

Un futuro che è già presente

Nei testi medici dell'Antico Egitto sono descritti casi di pazienti guariti dal cancro a seguito della comparsa di febbre o altri sintomi tipici di malattie infettive. Allora mancavano gli strumenti teorici e tecnici per interpretare questi episodi, che venivano giudicati semplicemente inspiegabili o miracolosi. L'idea che l'attivazione della risposta immunitaria a seguito dell'infezione di un patogeno potesse avere un effetto anche contro il cancro è stata messa alla prova sperimentalmente solo a partire dalla seconda metà del XIX secolo. Tra il 1860 e il 1880, infatti, i medici tedeschi Wilhelm Busch e Friedrich Fehleisen avevano dimostrato che, infettando pazienti oncologici con il batterio *Streptococcus pyogenes* si osservava una riduzione delle metastasi. Nel 1891 un medico americano, William Coley, fece uno studio sistematico su oltre 1000 pazienti affetti da sarcoma. Somministrando ai pazienti

una miscela di batteri uccisi con il calore (quindi non patogeni), Coley ottenne un numero significativo di remissioni o guarigioni da un tumore considerato incurabile. Il metodo di Coley perse popolarità, sia per la scarsa riproducibilità degli effetti sia per l'introduzione dei primi chemioterapici e della radioterapia. Tuttavia nel 1976 William Coley ebbe la sua rivincita, anche se postuma dato che era scomparso nel 1936. Un gruppo di medici canadesi pubblicò uno studio in cui si dimostrava che, inoculando il ceppo batterico attenuato utilizzato da oltre trent'anni per vaccinare contro la tubercolosi (il bacillo Calmette-Guérin o BCG) in pazienti affetti da tumore alla vescica, si riduceva la comparsa di recidive. Oggi, William Coley è considerato uno dei padri fondatori della *immunoterapia antitumorale*. Ma in che cosa consiste?

Stimoli appropriati

Il nostro organismo è sorvegliato da forze di polizia molto efficienti nel riconoscere una «scena del crimine» e intervenire per fermare i colpevoli. Sono le cellule del sistema immunitario, in particolare i linfociti T. Si tratta di veri e propri «detective molecolari» che presentano sulla loro superficie dei recettori che funzionano da sensori, in grado di rilevare elementi estranei nel nostro corpo. Abbiamo visto come, durante la trasformazione tumorale, una cellula accumuli mutazioni nei suoi geni, che spesso portano a esprimere proteine aberranti. Queste proteine al-

terate, se da un lato favoriscono la proliferazione del tumore, dall'altro lasciano delle tracce in grado di allertare le difese immunitarie. Sono i cosiddetti antigeni associati ai tumori o TAA (*Tumour-Associated Antigens*). Questi corti peptidi derivano dalla frammentazione delle proteine aberranti, che vengono esposti alla superficie delle cellule tumorali legati a recettori detti *complessi maggiori di istocompatibilità* o MHC (*Major Histocompatibility Complex*). La presenza di TAA esposti dai complessi MHC marchia le cellule come tumorali. I linfociti T sono in grado, allora, di interagire fisicamente con il complesso MHC presentante l'antigene attraverso i loro recettori T specifici (*T-Cell Receptor*, o TCR). Il legame dei TCR con il complesso MHC della cellula tumorale attiva il linfocita T che inizia a proliferare, generando una popolazione di linfociti specifici capaci di riconoscere e distruggere tutte le cellule tumorali che presentano quel particolare TAA sulla loro superficie. Durante questo processo vengono rilasciate delle piccole proteine che aumentano la stimolazione dei linfociti T: si tratta di fattori immunostimolanti come l'interleuchina-2 (IL-2), l'interferone alfa (IFN- α) o il fattore di crescita dei macrofagi GM-CSF.

La scoperta di questi fattori e del loro ruolo nello stimolare la risposta immunitaria ha suggerito la possibilità di somministrarli ai pazienti affetti da tumore, allo scopo di irrobustire la capacità delle loro difese immunitarie di attaccare il cancro. Per esempio, oggi si utilizzano l'IL-2 e l'IFN- α per il trattamento di melanomi metastatizzanti.

