivo che induce protezione verso di quest'ultimo
2. risulta efficace se somministrato diverse settimane/mesi prima del contatto con l'agente infettivo e dopo somministrazione multiple (questo è il motivo per cui le vaccinazioni sono effettuate nei bambini più piccoli: bisogna vaccinarsi il prima possibile)
3. l'efficacia può svanire nel tempo, a seconda del tipo di vaccino (tetano ogni 10 anni)

COMMON COMPONENTS OF VACCINES

As well as the active components, vaccines contain a number of other substances. This graphic examines these and the reasons for their inclusion.

ACTIVE COMPONENTS



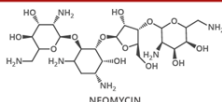
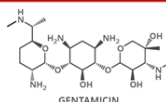
A form of the virus, bacteria or toxin that causes the disease is used as the antigen. This antigen is modified from the original form so it no longer causes disease, but still elicits an immune response from the body. To modify the disease-causing agent, it can be treated with specific chemicals, so it cannot replicate. It can also be treated so it does not cause serious disease, or only parts of the disease-causing agent that do not cause serious symptoms can be used.

ADJUVANTS



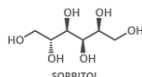
Added to enhance the body's immune response to the vaccine. How they work isn't entirely understood, but it's thought they help keep antigens near the site of injection. This means they can be easily accessed by the immune system cells. There is no evidence of any serious adverse effects from adjuvants, though they can cause some minor reaction near the injection site.

ANTIBIOTICS



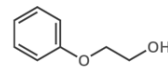
Antibiotics are used in the manufacturing process of the vaccine to prevent bacterial contamination. They are later removed, and only residual quantities remain in the vaccine after the production process.

STABILISERS



Vaccines need to be storable, so stabilisers are added to ensure the various components remain stable and effective. A variety of different stabilisers are used; either inorganic magnesium salts such as magnesium sulfate or magnesium chloride, or mixtures of lactose, sorbitol and gelatin. Monosodium glutamate and glycine are also used in some cases.

PRESERVATIVES



Preservatives help prevent contamination of vaccines. They are used particularly in multi-dose vaccines. Thiomersal is a common preservative, though its use declined in the late 1990s when vaccines were falsely linked to child autism. This link was later shown to be an elaborate medical hoax, and there is no link between thiomersal and autism.

TRACE COMPONENTS



These are left-over from the vaccine production process. Though they are purposefully removed, residual amounts remain. Formaldehyde is one such agent, used to deactivate viruses and detoxify bacteria, but amount remaining is several hundred times lower than the smallest amount known to cause harm in humans.



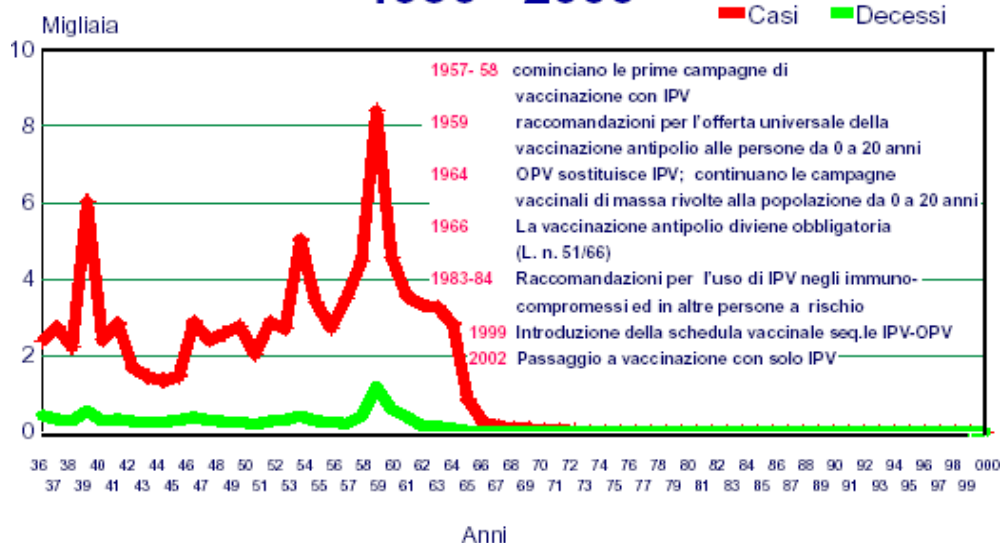
© COMPOUND INTEREST 2015 - WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem
This graphic is shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence.



4.2 Immunizzazione attiva

Il successo delle vaccinazioni è comunque indubbio:

Incidenza della poliomielite in Italia 1936 - 2000



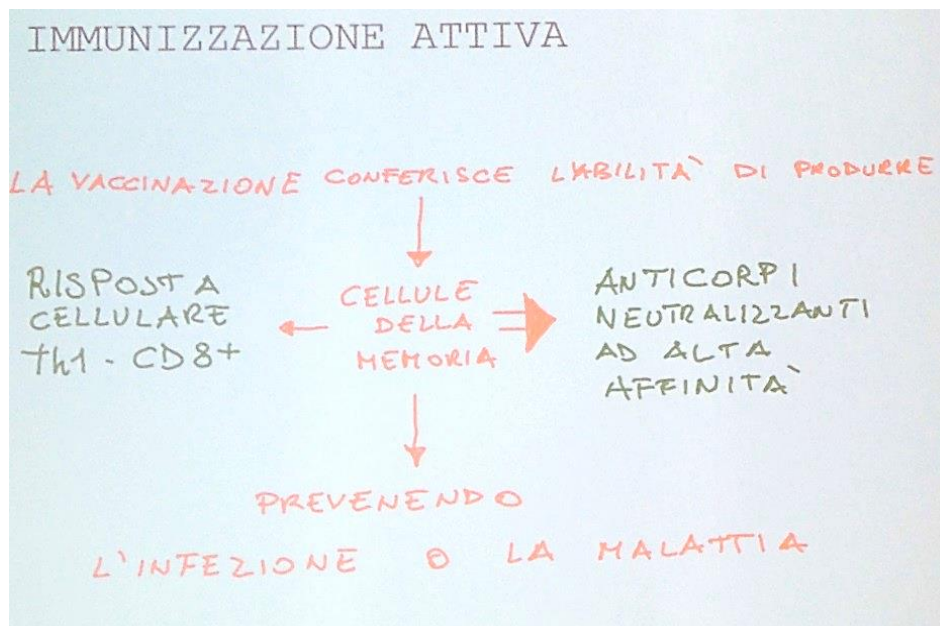
Fonti: Ministero della Sanità - ISTAT

Direzione Generale della Prevenzione Ufficio III - Malattie infettive

Non esistono cure per la poliomielite, se non trattamenti sintomatici che possono solo in parte minimizzare gli effetti della malattia. L'unica strada per evitare potenziali conseguenze è la prevenzione tramite vaccinazione. Esistono due tipi di vaccino: quello "inattivato" di Salk (IPV), da somministrare con iniezione intramuscolo, e quello "vivo attenuato" di Sabin (OPV), da somministrare per via orale. Il vaccino di Sabin, somministrato fino ad anni recenti anche in Italia, ha permesso di eradicare la poliomielite in Europa ed è raccomandato dall'Organizzazione mondiale della sanità nella sua campagna di eradicazione della malattia a livello mondiale. L'obiettivo dell'OMS è infatti quello di eliminare completamente la presenza della malattia, seguendo il successo ottenuto con il vaiolo, dichiarato eradicato nel 1980. In Italia, per decisione della Conferenza Stato Regioni nel 2002, dopo l'eradicazione completa della polio in Europa, l'unica forma di vaccino somministrato è quello inattivato. Presso il Ministero della salute viene comunque mantenuta una scorta di vaccino orale attivo come misura precauzionale, in caso di emergenza e di importazione del virus.

