

IMMUNITA' E TUMORI:

- A. esiste una **risposta immunitaria spontanea** contro i tumori?
- B. quali sono le **basi del riconoscimento** delle cellule tumorali da parte del sistema immunitario?
- C. possono attivazione del sistema immunitario e **infiammazione** favorire i tumori?
- D. è possibile sfruttare il sistema immunitario per la **terapia** o addirittura per la **prevenzione** dei tumori?

Risposta spontanea ai tumori: immunosorveglianza

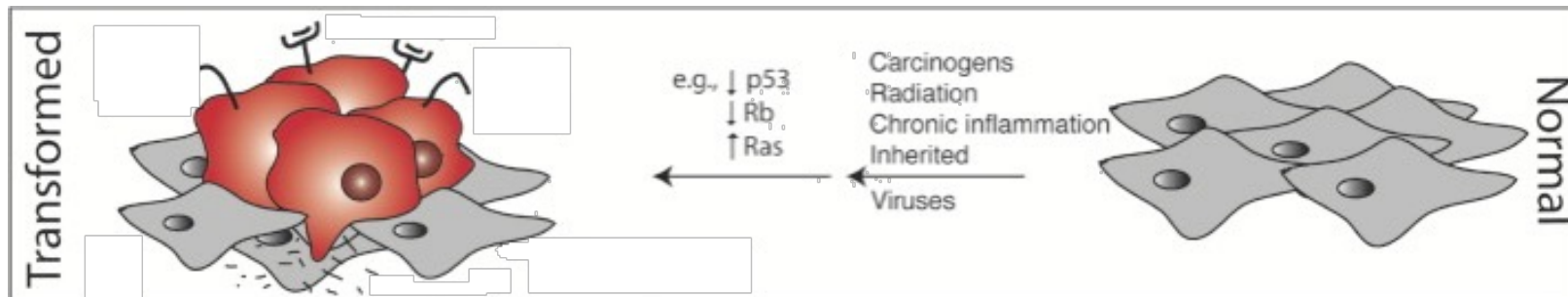
Inizi del '900: Paul Ehrlich propose che una delle funzioni chiave del sistema immunitario fosse quella di proteggere l'individuo dai tumori

Anni '50: Burnet e Thomas proposero la teoria dell' **IMMUNOSORVEGLIANZA**: *il sistema immunitario esercita continuamente un'attività di controllo ed eliminazione di cellule cancerose e pre-cancerose impedendo che si sviluppino tumori clinicamente evidenti.*

Risposta spontanea ai tumori: evidenze nell' uomo

- ✓ Individui sottoposti a trattamenti immuno-soppressivi (es. in seguito a trapianto) oppure affetti da immuno-deficienza congenita o acquisita presentano un' aumentata incidenza di tumori, spesso ad eziologia virale
- ✓ Pazienti trapiantati e sottoposti a trattamenti immuno-soppressivi sviluppano tumori che derivano dall' organo trapiantato
- ✓ La presenza di linfociti infiltranti nel tessuto tumorale è correlata a una prognosi migliore

Riconoscimento dei tumori: caratteristiche delle cellule tumorali



Possibili molecole riconosciute dal sistema immunitario => antigeni tumorali, segnali di stress cellulare, segnali di “danger” o pericolo

Attenzione! Essendo i tumori caratterizzati da un'alta instabilità genetica (mutazioni, riarrangiamenti cromosomici, etc.), le molecole riconosciute dal sistema immunitario possono mutare

Modificata da Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD.

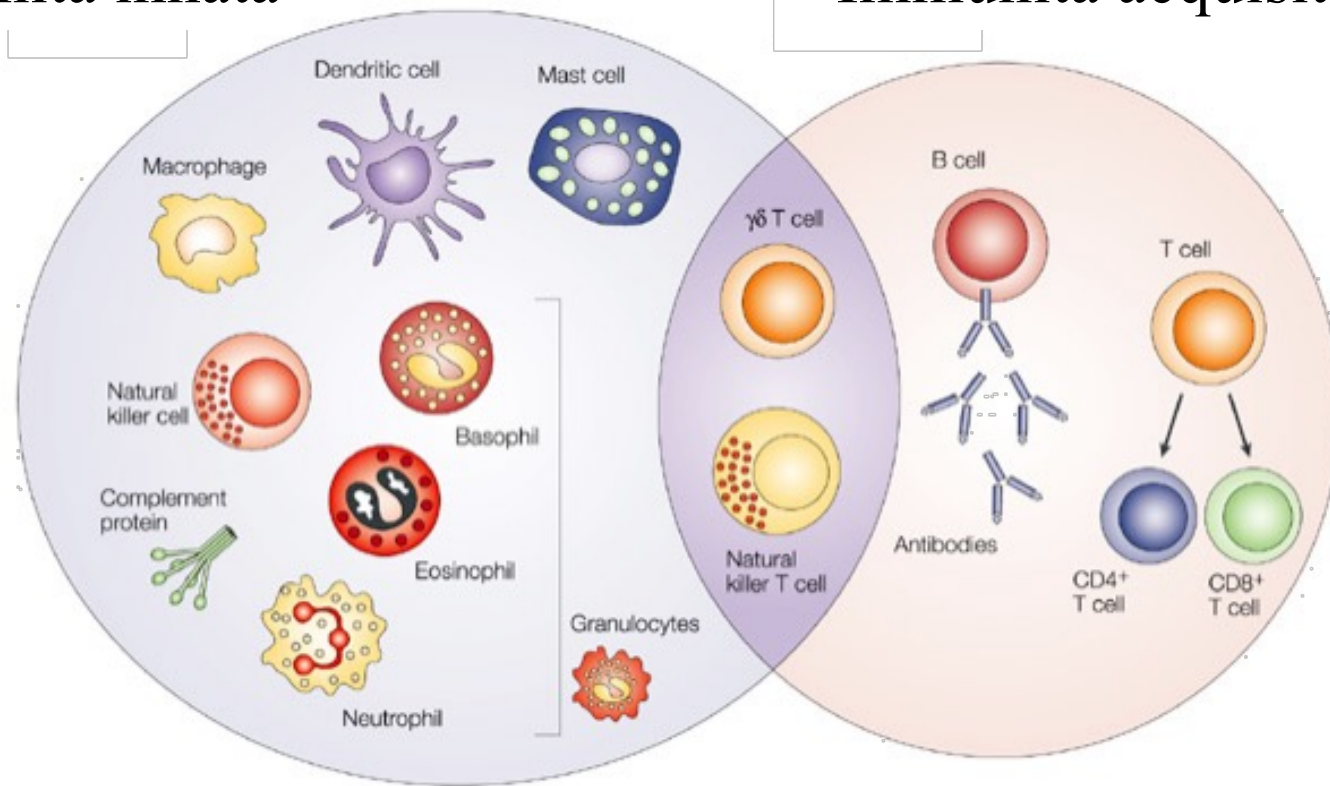
The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.