Con i fattori di stimolazione appropriati si possono anche attivare in laboratorio le cellule del sistema immunitario prelevate dal paziente, per poi re-infonderle nell'organismo dove possono aggredire il tumore. Su questo principio si basa Sipuleucel-T, il primo vaccino terapeutico anticancro approvato per il trattamento di alcune forme di tumore alla prostata. Questo metodo prevede l'isolamento da un prelievo di sangue del paziente di cellule dendritiche e macrofagi, cioè le cellule specializzate nel presentare l'antigene ai linfociti T. Le cellule sono poste in presenza del fattore di crescita GM-CSF e di uno specifico antigene espresso alla superficie delle cellule del tumore della prostata: la *fosfatasi acida prostatica* (PAP). Le cellule del paziente assorbono la PAP, ne espongono i frammenti alla loro superficie attraverso i recettori MHC e, grazie al fattore di crescita, proliferano dando origine a una popolazione di cellule che presentano tutte l'antigene tumorale. Una volta re-infuse nel paziente, queste cellule potranno stimolare i linfociti T a riconoscere e distruggere le cellule tumorali presentanti la PAP alla loro superficie (figura 18).

Tutto il processo, dal prelievo di sangue alla re-infusione delle cellule attivate, dura circa quattro giorni e un ciclo completo di cura prevede tre infusioni.

Sipuleucel-T è stato approvato negli USA nel 2010 e nel 2013 dall'EMA, l'Agenzia europea per i medicinali, dopo che gli studi clinici avevano mostrato la sua capacità di prolungare la vita ai pazienti trattati. Il suo impiego, però, è tutt'ora controverso

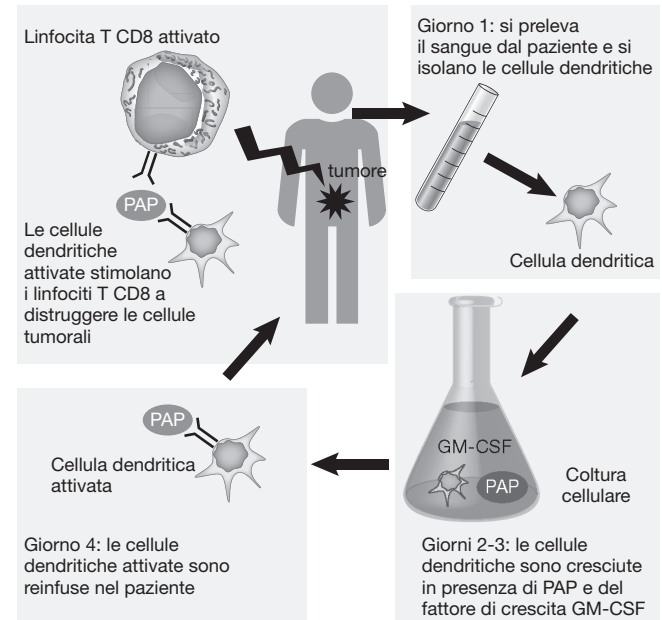


Figura 18. Schema della terapia Sipuleucel-T.

sia per gli alti costi (oltre 90 000 euro per ogni ciclo completo) sia perché al momento mancano le prove che possa portare alla guarigione. Per questo motivo l'azienda produttrice nel 2015 ha chiesto all'EMA il ritiro dell'autorizzazione. Tuttavia, lo sviluppo di questo vaccino ha dato un impulso importante alla ricerca di altre strategie terapeutiche basate sull'attivazione del sistema immunitario. Un vaccino terapeutico tutto italiano in fase di sperimentazione clinica presso l'Istituto Nazionale Tumori di Napoli Pascale è Hepavac-201, sviluppato per prevenire o ritardare le recidive del tumore al fegato. Il vaccino contiene 16 antigeni selezionati

da tumori del fegato provenienti da diversi malati a cui è aggiunto un immunomodulatore per aumentare l'efficacia della stimolazione dei linfociti T.

Entra in scena mister mRNA

Uno dei risultati scientifici più straordinari raggiunti durante la pandemia di Covid-19 è stato lo sviluppo di un vaccino efficace a pochi mesi dall'inizio della pandemia. Questo è stato possibile grazie all'utilizzo della *tecnologia dell'mRNA*, e nel 2023 il premio Nobel per la Medicina è stato assegnato a Katalin Karikó e Drew Weissman che ne hanno reso possibile l'utilizzo per i vaccini.