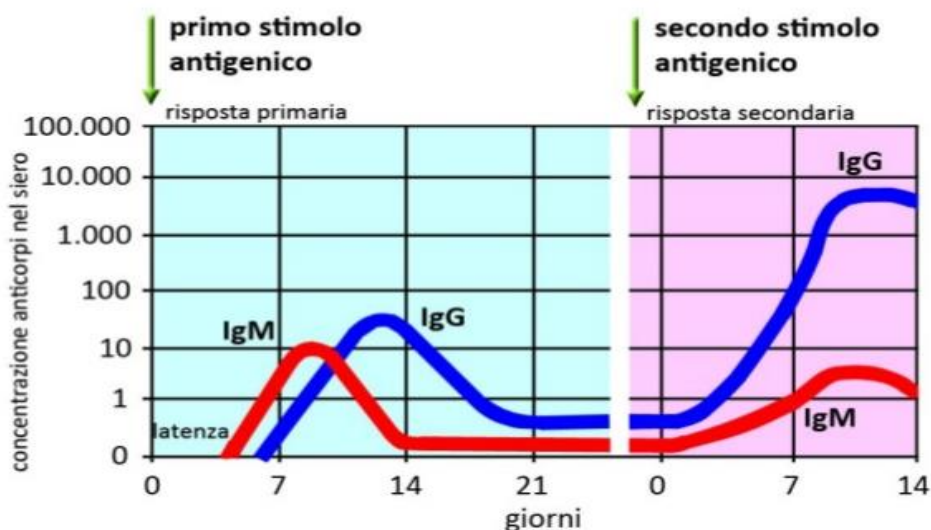
Quindi, in sostanza il vaccino determina una immunizzazione attiva, ossia la stimolazione del sistema immunitario verso gli antigeni patogeni.

Nell'immunizzazione attiva ci inducono SPECIFICITA' E MEMORIA



Nell'immunizzazione passiva (da siero, immunoglobuline) c'è SPECIFICITA' ma non MEMORIA; non ci sono cellule della memoria, per cui una seconda infezione comunque causerebbe la malattia.

Che ruolo ha quindi la memoria immunologica?



Se al tempo zero si fa la vaccinazione, essa permette lo sviluppo di IgG in 10 giorni. Se le IgG non servono più, i livelli scendono, ma non tornano mai a zero, così come non tornano ai valori iniziali le cellule competenti verso quell'agente patogeno, linfociti T e B. Questo fa sì che in un successivo tempo zero di infezione, non sia necessario un intervallo di 10-14 giorni, ma la risposta sarà entro i 7 giorni, e sarà più forte di quella iniziale. La difesa vaccinale è basata sulla produzione di IgG, più specifiche verso l'antigene.

I 7 giorni sono sufficienti, anche perchè la maggior parte dei vaccini funziona per la produzione di anticorpi con azione neutralizzante, sono rivolti verso antigeni esposti dell'agente patogeno, su capside o parete batterica, non verso antigeni interni. Una volta che l'anticorpo è legato inibisce il legame e l'ingresso del patogeno nella cellula bersaglio, perchè vengono bloccate le strutture preposte all'adesione e all'ingresso. L'azione può essere neutralizzante anche verso le tossine: il vaccino contro il tetano è rivolto verso la tossina tetanica, prodotta dal batterio, così da impedirne il funzionamento.

Una buona parte della ricerca sulla vaccinazione sta proprio nell'individuare i migliori antigeni verso cui creare il vaccino. In questo modo vengono prodotti anticorpi contro quell'antigene e per questo si parla di antigeni protettivi. Gli antigeni protettivi quindi sono quegli antigeni che vengono individuati verso cui sono prodotti degli anticorpi che permettono di prevenire la malattia stessa. Dato che la diffusione delle malattie infettive è legata allo sviluppo della malattia, impedendone l'insorgenza si blocca anche diffusione.

4.3 Tipi di vaccini

1. Vaccini ad organismi vivi interi: è il vaccino più efficace in assoluto, può essere però fatto raramente perché bisogna individuare un organismo che assomiglia a quello patogeno senza le caratteristiche patologiche. In effetti, in natura si è dimostrato quasi

impossibile. Oggi è tecnologicamente fattibile, perché è possibile modificare l'organismo togliendo le caratteristiche di patogenicità. Ma la somministrazione di un patogeno, anche modificato in maniera da essere sicuro, è collegata a qualche rischio, perché ci potrebbe essere la possibilità di nuova mutazione in senso patogeno, e comunque si tratta di un organismo vivo che potrebbe dare problemi imprevedibili in soggetti suscettibili (immunodepressi).

2. Vaccini a microrganismi vivi attenuati (secondo per efficacia): sono costituiti da virus o da batteri che mantengono la capacità di moltiplicarsi nell'organismo del vaccinato, stimolando le sue difese immunitarie, ma incapaci di provocare manifestazioni cliniche di malattia.

- Meccanismo simile in tutto all'infezione naturale: occorre un numero ridotto di dosi per ottenere una protezione duratura di ottimo livello.
- Potrebbero retro-mutare alla forma selvaggia e non si possono utilizzare in soggetti che presentano immunodeficienza.

Vengono messi a punto selezionando ceppi mutanti avirulenti, per esempio con ripetuti passaggi in terreni colturali (batteri) o in colture cellulari (virus) in condizioni non ottimali (pratiche inizialmente scoperte da Pasteur).

L'organismo vivo, dunque, garantisce EFFICACIA del vaccino, perché ha le caratteristiche dell'adiuvante: si riproduce e il proprio carico antigenico non si disperde ed è associato ad uno stato infiammatorio.

3. Vaccini inattivati:

- Costituiti da virus o da batteri uccisi con mezzi fisici (calore, raggi UV) o chimici (formaldeide, fenolo, acetone, beta-propiolattone) che ne rispettano l'integrità antigenica
 - Necessità di un maggior numero di dosi.
 - Non hanno la limitazione di sicurezza in soggetti con deficit immunitari, anche se gli agenti interi possono contenere componenti dotate di una certa reattogenicità. Qui, ovviamente i microorganismi non sono in grado di riprodursi, con il conseguente problema della disponibilità dell'antigene. Gli adiuvanti, perciò, sono necessari per indurre lo stato di allarme e preservare dalla dispersione rapida l'antigene.

Un elemento utile dei vaccini interi, sia attenuati che inattivati è la presenza di componenti che possono stimolare i recettori preformati (es. lipopolisaccaridi o acidi teicoici della parete cellulare per i batteri; sequenze di basi nucleotidiche ripetute o RNA a doppia elica per i virus, ecc.) in grado di stimolare potentemente l'immunità innata (strutture riconosciute come estranee).

4. Vaccini a subunità, che contengono soltanto alcune frazioni/ componenti dei microorganismi (proteine, peptidi, polisaccaridi). Sono poco efficaci perché inducono più difficilmente una risposta immunitaria. Tanto che per costruirne alcuni è stato necessario utilizzare degli espedienti, quali la coniugazione.

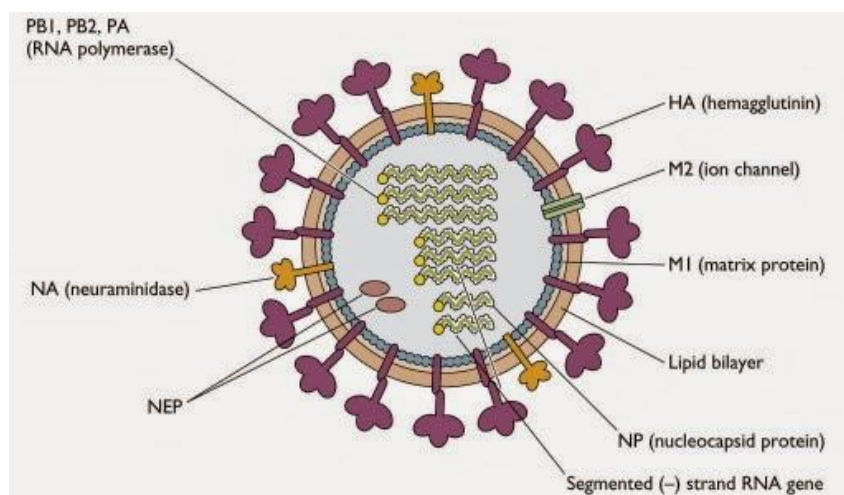
5. Vaccini coniugati: due vaccini compatibili possono essere somministrati in un'unica formulazione, dove l'immunogenicità di un componente permette la copertura anche sull'altro vaccino.
Es: Il vaccino contro l'*Haemophilus influenzae B* (meningite batterica): è stato individuato un antigene capsulare protettivo che è un polisaccaride, quindi se l'individuo produce anticorpi contro questo polisaccaride è immunizzato. Ma somministrando solo questo polisaccaride, il soggetto non risponde e non produce anticorpi. Per questo non è immunogeno. Si è scoperto che bastava unire questo polisaccaride ad un altro componente: l'antigene della tossina tetanica. Un vaccino che contiene una tossina inattivata si chiama tossoide. Quindi, il vaccino immunizza per entrambi, sia per l'*Haemophilus influenzae* che per il Tetano.
6. Vaccini ricombinanti: gli agenti infettivi sono manipolati tramite le tecniche di ingegneria genetica per non essere patogenetici.
7. DNA: viene iniettato il DNA con o senza ausilio di un vettore, strategia che porta all'espressione di quella determinata proteina all'interno delle cellule.