Immunity. 2004; 21:137-48.

Riconoscimento dei tumori: immunità innata e acquisita

Immunità innata

Immunità acquisita

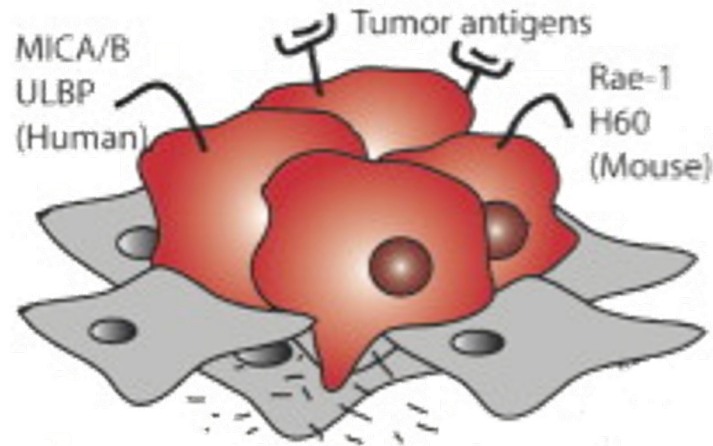


Modificata da Dranoff G.

Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy.

Nat Rev Cancer. 2004;4:11-22.

Riconoscimento dei tumori: immunità innata



Esempi di segnali di “danger” (pericolo) o di stress cellulare:

- HSP= Heat Shock Proteins
- MIC-A/B, ULBP (ligandi di NKG2D) = molecole di membrana simili a MHC-classe I indotte in cellule trasformate (“induced self”)

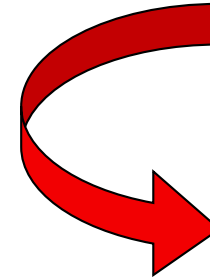
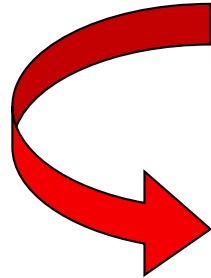
Modificata da Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD.
The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.
Immunity. 2004; 21:137-48.

Riconoscimento dei tumori: immunità innata

Attivazione delle cellule NK (Natural Killer)

Missing self
MHC classe I

Induced self
MIC-A/B, ULBPs (uomo)
Rae-1, H60 (topo)



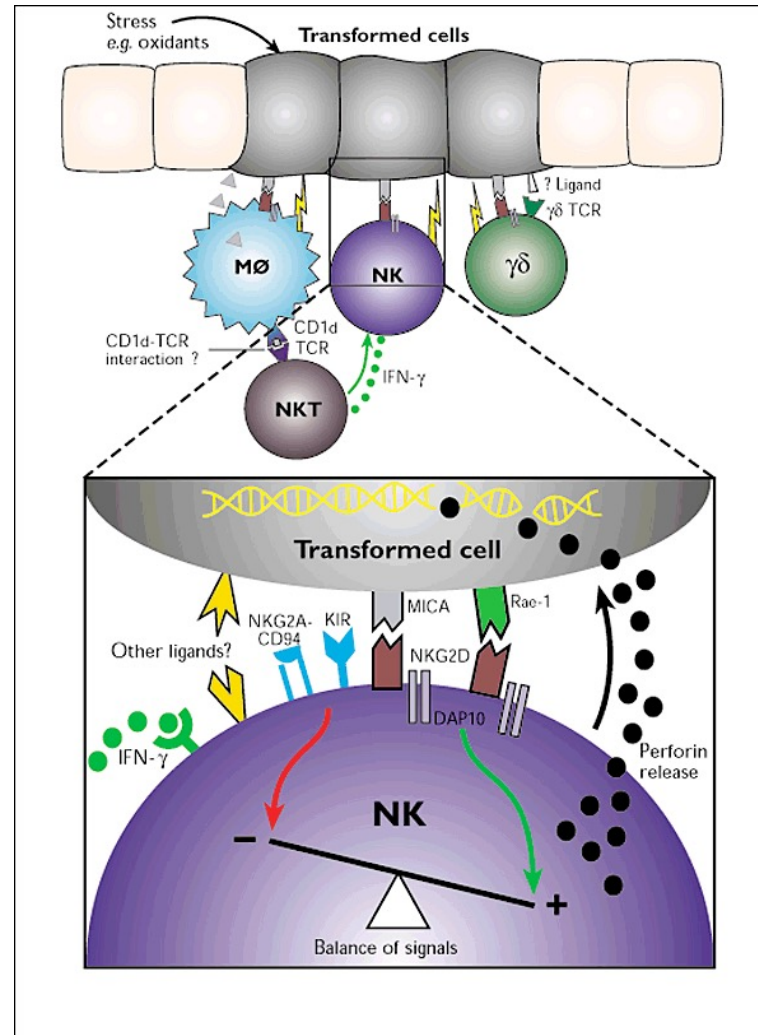
Recettori inibitori
KIR (uomo)
Ly49 (topo)
NKG2A-CD94 (uomo e topo)