Questa tecnologia può essere applicata allo sviluppo di vaccini contro molte patologie, incluso il cancro. Il principio è (in teoria) molto semplice. Gli mRNA contengono le istruzioni per sintetizzare le proteine: basterebbe allora fornire alle cellule il giusto mRNA per farle produrre uno specifico antigene che attiverà così la risposta immunitaria. Nel caso del vaccino anti-Covid l'antigene è la proteina Spike di SARS-COV-2, nel caso del cancro dovremmo usare gli antigeni espressi solo dalle cellule tumorali, quei TAA che abbiamo già incontrato. Semplice a parole... un po' meno semplice fare in modo che tutto funzioni. Innanzitutto, bisogna assicurarsi che l'mRNA venga tradotto nella proteina corrispondente con la massima efficienza. È necessario poi impedire che l'mRNA sia degradato troppo rapidamente all'interno della cellula. In-

fine è essenziale evitare che l'mRNA, essendo riconosciuto come «estraneo», attivi l'immunità innata scatenando una risposta infiammatoria. Il superamento di questi ostacoli ha richiesto per ciascuno la messa a punto di soluzioni specifiche in oltre 30 anni di ricerche. Vediamo meglio.

Abbiamo visto che, in ogni mRNA, la sequenza contenente le istruzioni per sintetizzare le proteine è fiancheggiata alle estremità da due regioni non tradotte (UTR). Queste sequenze servono da punto di aggancio per i fattori proteici necessari a dare inizio alla sintesi proteica. Ciascun mRNA ha regioni UTR differenti le quali, a loro volta, sono riconosciute dai fattori di inizio con affinità diverse. Una strategia per ottimizzare l'efficienza con cui il nostro mRNA viene utilizzato, quindi, è dotarlo di sequenze UTR ad «alte prestazioni».

Negli eucarioti l'estremità 5' dell'mRNA è contrassegnata da un «cappuccio» di 7-metilguanosina detto *5'-cap*, che modula sia l'efficienza di traduzione che la stabilità dell'mRNA. All'estremità 3' è presente invece una catena di residui di adenosina, chiamata *coda di poli(A)* che regola ulteriormente la stabilità dell'mRNA. L'introduzione di modificazioni chimiche al 5'-cap e nella coda di poli(A) aumenta sia l'efficienza sia la stabilità degli mRNA.

Una volta veicolato all'interno della cellula, il nostro mRNA potrebbe essere riconosciuto come estraneo da specifiche proteine recettoriali, attivando una risposta infiammatoria. Tuttavia, è possibile eliminare l'immunogenicità degli mRNA sostituendo tutti i residui di uridina, uno dei nu-

cleosidi¹⁷ che compongono l'RNA, con nucleosidi modificati, come la pseudouridina e la 2-tiouridina.

Insomma, utilizzare un mRNA sintetico per dirigere la sintesi di una proteina di interesse da parte delle cellule non è una cosa banale. Oggi sono in corso di sperimentazione clinica vaccini realizzati con questa tecnologia e diretti contro diversi tipi di tumore: glioblastoma, melanoma, cancro alla prostata, sarcoma di Ewing, cancro al seno.

Cambio di programma

La capacità dei linfociti T di attaccare in maniera specifica un tumore è una scoperta recente. Solo nel 1991 un team di ricerca belga ha dimostrato che esisteva uno specifico antigene, espresso dalle cellule di melanoma, capace di stimolare questi linfociti a distruggere le cellule cancerose. Da allora si è capito che ogni tumore esprime antigeni specifici in grado di dirigere la risposta immunitaria. Perché allora non provare a «riprogrammare» direttamente in laboratorio i linfociti T di un paziente per renderli capaci di aggredire direttamente un tumore? È quello che fa la *Adoptive Cell Therapy* o ACT, un insieme di tecniche basate sull'isolamento di linfociti T che sono poi modificati con l'ingegneria genetica per renderli altamen-

¹⁷ Negli acidi nucleici, i nucleosidi sono le molecole formate dal legame di una base azotata con uno zucchero pentoso. L'uridina è il nucleoside formato dal legame tra uracile e ribosio.