4.3.1 Vaccino per l'influenza

Il virus dell'influenza è stato responsabile nel passato di varie pandemie associate ad elevata mortalità. La difficoltà di creare un vaccino contro questo virus a cosa è legata?

I principali antigeni protettivi del virus dell'influenza sono: l'emoagglutina e la neuroaminidasi, posti all'esterno del capsido e sono chiamati H ed N. Gli anticorpi verso H ed N bloccano la possibilità del virus di entrare nelle cellule.

I vari ceppi sono identificati da una sigla H ed N + numero, di cui esistono delle varianti.



H1--->H16

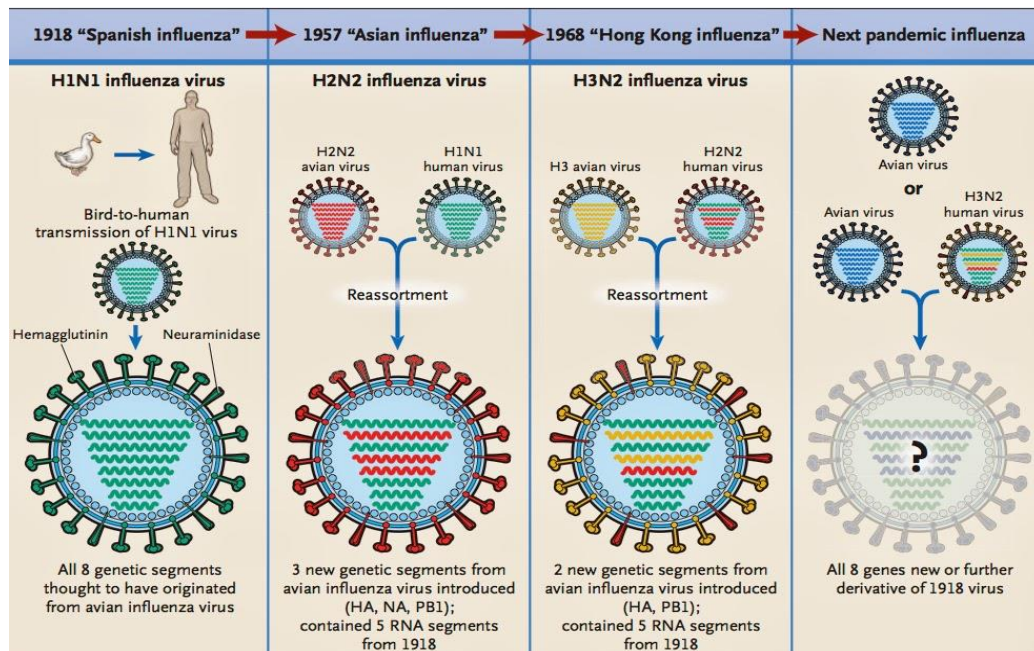
N1--->N9

Il virus responsabile della Spagnola è: H1N1

Il virus responsabile dell'Asiatica è: H2N2

Il virus responsabile dell'Hong Kong è: H3N2

Questo vuol dire che gli anticorpi contro H1N1 non rispondono contro H2N2, e questo è il motivo principale per cui non si può creare una memoria contro quel determinato ceppo.



A cosa è legata la difficoltà di definire una memoria immunologica per il virus dell'influenza?

Si creano sostanzialmente dei riassortimenti, che portano a nuove varianti del virus. Gli eventi in grado di determinare una certa variabilità sono due:

- **ANTIGENIC DRIFT:** mutazioni, piccoli cambiamenti di un aminoacido; si potrebbero creare nuove varianti H e di N, dopo mutazione.
- **ANTIGENIC SHIFT:** riassortimento tra H ed N. La presenza in uno stesso organismo ospite di due ceppi differenti porta a riassortimento, con produzione di nuovi virus, che hanno diversi segmenti di RNA. Virus differenti possono essere portati da uccelli, uomo e maiale. Alcuni animali quindi possono funzionare da veri e propri incubatori/mixer. Ceppi diversi sono portati indifferenteemente da uccelli e da uomo e spesso si trovano a convivere nello stesso organismo.

Il problema risiede nella tempistica con cui si realizza il vaccino anti-influenzale, perchè spesso, per questi meccanismi, il virus prevalente che arriva in Italia non è quello che era atteso. La produzione del vaccino ha i suoi tempi e in quei mesi è possibile che il virus che arriva effettivamente è leggermente diverso rispetto a quello per cui si ha il vaccino disponibile.

IMMUNOTERAPIA (LEZIONE 10-05-18)

5.1 Come utilizzare il sistema immunitario a scopo terapeutico

Il sistema immunitario controlla l'integrità dell'organismo e come tale è da considerare come una cassetta degli attrezzi. Il sistema immunitario infatti contiene cellule che partecipano attivamente ai meccanismi di riparo dai danni tissutali. Studiando il sistema immunitario si possono individuare quindi quei meccanismi che potrebbero aiutare nel mantenimento dell'omeostasi di molti tessuti e nella cura di alcune malattie. Inoltre siccome il sistema immunitario ha un ruolo in praticamente in tutte le patologie, e in alcune contribuisce alla manifestazione dei segni clinici, la sua modulazione potrebbe anche solo alleviare le conseguenze più gravi di tali malattie.

Parlare di immunoterapia è un ambito molto complesso in quanto sono molti gli approcci possibili e gli ambiti in cui è possibile applicarla. In generale quando parliamo di una terapia che ha a che fare con il sistema immunitario, o immunoterapia, parliamo di una terapia attraverso la quale noi interveniamo a **modulare un'attività del sistema immunitario**, per stimolarla o inibirla. Possiamo ad esempio cercare di compensare un'immunodeficienza: dove è presente una deficienza specifica possiamo intervenire, integrando quello che manca. In molte situazioni, però, è necessario sopprimere il sistema immunitario, come nel caso delle reazioni di ipersensibilità dove è il sistema immunitario la causa della malattia. Anche l'**immunizzazione** è un'immunoterapia: ci riferiamo a una terapia attraverso cui rendiamo il nostro organismo protetto da un agente dannoso, e possiamo distinguere un'immunizzazione passiva e un'immunizzazione attiva. Nell'immunizzazione attiva noi stimoliamo il sistema immunitario inducendone la **memoria**; nell'immunizzazione passiva, invece, proteggiamo l'organismo ma solamente in **maniera temporanea**, somministrando anticorpi prodotti in un altro organismo immunizzato.

5.1.1 Immunità passiva

Uno degli strumenti più potenti che ha il sistema immunitario sono gli ANTICORPI, a causa della loro specificità di legame e adattabilità a diversi antigeni. Tale caratteristica può essere sfruttata per offrire protezione verso gli agenti patogeni. Immunizzando un animale verso l'antigene protettivo il siero di tale animale può essere utilizzato come terapia sull'uomo. Oggi sappiamo che questa è una metodologia di immunizzazione passiva e deriva dalla presenza nel siero di anticorpi contro agenti patogeni. L'uso di siero tal quale non è mai un metodo consigliabile, in quanto trasferisco non solo le immunoglobuline, ma anche antigeni non-self, potendo generare nel soggetto della reazione di ipersensibilità di tipo III. Quindi nel corso della storia un passo notevolmente importante è stato anche quello di riuscire a frazionare le varie componenti del plasma (Frederick

Cohn, 1940), isolando e purificando il più possibile le immunoglobuline. Quindi l'immunizzazione passiva si ottiene prelevando del siero da animali che sono stati immunizzati.