Recettori attivatori
NKG2D

Perdita di segnale negativo

Segnale positivo

Riconoscimento dei tumori: immunità innata



Recettori inibitori
KIR, NKG2A-CD94

**Perdita di
segnale
negativo**

Recettori attivatori:
NKG2D

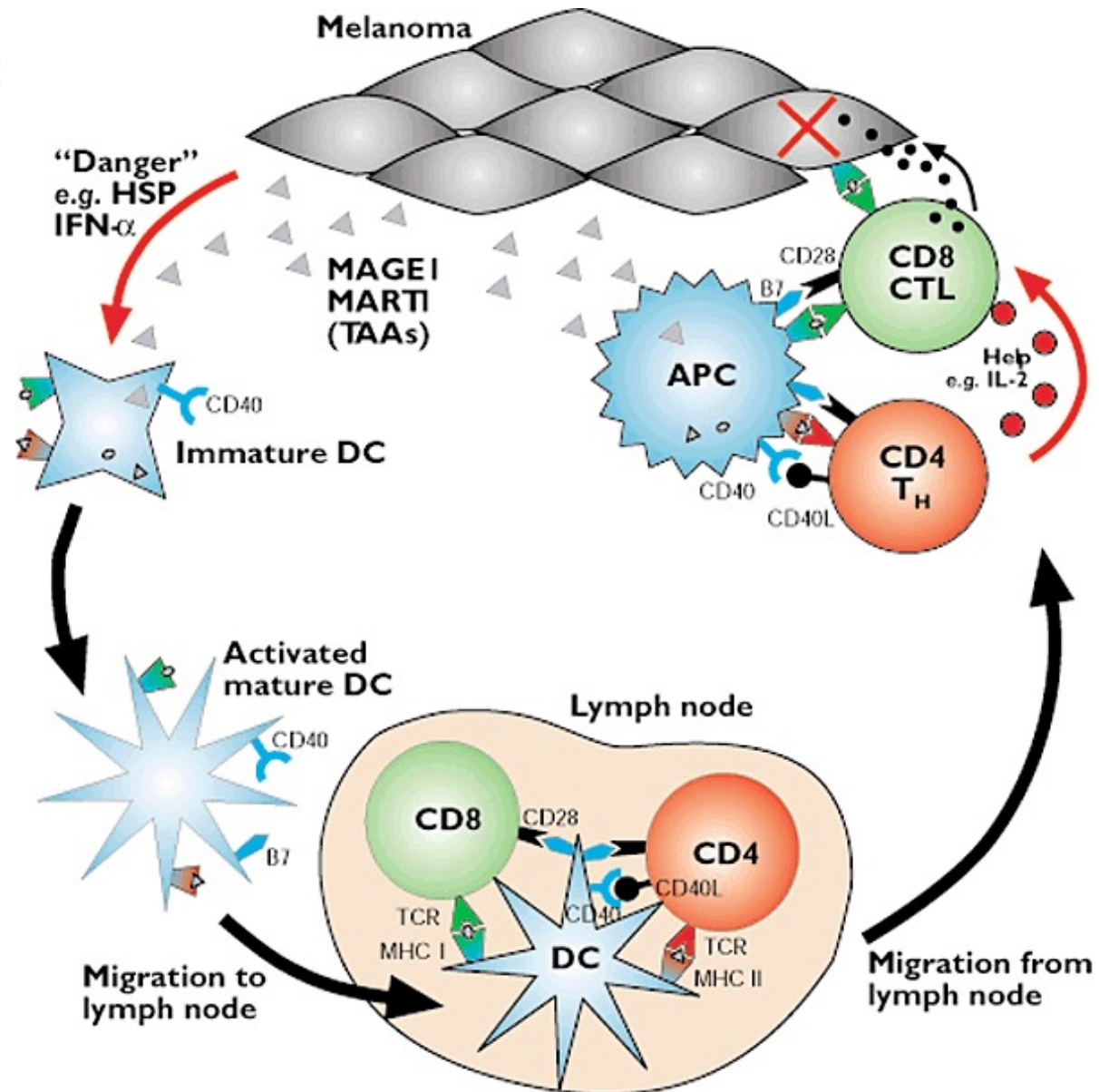
**Segnale
positivo**

Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA
A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy.
Nat Immunol. 2001;2:293-9.

Riconoscimento dei tumori: immunità acquisita

Segnali di “danger”:
HSP, Interferon- α

Segnale positivo per DC e induzione della risposta T (ad es. diretta verso gli antigeni tumorali del melanoma MAGEI e MARTI)

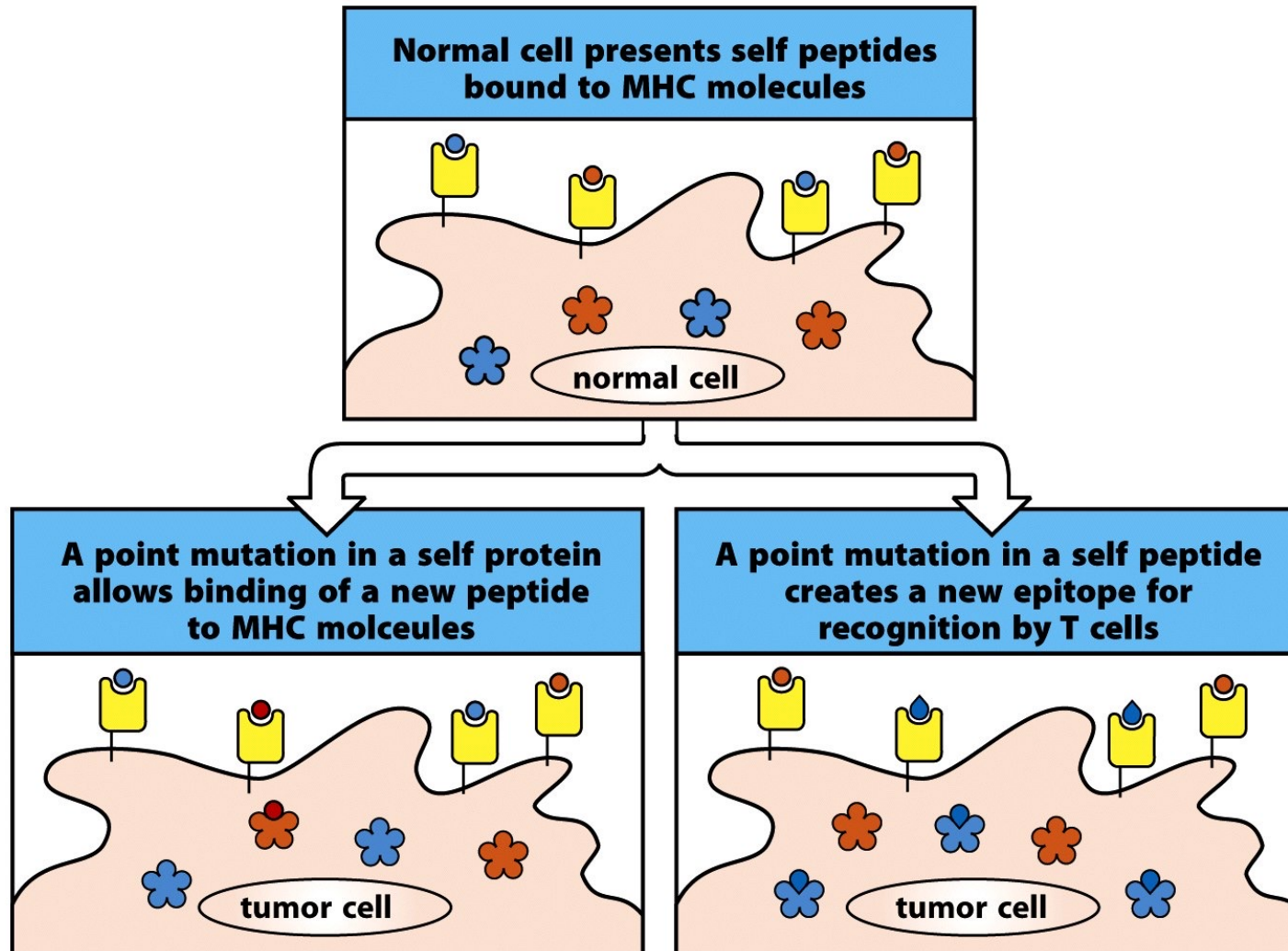


Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA

A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy.