te specifici nei confronti degli antigeni presenti sulle cellule tumorali. L'applicazione di maggiore successo è rappresentata dalle *cellule T esprimenti recettori chimerici* (che per brevità indicheremo con l'acronimo inglese CAR-T). Abbiamo già detto che il riconoscimento tra linfocita T e antigene tumorale è mediato dal recettore TCR presente sulla cellula T. Ogni linfocita esprime un TCR specifico per un dato antigene. Quando il primo linfocita T si lega all'antigene sulla cellula bersaglio, si attivano degli stimoli che inducono la proliferazione di una popolazione esprimente lo stesso TCR, così che si venga a formare una «reggimento guastatori» che attacca altre cellule cancerose. Il trucco usato dalla CAR-T è quello di riprogrammare in laboratorio dei linfociti T, così da fare loro esprimere il giusto TCR e farli moltiplicare in provetta prima di somministrarli al paziente. In questo modo il reggimento guastatori è già pronto e può immediatamente iniziare la sua opera distruttrice. Questo è possibile grazie all'*editing genomico*, in particolare la recentissima tecnologia chiamata CRISPR/Cas9. In realtà si tratta di un meccanismo usato da milioni di anni dai batteri per difendersi dai virus, che a partire dal 2012 è stato adattato per modificare la sequenza di un genoma in un qualsiasi punto desiderato. Il sistema si basa su una *endonucleasi*, cioè un enzima in grado di tagliare il DNA, chiamata Cas9, accoppiata a un corto filamento di RNA, detto RNA guida. È possibile sintetizzare questo RNA in laboratorio con la sequenza desiderata, in grado cioè di appaiarsi a una sequenza complementare di

DNA, che costituisce il sito che si vuole modificare. L'RNA guida così l'endonucleasi alla posizione desiderata, dove verrà operato il taglio. A partire da questa interruzione, è possibile inserire una nuova sequenza di DNA o sostituire il tratto di DNA endogeno con uno sintetizzato in laboratorio con una sequenza desiderata. Ma esistono varianti di questa tecnica in cui la nucleasi Cas9 è sostituita da altri enzimi, in grado di introdurre modificazioni chimiche in una singola base del DNA a piacere. Oggi esistono librerie di RNA guida in grado di appaiarsi virtualmente a tutti i geni umani e di molti altri organismi. Grazie a questa tecnologia, i ricercatori possono inserire il gene codificante il TCR specifico per l'antigene desiderato (per esempio quello espresso da un particolare tipo di cancro) nei linfociti T prelevati dal paziente. Reintroducendo la popolazione di cellule T modificate, queste sono immediatamente capaci di attaccare il tumore. La prima terapia CAR-T è stata approvata nel 2016 negli USA per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta. In Europa oggi sono disponibili sei terapie CAR-T per alcuni specifici tipi di linfoma, leucemia linfoblastica acuta (il tumore più frequente in età pediatrica) o mieloma per pazienti che non rispondono alla chemioterapia convenzionale. In Italia sono presenti 31 centri ospedalieri accreditati per la somministrazione di queste terapie. Al momento il loro utilizzo è però limitato da due fattori: la complessità della manipolazione genetica che richiede laboratori di alto livello e i costi. Ma col progredire della tecnologia queste te-

rapie potranno diventare più accessibili. Sono in corso numerosi studi per valutarne l'utilizzo anche contro altri tumori, per esempio il glioblastoma, un tumore cerebrale tra i più difficili da trattare.

Senza freni

La risposta immunitaria è un meccanismo di offesa e di difesa allo stesso tempo. Ci difende dalle invasioni (di patogeni o di tumori) attraverso un'offensiva coordinata operata da cellule (linfociti T) e proteine (anticorpi prodotti dai linfociti B e chemochine come gli interferoni e le interleuchine). Ma come tutte le offensive, anche quella operata dalle nostre difese immunitarie può produrre danni collaterali, causati da un eccessivo prolungamento della risposta infiammatoria oppure da un attacco aspecifico diretto contro i tessuti sani circostanti. Per questo, accanto a segnali stimolatori, sono presenti circuiti inibitori che hanno il compito di ridurre al minimo gli effetti dannosi. Insomma, un po' come fa il trombettiere che dà il segnale per l'attacco suonando la carica e poi allo stesso modo segnala il cessate il fuoco quando l'attacco si è esaurito. Tra questi circuiti di segnalazione, un ruolo molto importante lo giocano i *checkpoint immunologici*, una serie di *relais* molecolari che servono ad attenuare o spegnere la risposta immune. Si tratta di piccole proteine segnale che legano i TCR o altri recettori specifici presenti sui linfociti, bloccandone la funzione. È stato visto che, nel corso