Esempi di immunizzazione passiva:

ANTICORPI	SORGENTE	SPECIFICITA'
Immunoglobulina difterite	Uomo	Specificità per il tossoide difterico
Immunoglobuline <i>Hemophilus influenzae</i>	Uomo	Specificità contro il polisaccaride di superficie capsulare di <i>H.I.</i>
Immunoglobuline epatite A	Uomo	Specificità contro l'antigene di superficie dell'epatite A
Immunoglobuline epatite B	Uomo	Specificità contro l'antigene di superficie dell'epatite B
Immunoglobuline tetano	Uomo	Specificità contro la tossina tetanica
Antitossina botulino	Cavallo	Specificità contro le tossine A,B o E del <i>Clostridium botulinum</i>
Antitossina difterica	Cavallo	Specificità per il tossoide difterico
Antisiero veleno serpenti	Cavallo	Specificità contro il veleno di vari serpenti
Antisiero veleno ragni	Cavallo	Specificità contro il veleno di vari ragni
Antitossina tetanica	Cavallo	Specificità contro la tossina tetanica

Le immunoglobuline verso questi agenti patogeni vengono prese da un POOL di soggetti umani che sono stati immunizzati o sono immuni a queste infezioni. Poi abbiamo altre situazione in cui si continua a prelevare il siero da animali (sieri eterologhi) come nel caso di ANTISIERI, contro veleno di serpente, di ragno, contro il tetano (dal cavallo) o botulino. Queste immunoglobuline sono utilizzabili come profilassi post-esposizione conferendo una PROTEZIONE IMMEDIATA. L'utilizzo dell'immunizzazione passiva è fondamentale e efficace quando le tossine o l'agente microbico o il veleno agiscono in tempi notevolmente rapidi e quindi non si possono attendere le tempistiche dell'immunizzazione attiva (come nel caso della tossina del tetano: se si attendono i 10 giorni di attivazione della copertura immunitaria attraverso un processo di immunizzazione attiva, la tossina del tetano è già arrivata a livello delle terminazioni nervose e ha già bloccato la conduzione del segnale). Quindi nel momento in cui si ha un soggetto a rischio di essere entrato a contatto con la tossina del *Clostridium* (ferita infetta) la prima cosa che chiedono in ospedale è se è stato fatto il vaccino per l'anti-tetanica e se è stato fatto da quanto tempo e quando è stato fatto il richiamo (ogni 10 anni): se non è stato fatto il richiamo ovviamente si procede immediatamente con un'immunizzazione passiva. Perciò il valore dell'immunizzazione passiva è quella di prevenire la malattia, o comunque di prevenire i sintomi clinici ed eventi patologici pericolosi della malattia; oppure in altri casi può aiutare a ridurre la trasmissione dell'agente patogeno. Nel caso in cui si è abbastanza certi di aver contratto l'infezione o della presenza della tossina o del veleno nell'organismo si procede con un'immunizzazione passiva per conferire una protezione immediata, ma in alcuni casi si sceglie di abbinare l'immunizzazione passiva ad un'immunizzazione attiva, vaccino. La PROFILASSI POST-ESPOSIZIONE può comprendere l'uso di vaccini: nel caso di Epatite A o Epatite B si raccomanda comunque la vaccinazione entro due settimane dal sospetto

contagio, ovviamente, come profilassi immediata si somministrano le immunoglobuline entro le 24 ore e in seguito la vaccinazione.

- **Epatite a:** vaccino entro 2 settimane
- **Epatite b:** immunoglobuline anti HBV entro 24h, seguito dalla vaccinazione
- **Epatite c:** non disponibile
- **Varicella:** vaccino entro 5 giorni
- **Rabbia:** immunoglobuline nella ferita e Ig+vaccino ai giorni 0-3-7-14

5.1.2 Immunoterapia dell'Eritroblastosi Fetale

L'eritroblastosi fetale è quella patologia che scaturisce per incompatibilità di gruppi sanguigni tra madre e feto, in particolare il feto con Rh + e la madre con Rh -. Il problema è che la madre può sviluppare anticorpi, si può immunizzare contro il feto ed in particolare verso il fattore Rh, un'immunizzazione che porta a formazione di immunoglobuline di tipo G. Le IgG sono in grado di attraversare la placenta, legandosi agli eritrociti del feto: il legame porta all'**opsonizzazione** degli eritrociti fetali e alla distruzione per esempio da parte dei macrofagi di quest'ultimi. Le conseguenze sono ovviamente anemia e un aumento nel sangue di molecole derivanti dalla distruzione degli eritrociti ed in particolare della bilirubina, ovvero metaboliti insolubili, che possono accumularsi nei tessuti del feto ed avere esito fatale. L'incompatibilità Rh genera una patologia grave ed infatti viene sempre monitorata la compatibilità madre-feto durante una gravidanza. L'intervento profilattico è possibile, in quanto vi è un ritardo nella produzione di queste immunoglobuline da parte della madre: la massima immunizzazione infatti non si ha di solito durante la prima gravidanza ma subito dopo il parto. Quindi anche non intervenendo solitamente la prima gravidanza va a buon fine, il parto avviene regolarmente. Nella madre Rh- si osserva un picco di anticorpi anti-Rh dopo il parto. In seguito per la presenza della MEMORIA IMMUNOLOGICA, queste IgG non tornano mai a livelli basali, ma rimangono alti nel sangue. Questo determina che, al momento di una seconda gravidanza, riproponendosi la stessa situazione, le immunoglobuline riconosceranno immediatamente gli antigeni sugli eritrociti fetali portando allo sviluppo clinico della patologia (anemia o esito fatale). Esiste perciò una FINESTRA TEMPORALE in cui si può agire attraverso una terapia. Il RHOGAM è il farmaco che viene utilizzato ed è una formulazione che contiene immunoglobuline anti-D: queste immunoglobuline PREVENGONO ALLOIMMUNIZZAZIONE Rh (alloimmunizzazione: immunizzazione da alloantigeni, il feto può essere considerato un trapianto) mascherando l'antigene al sistema immunitario materno. Questo farmaco viene fatto utilizzando plasma umano: 300 microgrammi di IgG anti-D sono sufficienti a neutralizzare 30 ml di sangue.

5.1.3 Immunoterapia per le patologie da immunodeficienza

Nella malattia di Bruton c'è il blocco nella maturazione da cellula PRE-B a cellula B: quindi nei soggetti malati non si formano plasmacellule e non si ha produzione di immunoglobuline. Questo tipo di patologia è caratterizzata dalla mancanza completa di immunoglobuline nel soggetto immunodeficitario. I livelli sierici di immunoglobuline in condizioni fisiologiche sono 10 mg/mL,

l'emivita è di circa 20 giorni (IgG). Se somministro per via endovenosa immunoglobuline all'adeguata concentrazione e nei giusti tempi (terapia IVIG) posso cercare di ripristinare il deficit provocato dall'immunodeficienza. Nell'IVIG si iniettano da 3 a 6 mg/ml ogni 3-4 settimane. L'obiettivo di questa terapia è quello di mantenere un livello sierico maggiore di 5 mg per ml di anticorpi. Ogni somministrazione è costituita da un pool di immunoglobuline prese da decine di migliaia di donatori differenti. I preparati sono trattati per inattivare i virus o tramite PASTORIZZAZIONE (trattate a 60° per 10 ore), o con SOLVENTI e DETERGENTI (tri-n-butilfosfato, polisorbato 80); questo non compromette la stabilità degli anticorpi in quanto sono proteine notevolmente stabili. Quindi la terapia IVIG ci permette di raggiungere alti livelli di immunoglobuline plasmatiche con delle infusioni mensili (circa). Lo svantaggio è che sono iniezioni intravenose, e perciò devono avvenire in un ambiente controllato, una terapia ospedaliera e i tempi non sono rapidissimi (occorrono alcune ore per la somministrazione).