Nat Immunol. 2001;2:293-9.

Riconoscimento dei tumori: antigeni tumorali (mutazioni)

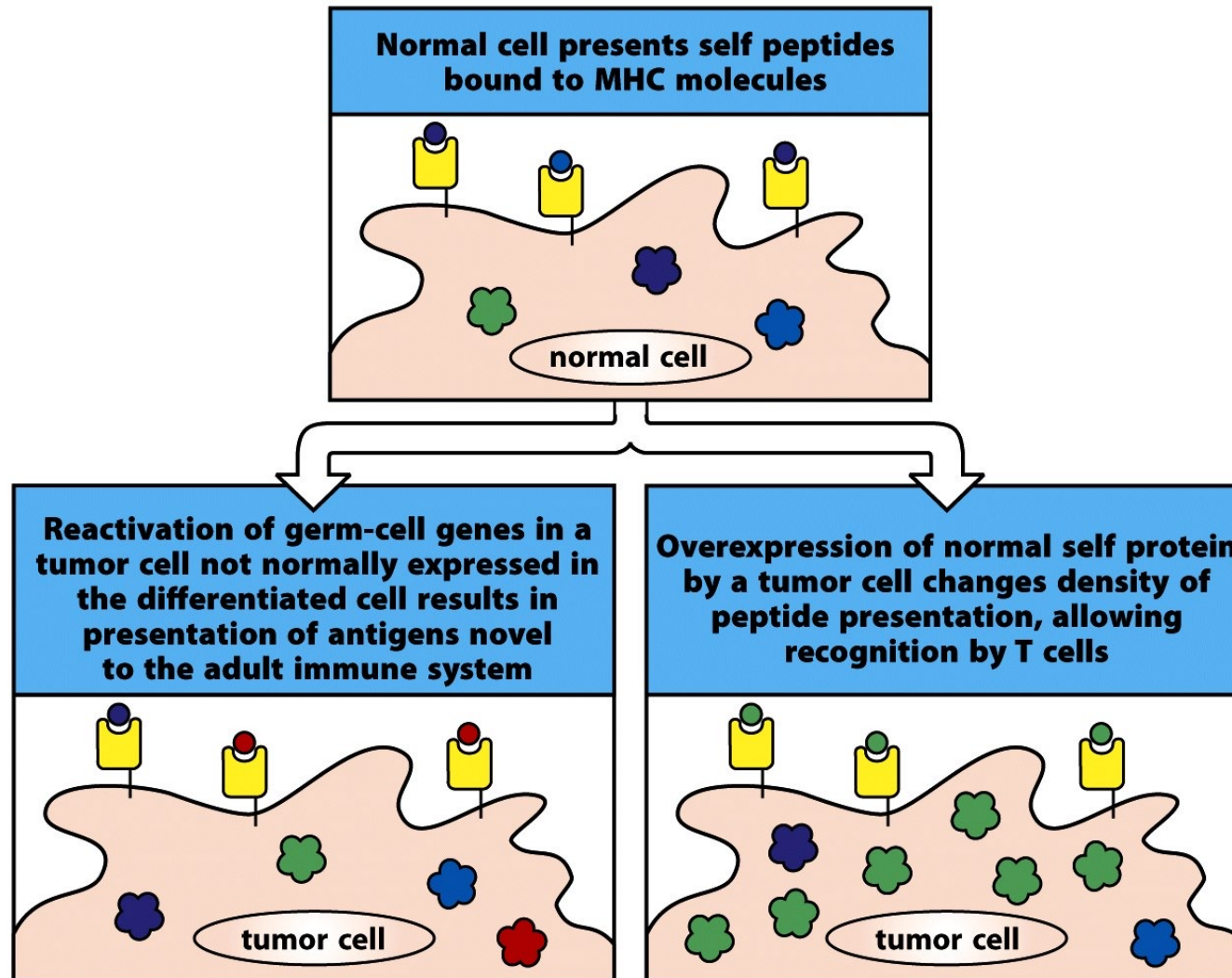


Presentazione nuovo epitopo

Presentazione epitopo mutato

Murphy K, Travers P, Walport M "Janeway's Immunobiology", Garland Science (7° edizione, 2008)

Riconoscimento dei tumori: antigeni tumorali (espressione abnorme)