della trasformazione tumorale, le cellule cancerose possono acquisire la capacità di esprimere a loro volta queste proteine del checkpoint inibitorie, spegnendo la risposta immunitaria diretta contro il tumore stesso. In particolare, molte cellule tumorali esprimono la proteina PD-L1, che si lega al recettore PD1 presente sui linfociti T, inibendoli. Un'altra proteina con funzione simile è la proteina B7 che si lega al recettore CTLA-4 presente sulle cellule T citotossiche. Nel 1996, il gruppo di ricerca guidato da James P. Allison dell'Università di Berkeley, in California, dimostrò per la prima volta che gli anticorpi monoclonali in grado di impedire il legame di B7 a CTLA-4 erano capaci di aumentare la risposta immunitaria contro i tumori in modelli animali. Negli stessi anni Tasuku Honjo, dell'Università di Kyoto, identificava PD1 e ne chiariva il ruolo, arrivando a conclusioni simili a quelle di Allison: modulandone l'attività era possibile indurre una risposta immunitaria contro i tumori. Da queste osservazioni fondamentali derivano le attuali immunoterapie basate sugli inibitori dei checkpoint immunologici. E anche per Allison e Honjo nel 2018 è arrivato il premio Nobel per la Medicina. Oggi, la terapia basata su anticorpi in grado di bloccare l'attività sia di PD1 sia di PD-L1 (e quindi impedire l'inibizione dei linfociti da parte della proteina PD-L1 prodotta dalle cellule tumorali) è quella che sta dando i migliori risultati contro diversi tipi di cancro, come quello al polmone e al rene, il melanoma e linfomi. Recenti studi hanno suggerito che la combinazione di an-

ticorpi diretti contro CTLA-4 e PD1 potrebbe essere ancora più efficace. Si tratta, tuttavia, di terapie non prive di effetti collaterali: eliminano infatti un freno fisiologico all'iperattivazione del sistema immunitario, che come abbiamo detto può danneggiare l'organismo. Tuttavia, modulando dosaggio e tempi di somministrazione, gli effetti collaterali possono essere tenuti sotto controllo, consentendo di conseguire successi terapeutici contro tumori molto difficili da aggredire con la sola chemioterapia convenzionale.

Ma per combattere i tumori, oltre che avvalerci di cellule «amiche» come i linfociti, oggi siamo in grado anche di sfruttare alcuni dei nostri nemici naturali: i virus e i batteri patogeni.

Virus (anti)tumorali

Certi virus possono causare tumori grazie alla loro capacità di infettare cronicamente le cellule, alterando le vie di regolazione della proliferazione cellulare. Ma i virus sono anche perfetti mezzi d'assalto per invadere una cellula, causandone la distruzione. Ecco allora l'idea di modificare i virus per renderli selettivamente in grado di infettare e distruggere le cellule tumorali, trasformandoli in *virus oncolitici*. Il primo agente antitumorale virale a essere stato approvato per l'uso clinico nel 2015 è il T-VEC. Si tratta di un comunissimo, e per la maggior parte delle persone innocuo, virus erpetico: l'*herpes simplex 1* o HSV-1. Questo virus

infetta la maggior parte della popolazione mondiale (tipicamente durante la prima infanzia) e una volta penetrato nell'organismo si insedia nei neuroni del ganglio del trigemino dove permane per tutta la vita. Le persone con un normale sistema immunitario non hanno conseguenze dalla presenza di questo parassita, che infetta gli esseri umani da centinaia di migliaia di anni. Occasionalmente HSV-1 può riattivarsi, a seguito di uno stress o indebolimento del sistema immunitario, e causare la tipica «febbre del labbro», con la comparsa di vescicole dolorose che però si risolvono nel giro di pochi giorni. In pazienti gravemente immunocompromessi, invece, HSV-1 può attaccare il sistema nervoso centrale causando encefaliti. T-VEC è un HSV-1 modificato geneticamente in due modi. Innanzitutto, dal suo genoma sono stati eliminati due geni che normalmente consentono al virus di evadere la risposta cellulare antivirale, replicandosi così all'interno della cellula infetta. In questo modo T-VEC non può infettare le cellule normali, ma è ancora in grado di replicarsi all'interno delle cellule di certi tumori, in cui i meccanismi di difesa sono alterati. Inoltre, a T-VEC è stato aggiunto il gene per la proteina umana GM-CSF, un fattore di stimolazione dei macrofagi e dei linfociti T. La cellula tumorale infettata da T-VEC produrrà GM-CSF che stimola la risposta immunitaria diretta contro la cellula stessa. Quindi, la distruzione delle cellule cancerose ad opera di T-VEC avviene secondo due modalità: la continua replicazione virale porta alla morte della cellula, ma allo stesso tempo si attiva

la risposta immunitaria che stimola i macrofagi e i linfociti T ad attaccare la cellula infetta. Insomma, la cellula cancerosa infettata da T-VEC non ha scampo! La terapia che utilizza T-VEC è oggi approvata per il trattamento dei melanomi avanzati, ma se ne sta studiando l'impiego anche per il carcinoma epatico.