Reazioni avverse:

Le reazioni avverse sono comuni a tutti i soggetti che fanno uso di terapie a base di anticorpi per somministrazione intravenosa. Possono verificarsi questi effetti collaterali:

- Cefalea
- Nausea
- Dolori muscolari
- Febbre
- Brividi

Negli ultimi tempi si è cercato di ridurre i rischi attraverso l'utilizzo di un'altra via di **somministrazione** che è quella **sottocute**. Vi è subito un problema: le immunoglobuline che posso iniettare sotto cute sono sicuramente molto di meno di quante ne posso iniettare per via intravenosa, e l'assorbimento è più lento, quindi sono necessarie più somministrazioni al mese rispetto alla IVIG. È stato notato però un vantaggio: questa tipologia presenta un rilascio più lento perciò l'emivita diviene maggiore rispetto alla somministrazione intravenosa (da 23 giorni si passa a 41 giorni); somministrazioni perciò a concentrazioni più basse ma con un'emivita maggiore. Frequenti infusioni di immunoglobuline sottocute generano un deposito locale che assicura un livello costante nel tempo. Vi è anche un altro vantaggio che è quello di non necessitare di una struttura ospedaliera e i tempi di somministrazione sono più rapidi e le reazioni avverse sono molto più rare. Comunque le SCIG richiedono un maggior numero di iniezioni (1 volta ogni 1/2 settimane). Sarà il quadro clinico generale del paziente a determinare la scelta tra le due vie di somministrazione.

5.2 Anticorpi ingegnerizzati per scopi terapeutici

Gli anticorpi sono degli strumenti utilissimi in clinica però la loro efficacia può essere migliorata e attualmente molte delle terapie e farmaci a base di anticorpi non vengono prelevati da un animale tal quali, ma sono INGEGNERIZZATI per ottenere anticorpi CHIMERICI o UMANIZZATI.

CHIMERICO: Si parte dalla produzione di anticorpi nel topo, perciò questo anticorpo avrà la porzione variabile che è quella terapeuticamente utile e tutto il resto della sequenza che potrebbe

perciò essere riconosciuto come non-self. Inoltre la porzione Fc murina potrebbe non essere riconosciuta adeguatamente dai recettori Fc umani (FcR). Quindi per massimizzare l'efficacia e diminuire le possibili reazioni avverse di rigetto verso questi anticorpi, è utile conservare la porzione variabile e legarci la porzione Fc umana: mantengo da una parte il vantaggio della porzione variabile (quella terapeutica) e dall'altra parte ho una porzione costante umana.

UMANIZZATI: La ricerca di un anticorpo il più simile possibile a quello prodotto nell'uomo ha portato a mantenere solo alcune regioni nella porzione variabile e in particolare solo quelle sufficienti a riconoscere l'epitopo. Tutto il resto è di natura umana.

NOMENCLATURA: Sono molti al momento i farmaci disponibili a base di anticorpi e la prima cosa che colpisce leggendo le formulazioni di questi farmaci sono i nomi abbastanza bizzarri, in realtà vi sono delle linee guida che devono essere rispettate nel momento in cui si sceglie il nome dell'anticorpo terapeutico (nomenclatura ufficiale affianco al nome commerciale): le prime tre lettere **“identificativo proprietario”** sono inventate dal produttore, la seconda parte determina il **“bersaglio”** (os=osso, lim=sistema immunitario, vir=virus, bac=batteri...) la terza parte indica la **“sorgente”** (u=umano, o=topo, zu=umanizzato, xi=chimerico...), l'ultima parte è costante **“mab”** e sta per anticorpo monoclonale.

ADALIMUMAB (ada-lim-u-mab) è un anticorpo umano che si lega al TNF-alfa una citochina pro-infiammatoria (sistema immunitario)

EFALIZUMAB (efa-li-zu-mab) anticorpo umanizzato che lega il CD11A (sistema immunitario)

Prefixes, infixes, and suffixes for monoclonal antibody nomenclature (generic names)					
Prefix	Target infix		Source infix		Suffix
<i>Varies, “should be euphonious”</i>	-o(s)-	bone	-u-	human	-mab
	-vi(r)-	viral	-o-	mouse	
	-ba(c)-	bacterial	-a-	rat	
	-li(m)-	immune	-e-	hamster	
	-le(s)-	infectious lesions	-i-	primate	
	-ci(r)-	cardiovascular	-xi-	chimeric	
	-mu(l)-	musculoskeletal	-zu-	humanized	
	-ki(n)-	interleukin as target	-axo-	rat/murine hybrid	
	-co(l)-	colonic tumor			
	-me(l)-	melanoma			
	-ma(r)-	mammary tumor			
	-go(t)-	testicular tumor			
	-go(v)-	ovarian tumor			
	-pr(o)-	prostate tumor			
	-tu(m)-	miscellaneous tumor			
	-neu(r)-	nervous system			
	-tox(a)-	toxin as target			
	-fu(ng)-	fungal			

WHO Guidelines 1997

Sono diverse le patologie per cui si possono utilizzare: malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni ed anche tumori (immunoterapia dei tumori), ma anche per l'immunosoppressione dopo i trapianti o come anti-infiammatori, psoriasi ecc...

A volte è utile avere degli anticorpi anti-infiammatori che vanno ad interferire con lo stato di infiammazione: bisogna scegliere bene il bersaglio in quanto l'anticorpo è uno strumento specifico e accurato che va a legare epitopi in maniera specifica. Uno dei primi anticorpi anti-infiammatori il MUROMONAB ha come bersaglio il CD3 sui linfociti T. Questo anticorpo può essere usato come immunosoppressivo dopo un trapianto (rene e polmone), in quanto blocca la capacità di attivazione dei linfociti T, inattivando la risposta effettrice: viene usato uno strumento del sistema immunitario contro il sistema immunitario stesso. Come bersaglio oltre ad un recettore potremmo avere una citochina e in questo caso è un bersaglio molto utile come anti-infiammatorio il TNF-alfa, la citochina pro-infiammatoria più importante. Bloccando il TNF blocco anche l'attivazione di IL-1 e IL-6. Sono stati prodotti molti anticorpi monoclonali (INFLIXIMAB) che possono essere infusi per somministrazione intravenosa per scopo anti-infiammatorio (100 milligrammi intravena a settimana). Per la terapia anti-infiammatoria viene utilizzato anche il ETANERCEPT, che esula dalla nomenclatura standard: questo anticorpo è stato costruito in modo che la porzione Fc è di un anticorpo umano IgG, la porzione che dovrebbe contenere il dominio variabile, ovvero di legame al TNF, in realtà non è la porzione caratteristica di un anticorpo ma è il recettore del TNF stesso. Un'altra formulazione anti-infiammatoria non convenzionale è l'OMALIZUMAB (oma-li-zu-mab), questo farmaco va a legarsi con le immunoglobuline di tipo E libere, nel tentativo di eliminare le immunoglobuline circolanti: questo anticorpo è funzionale nel caso delle malattie ALLERGICHE, vi sono alcune forme allergiche, come la condizione asmatica, che potrebbe non rispondere alla terapia con antistaminici e perciò si potrebbe procedere con la somministrazione di anticorpi.

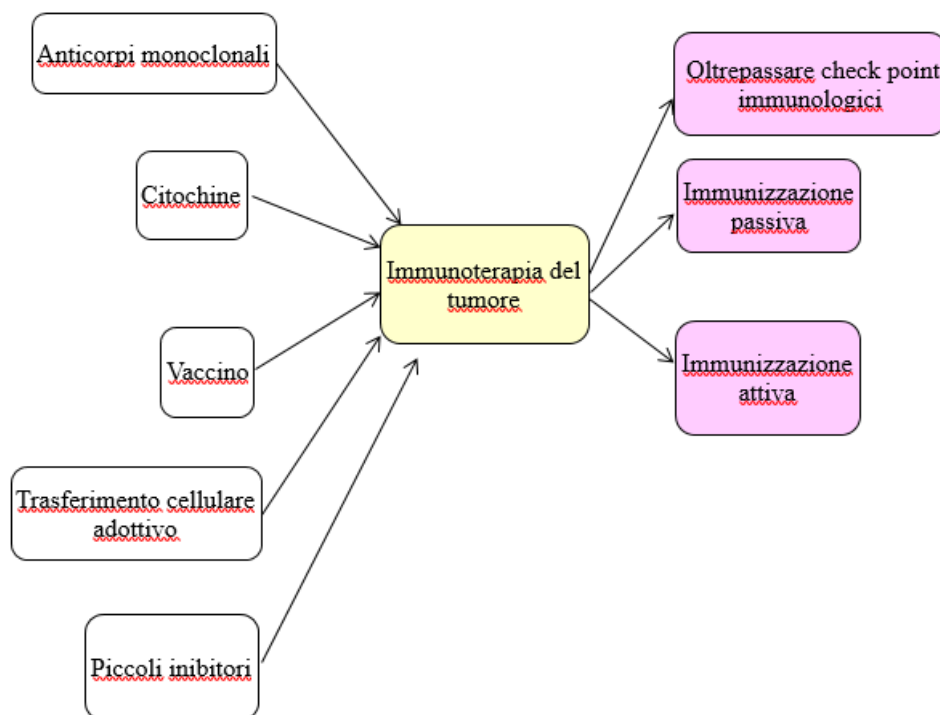
Gli anticorpi trovano un largo utilizzo nelle malattie infiammatorie come il Morbo di Crohn, psoriasi, spondilosi anchilosante, e tra i più utilizzati vi sono i farmaci che hanno appunto come bersaglio il TNF (farmaco sintomatico).