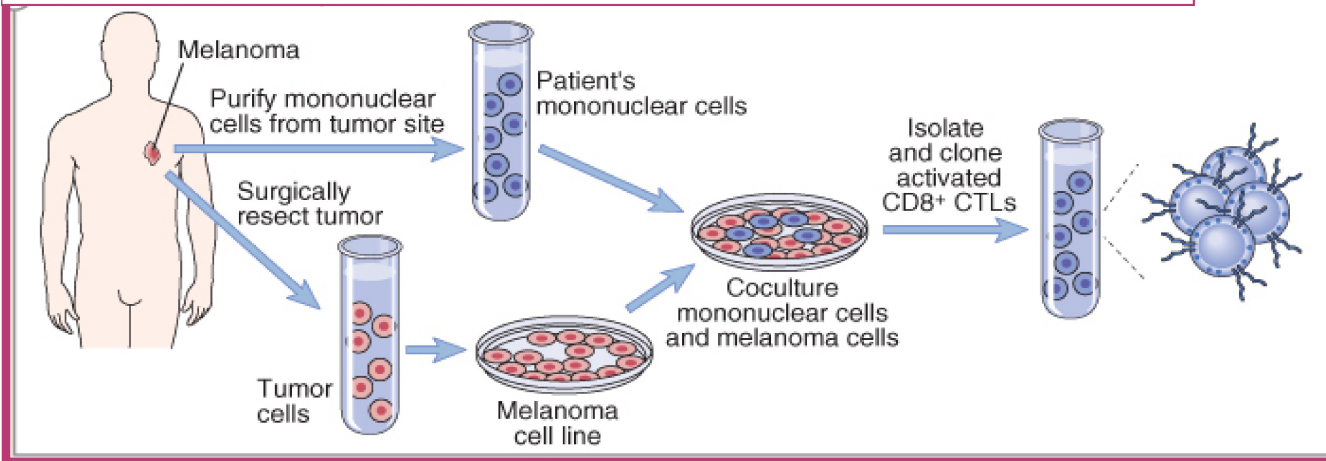
Riattivazione di geni silenti

Aumentata espressione genica

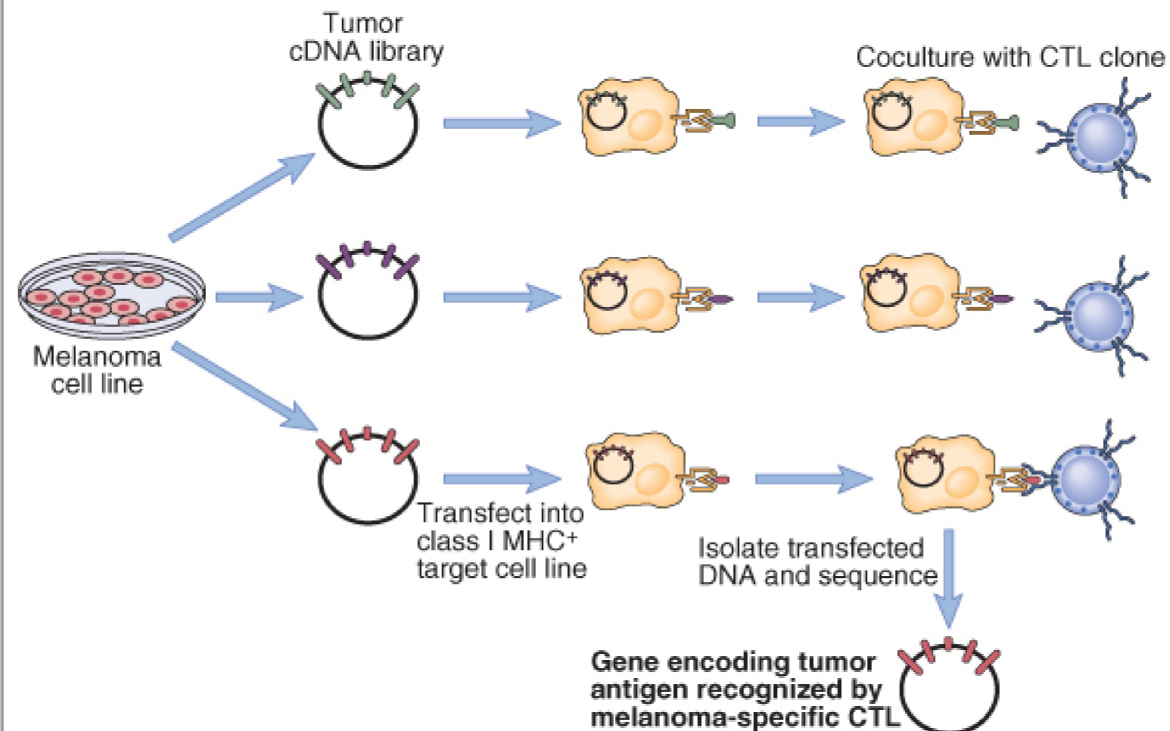
Murphy K, Travers P, Walport M "Janeway's Immunobiology", Garland Science (7° edizione, 2008)

Come sono stati identificati gli antigeni tumorali umani?

Generation of tumour-specific CTL from patient



Identification of tumour Ag recognized by tumour-specific CTL



Lysis of transfected cell line
-
-
+

Modificato da Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, "Cellular and Molecular Immunology", Elsevier (6° edizione, 2007)

Riconoscimento dei tumori: esempi di antigeni tumorali umani

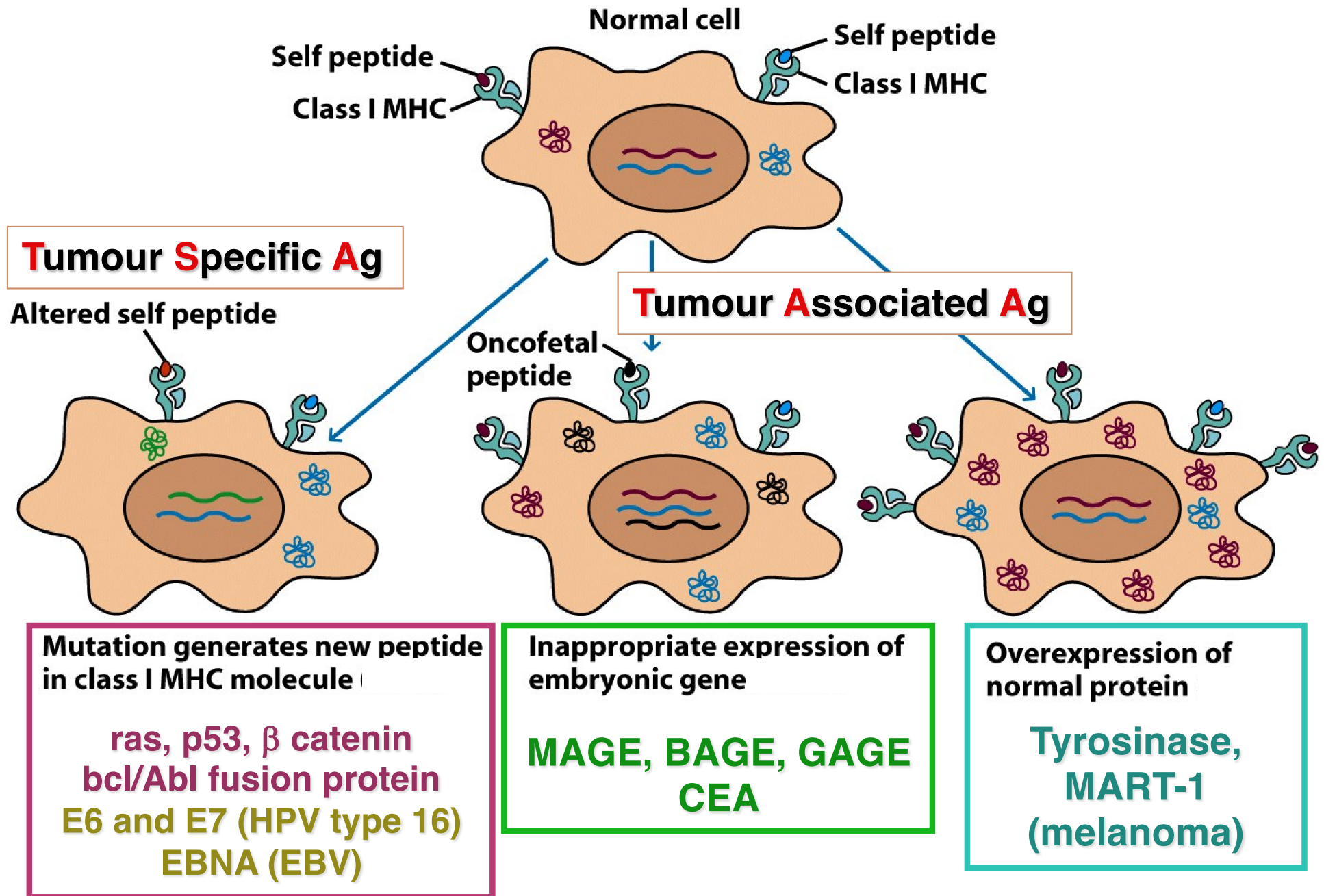
alcuni sono
onco-antigeni
(driver
mutations)