Ma usare i virus contro i tumori può avere altri vantaggi. Una delle maggiori difficoltà nell'aggre- dire tumori cerebrali con i farmaci è oltrepassare la barriera ematoencefalica. Questa struttura anatomica fa da filtro tra l'encefalo e il resto dell'organi- smo, impedendo che il circolo sanguigno apporti, assieme ai nutrienti essenziali al suo funzionamen- to, sostanze dannose all'organo più delicato del nostro corpo: il cervello. Purtroppo questo filtro è anche molto efficace nell'impedire l'accesso alle molecole dei farmaci, ma è possibile sfruttare alcu- ni virus oncolitici per superare la barriera ematoen- cefalica e aggredire tumori cerebrali come i gliomi. Un team internazionale americano e inglese, per esempio, sta studiando un virus per il trattamento del glioma. È una versione geneticamente modifi- cata di un virus enterico del genere Reovirus, natu- ralmente innocuo per gli esseri umani, battezzata Pelareorep. Questo virus oncolitico è stato proget- tato per consentirne la replicazione solo in cellule tumorali in cui sia attivato l'oncogene *RAS*. L'azio- ne di Pelareorep è simile a quella del T-VEC: di- strugge le cellule e stimola il sistema immunitario. I ricercatori hanno notato che Pelareorep, sommi- nistrato per endovena, era in grado di localizzarsi a

livello dei tumori cerebrali in modelli murini (cioè nei topi) e di indurre una stimolazione del sistema immunitario, con attivazione dei linfociti T. La sua efficacia nel trattamento dei pazienti affetti da tumori cerebrali è ancora in fase di studio. Sempre utilizzando modelli animali, i ricercatori hanno anche dimostrato che gli inibitori del checkpoint diretti contro PD-1 erano più efficaci dopo il trattamento con Pelareorep, grazie alla capacità di questo virus oncolitico di condizionare il microambiente tumorale verso una maggiore sensibilità alla risposta immunitaria. Attualmente Pelareorep ha avuto l'approvazione da FDA per il trattamento del tumore al seno metastatico, tumore dell'ovaio e tumore del pancreas.

Un gruppo di ricerca della Duke University, in North Carolina (USA), hanno invece messo a punto un derivato oncolitico del virus della poliomielite. Il virus di partenza era il ceppo attenuato utilizzato di routine per la vaccinazione secondo Sabin, in cui è stata inserita una porzione del genoma del virus del raffreddore. Questo ibrido, chiamato PVSRIPO, non è più in grado di infettare i neuroni, eliminando qualsiasi rischio di paralisi flaccida, una delle conseguenze più gravi della poliomielite. Inoltre, il virus è stato programmato per replicarsi solo in cellule tumorali in cui fosse attivo un preciso oncogene. Nei modelli animali questo virus oncolitico si è dimostrato efficace nell'attaccare cellule cancerose di glioma e melanoma. Inoltre, il virus era in grado di stimolare una potente risposta immunitaria antitumorale. Anche in questo caso,

per l'eventuale terapia bisognerà aspettare la conclusione dei trial in corso.

I virus sono anche utilizzati come vettori per la *terapia genica* anticancro. Sono cioè usati come trasportatori di «geni killer», che una volta espressi nelle cellule tumorali ne inducono la morte. Si tratta per la maggior parte di strategie ancora molto sperimentali, ma la prima terapia genica antitumorale basata su vettori virali è già realtà. Nel 2003 in Cina è stata introdotta Gendicine, una terapia genica sviluppata inizialmente per il *carcinoma a cellule squamose*, un tumore della pelle. La terapia è basata su un adenovirus di tipo 5 (Ad5) modificato, in cui sono stati eliminati i geni per la replicazione del virus nella cellula infetta. In questo modo Ad5 è ancora in grado di penetrare nella cellula ed esprimere i suoi geni, ma non avendo gli enzimi per la replicazione del genoma non è in grado di dirigere la sintesi di nuove particelle virali e avviare un nuovo ciclo infettivo. Al posto dei geni mancanti, nel genoma di Ad5 è stato inserito il gene umano per la proteina p53. L'espressione di questa proteina, lo sappiamo già, attiva i checkpoint del ciclo cellulare, bloccando la proliferazione e inducendo l'apoptosi, ma è frequentemente inattivata nei tumori. La terapia prevede l'iniezione del virus killer direttamente al sito del tumore, dove si introdurrà nelle cellule cancerose e dirigerà l'espressione della p53, causando così la morte della cellula tumorale. A 15 anni dalla sua introduzione in clinica, questa terapia è stata utilizzata su oltre 30 000 pazienti affetti da diversi tipi di cancro, spesso in