Abbiamo parlato di anticorpi, ma per l'immunoterapia posso utilizzare anche le CITOCHINE, usandole soprattutto quando devo stimolare il sistema immunitario, per dare un'accelerazione alla risposta immunitaria: tra le citochine più utilizzate vi sono gli interferoni. Classicamente l'interferone è una citochina che lavora sui macrofagi nella difesa anti-virale. Gli interferoni di tipo I (alfa e beta) attraverso l'azione di linfociti T-helper e cellule NK attivano i macrofagi. Una cellula nel caso di infezioni virali è stimolata a produrre interferone, che in maniera paracrina protegge le cellule vicine stimolandone la trascrizione di geni che portano alla produzione di proteine antivirali. Il primo uso terapeutico degli interferoni è stato contro l'infezione di alcuni virus come Epatite B, Epatite C, Cytomegalovirus ed *Herpes simplex*: la somministrazione di interferoni accelera la risposta immunitaria e aumenta la difesa contro questi virus. Può essere notevolmente utile sia nel caso di macrofagi non molto attivi o nel caso di patologie granulomatoze dove il macrofago perde potenzialmente le sue funzioni. Gli interferoni però hanno trovato utilizzo anche in altri tipi di contesto come nella cura di alcuni tumori, in quanto possono svolgere anche un'azione anti-proliferativa. Vi è inoltre una classe di interferoni immunosoppressiva, gli interferoni gamma (interferoni di tipo II) che vengono prodotti da alcune cellule del sistema immunitario per controllare una risposta eccessiva.

Table 1. The Three Major Types of Interferon (IFN).					
IFN Type	Class (No. of Genes)	Gene Loci Chr. (Species)	Receptor	Gene Loci Chr. (Species)	Cellular Source
I*	α (13) β (1)	Cluster on 9(H), 4(M)	IFNAR1 IFNAR2	21(H), 16(M) 21(H), 16(M)	pDCs** Fibroblasts, pDCs
II	γ (1)	12(H), 10(M)	IFNGR1 IFNGR2	6(H), 10(M) 21(H), 16(M)	CD4 and CD8 T cells, NK cells, NKT cells, macrophages, DCs, B cells
III	λ (3)	19(H), 7(M)	IFNLR1 IL10R2	1(H), 4(M) 21(H), 16(M)	pDCs
<i>Note and Abbreviations:</i> * IFN- ϵ (1 gene) and IFN- ω (1 gene present in humans, but not mice) are not included. ** Most cells can secrete IFN- α , but pDCs have the greatest capacity. DCs, dendritic cells; pDCs, plasmacytoid dendritic cells; NK, natural killer; NKT, natural killer T; H, human; M, mouse.					

IMMUNOTERAPIA DEI TUMORI (LEZIONE 17-05-18)

L'immunoediting è il meccanismo attraverso cui un tumore riesce a proteggersi dal sistema immunitario. Gli studi che investigano tale adattamento del tumore, possono essere utili a rivelare i bersagli terapeutici utili a ripristinare la capacità anti-tumorale del sistema immunitario. Allo stato attuale sono molteplici gli approcci terapeutici proposti per contrastare l'immunoediting. Il seguente schema illustra le principali strategie dell'immunoterapia in campo oncologico. Sulla parte sinistra vediamo gli strumenti terapeutici che possono essere usati, mentre sulla parte destra vengono illustrate le finalità che si vogliono raggiungere tramite tali approcci. Si tratta comunque di un ambito della ricerca nuovo e in continua evoluzione.



L'immunoterapia dei tumori si basa sull'utilizzo degli strumenti propri del sistema immunitario per combattere il tumore. Si usano: anticorpi monoclonali, citochine, vaccini (antigeni protettivi), trasferimenti cellulari adottivi (infusione di cellule protettive), piccoli inibitori (inibitori di sintesi verso vie di trasduzione del sistema immunitario).

Spesso, parlando dell'immunoterapia dei tumori, si usa genericamente il termine vaccino antitumorale: in realtà spesso si tratta di un potenziamento del sistema immunitario, non sempre tramite l'utilizzo di antigeni tumorali.

Il trasferimento cellulare adottivo consiste nel prelievo delle cellule del sistema immunitario dal paziente, nella loro manipolazione in vitro, e reinoculo. I piccoli inibitori, invece, possono essere usati contro specifici bersagli (molecole) del sistema immunitario.

Tra gli obiettivi più promettenti ci sono i checkpoint immunologici: il tumore nell'immunoediting riesce a proteggersi dal sistema immunitario perchè sfrutta i checkpoint immunologici, ossia vie di comunicazione normalmente usate dal sistema immunitario per reprimere l'attivazione (CTLA4, PD1). Con gli attuali farmaci si sta cercando di evitare che vengano attivate le risposte a valle di alcuni checkpoint immunologici.

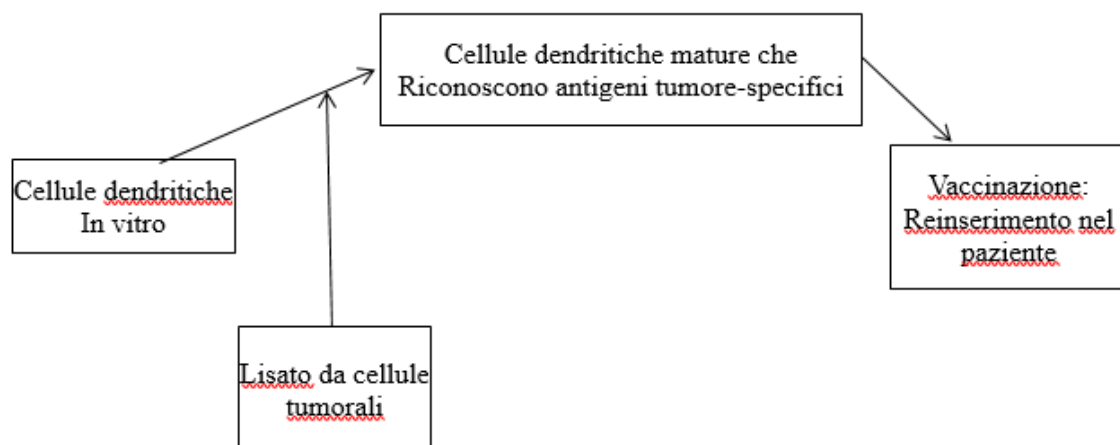
Nell'immunizzazione passiva si induce un potenziamento transitorio della risposta antitumorale (anticorpi, citochine, piccoli inibitori), nell'immunizzazione attiva si induce una risposta prolungata (vaccino, trasferimento cellulare adottivo).

6.1 Vaccini

Un' **immunizzazione attiva** contro un agente biologico oncogeno permette di combattere l'infezione e il tumore. Un esempio è il vaccino contro il papilloma virus: la casistica ha dimostrato che si tratta di un vaccino molto sicuro, con effetti collaterali clinicamente trascurabili. Grazie a questo vaccino, si riesce a prevenire il carcinoma della cervice uterina. Altri esempi sono il vaccino contro l'epatite B (HBV), che determina carcinoma epatocellulare, contro HTLV che causa leucemia nell'adulto, contro l'HHV8 (herpes virus) che determina sarcoma di Kaposi.

Ma la vaccinazione "classica" può essere effettuata contro le cellule tumorali?