Tipo di antigene	Esempi di antigeni tumorali umani
Prodotti di oncogeni e di geni oncosoppressori	Oncogeni: mutazioni di Ras, Bcr/Abl, Her2/Neu Geni oncosoppressori: p53 mutata
Prodotti di virus oncogeni	Proteine E6 e E7 del papillomavirus; proteina EBNA-1 dell' EBV
Prodotti di geni che sono silenti nella maggior parte dei tessuti normali	Antigeni tumorali/testicolari: NY-ESO-1, MAGE (espressi normalmente nei soprattutto nella placenta e nel testicolo)
Prodotti di geni overespressi	Tirosinasi, gp100, MART nei melanomi (espressi normalmente nei melanociti)
Antigeni oncofetali	Antigene Carcinoembrionario (CEA), Alfa-fetoproteina (AFP)
Antigeni di differenziamento espressi normalmente nei tessuti di origine	Marker dei linfociti: Idiotipi delle Ig sulle cellule B

altri sono
antigeni di
differenziazione

Tabella modificata da Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S , “Cellular and Molecular Immunology”, Elsevier (6° edizione, 2007)

TSA and TAA!



Dosaggio dei marcatori tumorali circolanti

I marcatori tumorali circolanti si dosano nel siero con metodi immunometrici che utilizzano anticorpi che riconoscono in modo specifico un dato marcatore (**anticorpi monoclonali**).

Questi metodi hanno dimostrato di avere una sensibilità e una specificità analitica migliore di altri test.

Gli anticorpi monoclonali hanno la caratteristica di essere prodotti in quantità illimitate, di essere identici tra loro e quindi di garantire la ripetibilità dei risultati, per lo meno all'interno di ogni tipo di kit commerciale.

Il dosaggio prevede che gli anticorpi monoclonali riconoscano nel sangue il marcatore che di volta in volta si vuole misurare e che la quantità di marcatore riconosciuto sia rilevata attraverso un "tracciante" legato agli anticorpi monoclonali.

Questo tracciante può essere un radioisotopo (I^{125}) (**dosaggio IRMA o RIA**) o sostanze alternative, come enzimi, sostanze fluorescenti o chemiluminescenti (**dosaggi EIA, FIA, LIA**).

I metodi IRMA sono considerati i metodi di riferimento ma, per ragioni pratiche, nei laboratori vengono maggiormente usati i metodi alternativi.

• Antigene prostatico specifico (PSA)

E' un marcatore specifico della prostata ma non del tumore prostatico in quanto può elevarsi anche in caso di **ipertrofia prostatica benigna**.

Il dosaggio del PSA è utile per la diagnosi di tumore prostatico, in associazione con l'esplorazione rettale e l'ecografia.

Generalmente i soggetti normali hanno livelli di PSA inferiori a 4 ng/ml, ma questi valori possono alzarsi con l'età.

Valori compresi tra 4 e 10 ng/ml (detta zona grigia) sono generalmente dosati nei soggetti con patologia prostatica benigna, ma possono essere presenti anche in una elevata percentuale di tumori prostatici

In caso di dubbio diagnostico viene effettuata la biopsia prostatica.

Valori di PSA superiori a 10 ng/ml sono fortemente suggestivi di presenza di tumore prostatico, ma possono essere presenti anche nelle patologie prostatiche benigne. Con questi valori la biopsia prostatica viene sempre eseguita.

Il PSA nel siero può essere legato o in forma libera (PSA libero), e la somma delle due forme costituisce il PSA totale.

Il rapporto tra il PSA libero e il PSA totale (FPSA/TPSA) è stato introdotto nella routine clinica per migliorare la diagnosi differenziale tra patologia prostatica benigna e maligna nella zona grigia di PSA e ridurre le biopsie prostatiche.

Il dosaggio del PSA è molto utile per il rilievo di ripresa di malattia e per controllare l'andamento della terapia.

• Antigene carcinoembrionario (CEA)

E' considerato il marcatore clinicamente più utile nelle neoplasie maligne del colon-retto, anche se nel 50% di questi tumori il CEA ha valori normali (inferiori a 5 ng/ml).

Il CEA può innalzarsi anche in presenza di altre patologie neoplastiche, (come la mammella, il polmone, lo stomaco, il pancreas), di patologie infiammatorie a carico di diversi organi (colon-retto, fegato, polmone, rene), o in assenza di patologie specifiche, come nei fumatori.

E' utile soprattutto per la identificazione precoce di recidive o metastasi durante il controllo del tumore colon-rettale post-intervento chirurgico e per monitorare la risposta ai trattamenti. Il CEA test può anche essere usato nel controllo del tumore polmonare e della mammella.

• **Alfafetoproteina (AFP)**

E' presente nei tessuti fetali e dopo la nascita diminuisce fino a raggiungere nell'adulto valori molto bassi.

E' il marcatore del tumore al fegato (epatocarcinoma), ma può innalzarsi anche in presenza di rigenerazione epatica, come nella cirrosi e nella epatite virale. In questi casi, però, l'innalzamento è temporaneo.

Viene anche usata come marcatore di alcuni tumori del testicolo e dell'ovaio in fase diagnostica, durante monitoraggio della ripresa di malattia e durante il monitoraggio della terapia.

• **Antigene carboidrato 15-3 (CA 15-3)**

E' associato al tumore mammario, ma solo negli stadi avanzati

Dosaggi ripetuti nel tempo sono utili per il riconoscimento precoce di ripresa di malattia e di risposta al trattamento.