combinazione con chemioterapia e radioterapia, mostrando una buona efficacia terapeutica senza eventi significativi di tossicità. Al momento Gendicine è approvata per l'uso clinico solo in Cina, ma si sta lavorando per ottenerne l'approvazione dalla FDA americana e, in un prossimo futuro, forse anche dall'Europa.

Sempre in Cina è stato sviluppato Oncorine, un adenovirus modificato il cui utilizzo clinico è approvato per il trattamento del carcinoma naso-faringeo e dei tumori testa-collo, ma recenti studi clinici ne hanno dimostrato la potenzialità come trattamento del carcinoma gastrico.

Insomma, la moderna medicina molecolare è capace anche di rendere i virus preziosi alleati nella lotta al cancro. Ma non solo.

Batteri per battere il cancro

Alla fine del XIX secolo si era già capito che le infezioni batteriche stimolavano la risposta immunitaria contro i tumori. Si tratta di un meccanismo indiretto, una specie di effetto collaterale (positivo) della risposta dell'organismo all'ingresso dei patogeni. Ma allora perché non rendere i batteri capaci di infettare direttamente i tessuti tumorali, trasformandoli in potenti armi anticancro? I batteri, però, sono un po' più complessi da manipolare rispetto ai virus. Innanzitutto sono vere e proprie cellule dotate di un metabolismo complesso, mentre i virus sono delle scatole di proteine con dentro

un pacchetto di geni. Inoltre, hanno genomi molto più grandi dei virus, e spesso esprimono proteine tossiche per l'organismo (i *fattori di virulenza*) che facilitano la loro proliferazione e causano i sintomi più acuti (a volte anche mortali) dell'infezione.

Allo stesso tempo, però, grazie alla loro complessità metabolica, i batteri possono diventare dei veri e propri *bioreattori*: fabbriche di sostanze chimiche complesse e proteine che, quando liberate, possono essere tossiche per i tumori. E al contrario dei virus, che sono trasportati passivamente dal fluido in cui si trovano, i batteri possono muoversi autonomamente usando ciglia e flagelli. Non solo: grazie a una loro capacità chiamata *chemiotassi*, possono dirigersi verso particolari distretti anatomici seguendo tracce chimiche.

Il problema di rendere oncotossici i batteri, per così dire, è duplice: da un lato bisogna «disarmarli» eliminando i fattori di virulenza, dall'altro bisogna «addestrarli» ad attaccare le cellule tumorali. Per quanto possa sembrare complicato, oggi questo è possibile grazie alla biologia molecolare e all'ingegneria genetica.

Alcuni batteri hanno una naturale capacità di infiltrare i tessuti tumorali in maniera più efficiente di quelli sani. Per esempio, *Salmonella typhimurium*, è attratta dai metaboliti presenti nel microambiente del tessuto tumorale. I batteri del genere *Listeria*, invece, raggiungono i tumori come conseguenza della loro capacità di infettare macrofagi e altre cellule del sistema immunitario, particolarmente abbondanti nei tessuti cancerosi a causa

dell'infiammazione indotta dal tumore stesso. Infine, i batteri anaerobi obbligati come *Clostridium*, che non sopravvivono negli ambienti ricchi di ossigeno come i tessuti sani, sono invece a loro agio all'interno delle masse tumorali, caratterizzate da ipossia. Il problema è che tutti questi batteri sono patogeni, e possono causare sintomi molto gravi. Sono state allora messe a punto diverse strategie per renderli meno pericolosi. *Salmonella* è stata privata del gene per la componente lipopolisaccaridica della parete batterica, una potente tossina. La modifica è stata introdotta in ceppi di *Salmonella* che non riescono a sintetizzare alcuni nutrienti essenziali. Questi ceppi, definiti *auxotrofici*, non sopravvivono bene nei tessuti normali, dove i livelli di questi metaboliti sono bassi, ma trovano un ambiente più favorevole nei tessuti tumorali, che sono ricchi di nutrienti in conseguenza della loro elevata attività metabolica. Ai batteri del genere *Listeria* sono stati inattivati alcuni tra i principali geni di virulenza, responsabili della disseminazione dei batteri nel tessuto dell'ospite. Infine, per quanto riguarda *Clostridium*, sono stati creati ceppi non patogeni eliminando il gene per una tossina che questi batteri esprimono nell'organismo infetto.