Sappiamo che esistono antigeni associati al tumore, e alcuni di questi (in numero limitato) possono essere usati anche come marker tumorali nella diagnosi (mucine, PSA, MAGE, CEA, AFP...). Quindi, è teoricamente possibile produrre un vaccino verso un marker tumorale specifico: il senso è cercare un antigene espresso prevalentemente dalle cellule tumorali che attivi le cellule dell'immunità. I marker diagnostici attualmente disponibili hanno però diversi problemi, tra cui una bassa specificità e sensibilità. Si è cercata una strada diversa come illustrato nello schema seguente:

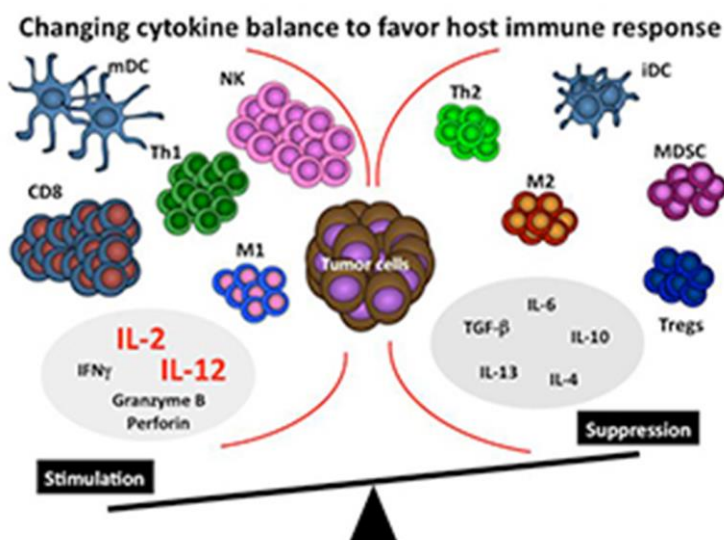


Partendo dai principali protagonisti dell'immunità attiva, ossia le cellule dendritiche, dopo isolamento, si mettono a contatto con un lisato di cellule tumorali dello stesso paziente (cercando di superare il problema dell'eterogeneità inter-individuale). Se il contatto avviene in ambiente adeguato le cellule dendritiche si attivano e possono riconoscere qualcuno degli antigeni tumore specifici. Se reimmesse nel paziente, le cellule dendritiche possono attivare il sistema immunitario contro il tumore. Tale procedura può essere resa più controllata se al posto del lisato di cellule tumorali uso dei plasmidi che codificano per un antigene specifico associato a quel tumore per trasfettare le cellule dendritiche.

Oltre le cellule dendritiche si possono trasferire anche altre tipologie di cellule dell'immunità, come le cellule NK o linfociti citotossici, prelevate da un paziente e sottoposti ad un training in vitro, e poi sono inoculate nuovamente. Una delle citochine più importanti per quanto riguarda l'attivazione e la proliferazione di cellule NK e linfociti T è IL-2. Una volta isolati i linfociti (presi direttamente dal tumore) e messi in contatto con la IL-2, se reinseriti nel paziente, il tumore inizia a regredire. Quindi, è necessario uno shock infiammatorio per l'attivazione di alcune cellule. Si parla di terapie a cellule LAK (cellule citotossiche attivate da linfocine) e cellule TIL (linfociti infiltranti il tumore).

Tali procedure rientrano nelle metodiche denominate TRASFERIMENTO CELLULARE ADOTTIVO.

IL-2 è delle citochine fondamentali che posso usare per stimolare i linfociti, ma ci possono essere anche altre citochine che favoriscono la stimolazione delle cellule che vengono prelevate dal paziente. Prelevare le cellule dal paziente è anche un modo per ottimizzare la procedura di stimolazione del sistema immunitario. Bisogna fronteggiare, infatti, uno dei meccanismi di protezione del tumore cioè la creazione di un microambiente antiinfiammatorio, quale quello tumorale, tramite rilascio di IL-10 e TGF beta.



6.2 ANTICORPI CONTRO IL TUMORE

L'**immunoterapia passiva** prevede l'utilizzo di anticorpi contro il tumore. Dell'anticorpo sfruttiamo la specificità di legame. Ogni volta si ha l'esigenza di legare in maniera specifica un bersaglio, l'idea migliore è produrre un anticorpo che possa riconoscerlo. Come abbiamo visto gli anticorpi possono svolgere diverse funzioni effettrici. Nel caso del loro utilizzo contro il tumore l'abilità terapeutica si può realizzare in diversi modi:

- Neutralizzazione dei recettori di membrana che sostengono la proliferazione oncogena;
- Neutralizzare dei fattori solubili che modulano la crescita tumorale;
- Eliminazione della cellula tumorale dopo opsonizzazione. Gli anticorpi legati alla cellula tumorale possono attivare il complemento o la risposta citotossica.

-

Quindi gli eventi a valle del riconoscimento antigene-anticorpo:

- ADCC: citotossicità dipendente da anticorpo;
- CDC: citotossicità dipendente da complemento (via classica);
- Induzione di apoptosi (se si blocca il recettore per quel fattore di crescita, la cellula muore);
- Inibizione della proliferazione

L'anticorpo inoltre può essere coniugato con una tossina, con radioisotopi (l'anticorpo è usato come veicolo), oppure un farmaco che è nella forma di profarmaco che agisce quando arriva sul tumore.

Table 1: Selected examples of monoclonal antibodies currently in clinical use and development

Antigen Target	Cancer	Antibody	Antibody Type	Company / Institute	Trial Status
CD33	AML	Zamyl Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin)	Humanised Humanised	Protein Design Labs Wyeth-Ayerst	Phase III FDA approval 2000
CD20	NHL	Rituxan (Rituximab) Zevalin (Ibritumomab Tiuxetan) Bexxar (Tositumomab)	Chimeric Murine, radiolabelled (⁹⁰ Y) Murine, radiolabelled (¹³¹ I)	IDEC Pharm/Genentech IDEC-Pharm/Schering AG Corixa Corporation	FDA approval 1997 FDA approval Feb 2002 Phase III
CD22	NHL	LymphoCide (Epratuzumab) LymphoCide Y-90	Humanised Humanised, radiolabelled (⁹⁰ Y)	Immunomedics, Inc Immunomedics, Inc	Phase III Phase I
HLA-DR	NHL	Smart1D10 (Remitogen)	Humanised	Protein Design Labs	Phase II
CD52	B-CLL	Campath1H (Alemtuzumab)	Humanised	Millenium Pharm/ ILEX Oncology Inc	FDA approval 2001
HER2/neu (ErbB-2)	Breast, Colon, NSCLC	Herceptin (Trastuzumab)	Humanised	Genentech	FDA approval 1998 (breast cancer)
CEA	Solid Tumours	CEA-cide Y-90	Humanised, radiolabelled (⁹⁰ Y)	Immunomedics, Inc	Phase VII
EpCam	Colorectal	Panorex	Murine	Glaxo-Smith Kline	Approved in Germany in 1995
EGFR	Head and Neck, NSCLC, Colon	IMC-C225 (Erbix) ABX-EGF h-R3	Chimeric Human Humanised	Imclone Sys Abgenix CMI	Phase VI/III Phase VII Phase VII
VEGF	Solid Tumours	Bevacizumab	Humanised	Genentech	Phase IV/III
VEGFR-2	Solid Tumours	IMC-1C11	Chimeric	Imclone Sys	Phase II and III
A33	Colorectal	huA33	Humanised	LICR	Phase VII
Lewis ^x	Solid Tumours	SGN-15 hu3S193	Chimeric Humanised	Seattle Genetics LICR	Phase VII Phase I
GD3	Melanoma	KW-2871	Chimeric	Kyowa Hakko Kogyo / LICR	Phase I
G250/MN	Renal, Biliary	cG250	Chimeric	LICR / Wilex	Phase VII
PSMA	Prostate	MLN591	Humanised	Millenium Pharm	Phase VII
CTLA-4	Prostate, Melanoma	MDX-010	Human	Medarex	Phase VII

Abbreviations: AML – acute myeloid leukaemia; B-CLL – B-cell chronic lymphocytic leukaemia; CEA – carcinoembryonic antigen; CMI – Centre for Molecular Immunology, Cuba; CTLA-4 – cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; EGFR – epidermal growth factor receptor; FDA – US Food and Drug Administration; HLA – human leukocyte antigen; LICR – Ludwig Institute for Cancer Research; NHL – Non-Hodgkin's lymphoma; NSCLC – non-small cell lung carcinoma; PSMA – prostate-specific membrane antigen; VEGFR-2 – vascular endothelial cell growth factor receptor-2.