Valori falsamente positivi possono essere causati da patologie reumatiche.

• **Antigene carboidrato 19-9 (CA 19-9)**

Rappresenta il marcatore più utile per il tumore pancreatico, ma può essere usato anche per tumori del colon-retto in associazione con il CEA, delle vie biliari e dello stomaco.

Il dosaggio del CA 19-9 è raccomandato in fase di valutazione della estensione del tumore e di monitoraggio post-operatorio. Valori molto elevati si possono osservare in presenza di valori alti di bilirubina.

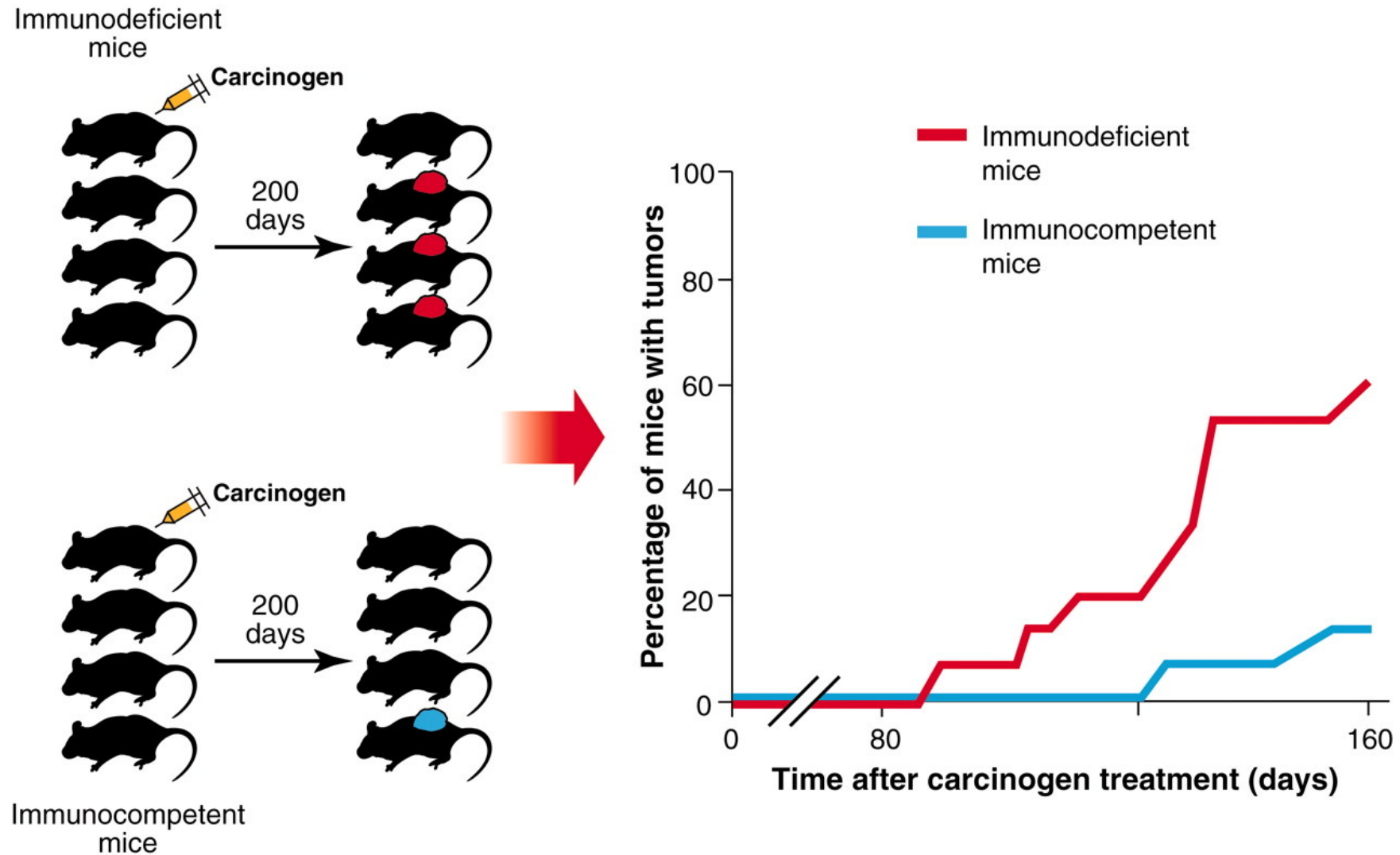
• **Antigene carboidrato 125 (CA 125)**

E' il marcatore del tumore ovarico.

Valori falsamente positivi si possono trovare in presenza di versamento pleurico o versamento ascitico di natura benigna e anche in caso di cisti ovarica. Il CA125 è utile nel monitoraggio delle pazienti con tumore ovarico operato: un incremento persistente di CA 125 è invariabilmente associato a una ripresa di malattia. Durante la chemioterapia, il dosaggio del CA 125 può fornire informazioni sulla risposta al trattamento: valori elevati sono generalmente associati a una non risposta al trattamento.

I topi immunodeficienti sono più suscettibili ai tumori (cancer elimination nei topi WT)

Fig. 1 The immune status of mice is a critical determinant of their susceptibility to tumors induced by chemical carcinogens.



Interazione dinamica tra sistema immunitario e tumore: *cancer selection nei topi WT!*