Dopo aver disarmato i nostri batteri, il passo successivo è stato aumentare la selettività di questi ceppi attenuati per i tessuti tumorali. Sono state esplorate diverse strategie. Un gruppo di ricerca cinese e coreano ha modificato geneticamente ceppi di *Salmonella* attenuati, aggiungendo un corto segmento peptidico alla sequenza di una proteina

sulla superficie della cellula batterica. Questo segmento è il ligando preferenziale per un recettore espresso ad alti livelli sulla membrana esterna delle cellule cancerose. In questo modo, il tumore funzionava un po' da carta moschicida, attirando i batteri e facendoli aderire al tessuto canceroso. Con un metodo simile, un team dell'Università di Cracovia, in Polonia, hanno fatto esprimere un anticorpo specifico per un antigene tumorale alla superficie di ceppi attenuati di *Salmonella*, di nuovo aumentando l'affinità delle cellule batteriche per i tessuti cancerosi.

Abbiamo così ottenuto i nostri batteri non patogeni e in grado di infiltrarsi nei tumori. Questo ha aumentato molto l'efficacia della risposta immunitaria indotta verso le cellule cancerose. Ma si può fare di più: si possono dotare questi batteri di nuove armi selettive contro i tumori. In questo è di grande aiuto la complessità metabolica delle cellule batteriche. Infatti, come tutte le cellule, essi regolano l'espressione dei loro geni in risposta agli stimoli ambientali. Si possono riprogrammare questi circuiti per far loro esprimere un prodotto tossico per le cellule cancerose, sia in risposta agli stimoli presenti solo nel microambiente tumorale, sia indotti artificialmente nei pazienti: si otterrebbero dei perfetti batteri anticancro!

Diversi gruppi di ricerca hanno sviluppato ceppi batterici attenuati e selettivi per i tumori, modificati per produrre una potente tossina citolitica (cioè in grado di causare la lisi delle cellule) in risposta a basse concentrazioni di ossigeno. Dato che l'iposs-

sia è una caratteristica delle masse tumorali, questi batteri attivano la tossina in maniera selettiva nel tessuto canceroso. Un gruppo di ricerca dell'Università di Siviglia, in Spagna, hanno invece modificato geneticamente un ceppo attenuato di *Salmonella typhimurium* per fargli produrre una proteina che induce l'apoptosi delle cellule cancerose e contemporaneamente suicidarsi, andando incontro a lisi. In questo modo la proteina proapoptotica viene liberata nell'ambiente tumorale uccidendo le cellule cancerose. Ma è possibile anche trasformare i batteri in vere e proprie armi nucleari! Nei laboratori dell'Albert Einstein College of Medicine a New York (USA), ceppi di *Listeria* sono stati caricati con un isotopo radioattivo, il Renio 188, coniugato a un anticorpo fatto esprimere alla loro superficie. Nei modelli animali per il cancro al pancreas questi batteri radioattivi si accumulavano a livello delle metastasi, distruggendole grazie alle radiazioni ad alta energia emesse dall'isotopo.

Sono solo alcuni esempi: la possibilità di modificare l'informazione genetica dei batteri, unita alla complessità del loro metabolismo, offre moltissime possibilità. Si possono produrre enzimi che attivino *in situ* farmaci tumorali, somministrati al paziente come *profarmaci* inattivi, così da ridurre gli effetti tossici sistemici. Oppure si possono «hackerare» i meccanismi molecolari che regolano la proliferazione delle cellule batteriche, in modo da accelerare la divisione dei batteri oncotossici solo all'interno dei tumori, saturando così rapidamente il tessuto malato senza invadere quelli sani.

Al momento, le strategie terapeutiche basate sui batteri sono ancora in una fase precoce di sviluppo sperimentale, ma nel prossimo futuro potrebbero entrare a far parte del nostro arsenale contro i tumori.