A sfavore dell'uso degli anticorpi a fine terapeutico c'è: la farmacocinetica sfavorevole; emivita breve; difficilmente penetrano nel tumore. Attualmente sono numerosi gli anticorpi usati contro il tumore. La loro nomenclatura generica segue le regole già dette per gli anticorpi a uso terapeutico.

Rituximab=Ri-tu(tumore)-xi(chimerico)-mab

Daclizumab=Dac-li(sistema immunitario)-zu(umanizzato)-mab

ATTENZIONE: la terapia oncologica fa uso anche di piccole molecole di sintesi che bersagliano le stesse proteine degli anticorpi. Dalle regole di nomenclatura è facile distinguere un farmaco basato su anticorpi (-mab finale) da una piccola molecola (-ib finale)

Generic naming formula:

Name = prefix + substem(s) + stem

variable

-mab monoclonal antibody
-ib small molecule with inhibitory properties

Monoclonal antibodies

	Target	Source
-ci(r)-	circulatory system	-ximab chimeric human-mouse
-li(m)-	immune system	-zumab humanized mouse
-t(u)-	tumor	-mumab fully human

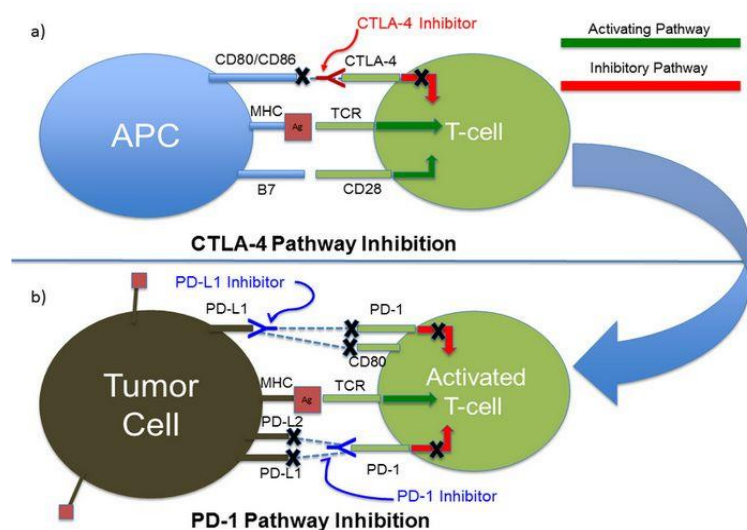
Small molecules

-tinib	tyrosine kinase inhibitor
-zomib	proteasome inhibitor
-ciclib	cyclin-dependent kinase inhibitor
-parib	poly ADP-ribose polymerase inhibitor

Gli anticorpi sono molto costosi, e ci possono essere anche effetti tossici importanti, per questo è necessario essere sicuri di quell'antigene che costituisce il bersaglio.

6.3 CHECKPOINT IMMUNOLOGICI

Come detto precedentemente, il sistema immunitario utilizza dei recettori, quali ad esempio, CTLA-4 e PD1, per creare una temporizzazione: quando si attiva il linfocita, la sua azione è già definita da un punto di vista temporale; dopo un certo lasso di tempo, il linfocita viene inibito. I checkpoint immunologici partecipano inoltre al mantenimento della tolleranza periferica. I tumori, però, esprimono recettori come PDL1 e 2 che inibiscono i linfociti. Una strategia terapeutica di successo prevede l'utilizzo di anticorpi neutralizzanti contro CTLA4 o PDL1. Nel primo caso avremo l'inibizione della soppressione dovuta a cellule dendritiche, nel secondo caso l'inibizione della soppressione dovuta al tumore.



INIBITORI CHECKPOINT IMMUNITARIO

Keytruda (pembrolizumab) lega e blocca il recettore PD-1

Opdivo (nivolumab) lega e blocca il recettore PD-1

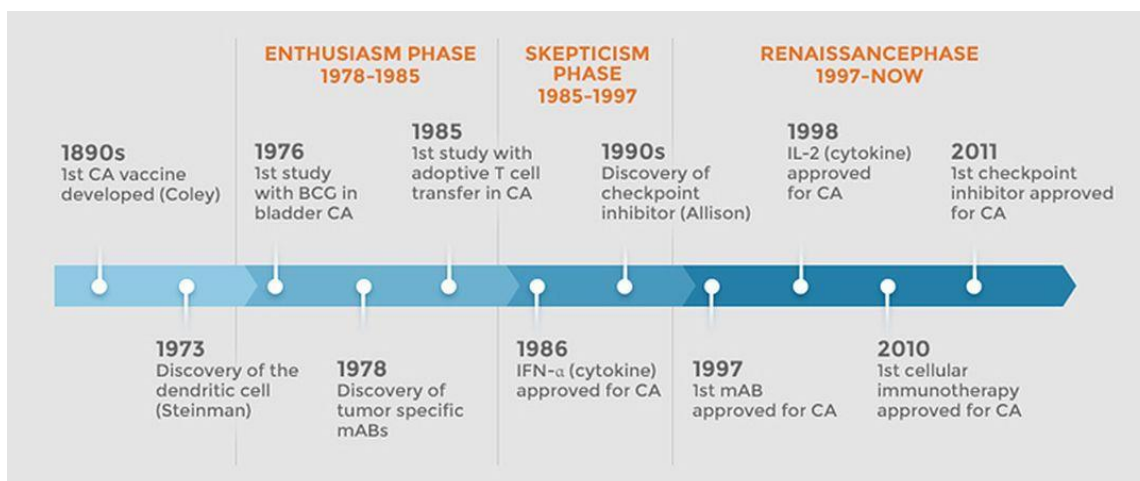
Miglioramento della sopravvivenza e del tempo di ricorrenza

Approvati per

NSCLC, Linfoma di Hodgkin, Tumore uroteliale, melanoma, Tumore gastrico, Carcinoma epatocellulare, **Tumori con instabilità dei microsatelliti** (sottopopolazioni di colon-retto, endometrio, gastro-intestinale)

6.4 Altre strategie terapeutiche

L'uso dei checkpoint immunologici è solo l'ultima tappa di una storia dell'immunoterapia dei tumori che abbiamo fatto partire con la tossina di Coley.



Solo dal 1997 è stato approvato il primo anticorpo contro il tumore, e tale data può essere considerata come l'inizio di una nuova era per l'immunoterapia oncologica. Le immunoterapie di questo tipo hanno determinato in molti casi un miglioramento della sopravvivenza e l'aumento del tempo di ricorrenza (ossia, il tempo che passa prima che il tumore ricompaia).

Uno dei problemi della terapia dei tumori risiede nell'eterogeneità tra tumori diversi, anche tra pazienti con lo stesso tipo di tumore. Ma se l'obiettivo è attivare il sistema immunitario contro il tumore, si può sperare che tale problema possa essere superato. In questo contesto è promettente il fatto che per la prima volta, gli inibitori dei checkpoint immunologici siano stati approvati per una categoria di tumori, quali quella con instabilità dei microsatelliti, ossia sono utilizzati per trattare sottopopolazioni di tumori differenti (gastrointestinale, colon-retto, endometrio).

6.4.1 Terapia CAR-T

Si tratta di una terapia simile a un trasferimento cellulare adottivo: si prendono dal sangue i leucociti, si inserisce il gene nei linfociti T per far esprimere un antigene chimerico. Il linfocita T modificato esprimerà allora il recettore CAR (per l'antigene chimerico); una volta espanso in vitro le cellule sono re-inoculate nel paziente e saranno in grado di riconoscere l'antigene espresso dalle cellule tumorali. Questa terapia è stata primariamente usata nella terapia di tumori del sangue. Quindi, deve esistere un bersaglio specifico espresso da tutte le cellule tumorali. Il recettore CAR si ottiene dalla fusione della porzione variabile di un anticorpo con il dominio co-stimolatorio CD28 e la porzione intracellulare di CD3 (fa parte del complesso TCR). Quindi a valle del riconoscimento di un antigene tumorale il linfocita T sarà attivato senza necessità della cellula APC. La terapia per adesso è approvata solo per tumori ematologici nei quali è più semplice individuare l'antigene associato alle cellule tumorali (es: CD19 nel linfoma a cellule B).