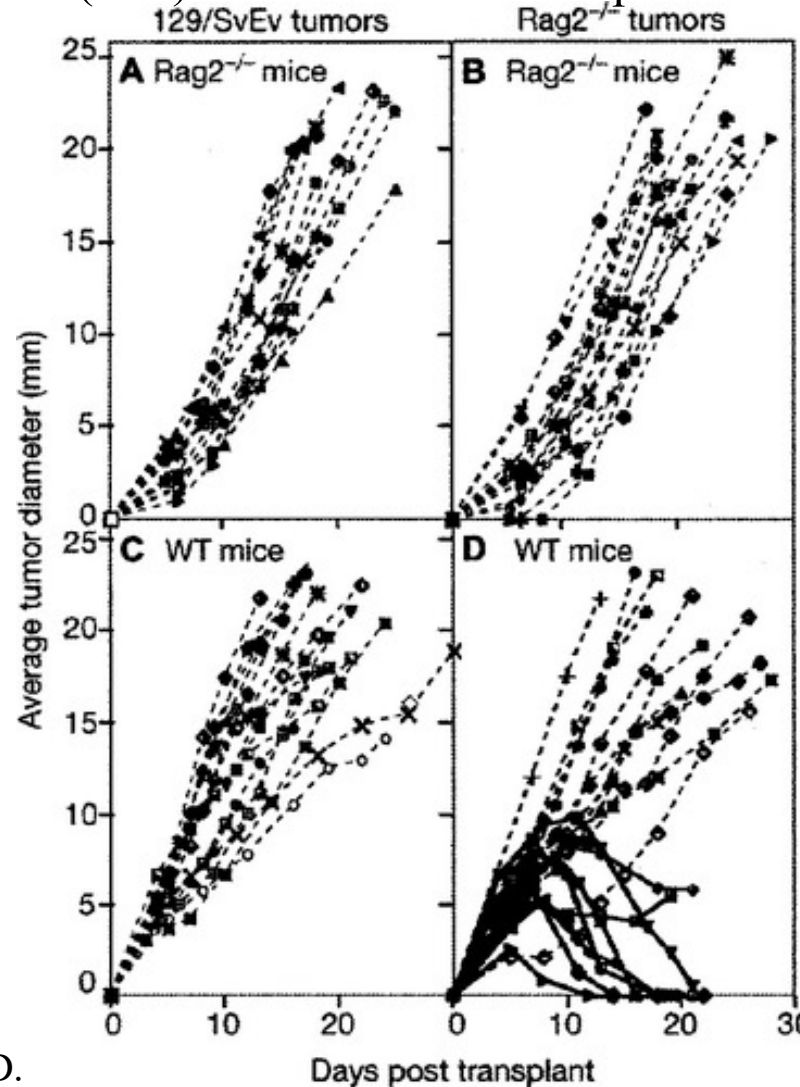
Esperimenti in topi normali (WT) e immunodeficienti privi di linfociti T e B ($RAG2^{-/-}$):

A. Tumori cresciuti in WT e poi trasferiti in $RAG2^{-/-}$:
CRESCONO

C. Tumori cresciuti in WT e poi trasferiti in WT:
CRESCONO

B. Tumori cresciuti in $RAG2^{-/-}$ e poi trasferiti in $RAG2^{-/-}$:
CRESCONO

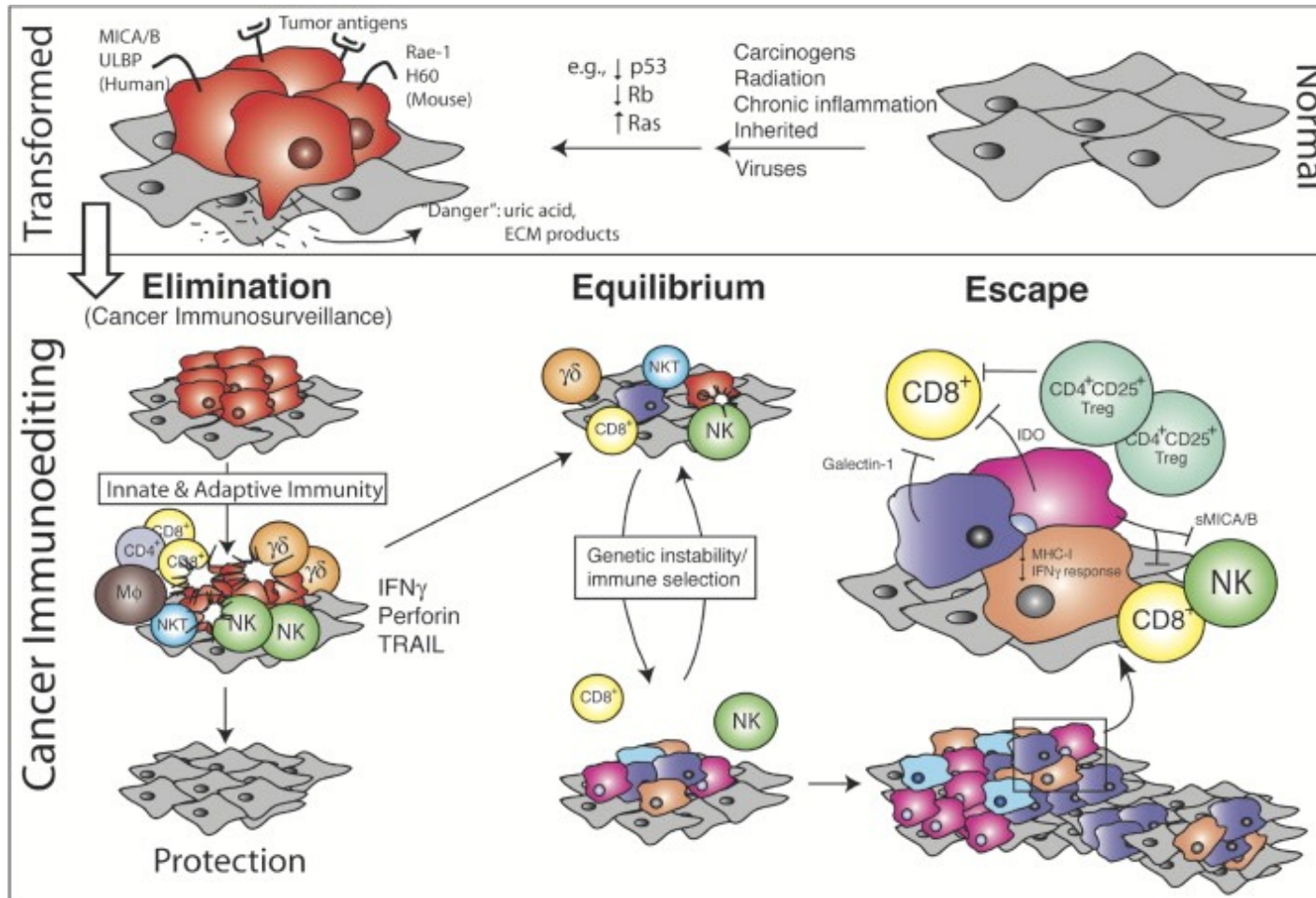
D. Tumori cresciuti in $RAG2^{-/-}$ e poi trasferiti in WT:
CRESCONO PIU' LENTAMENTE O NON CRESCONO



Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD.
The three Es of cancer immunoediting.
Annu Rev Immunol. 2004;22:329-60.

I tumori che crescono in topi immunodeficienti non sono sottoposti a pressione selettiva e risultano immunogenici se trasferiti in topi normali

Risposta spontanea ai tumori: le tre fasi del Cancer Immuno-Editing (Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD, 2002)



Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD.
 The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.
 Immunity. 2004; 21:137-48.

Chronic inflammation as a major contributor to cancer pathogenesis.

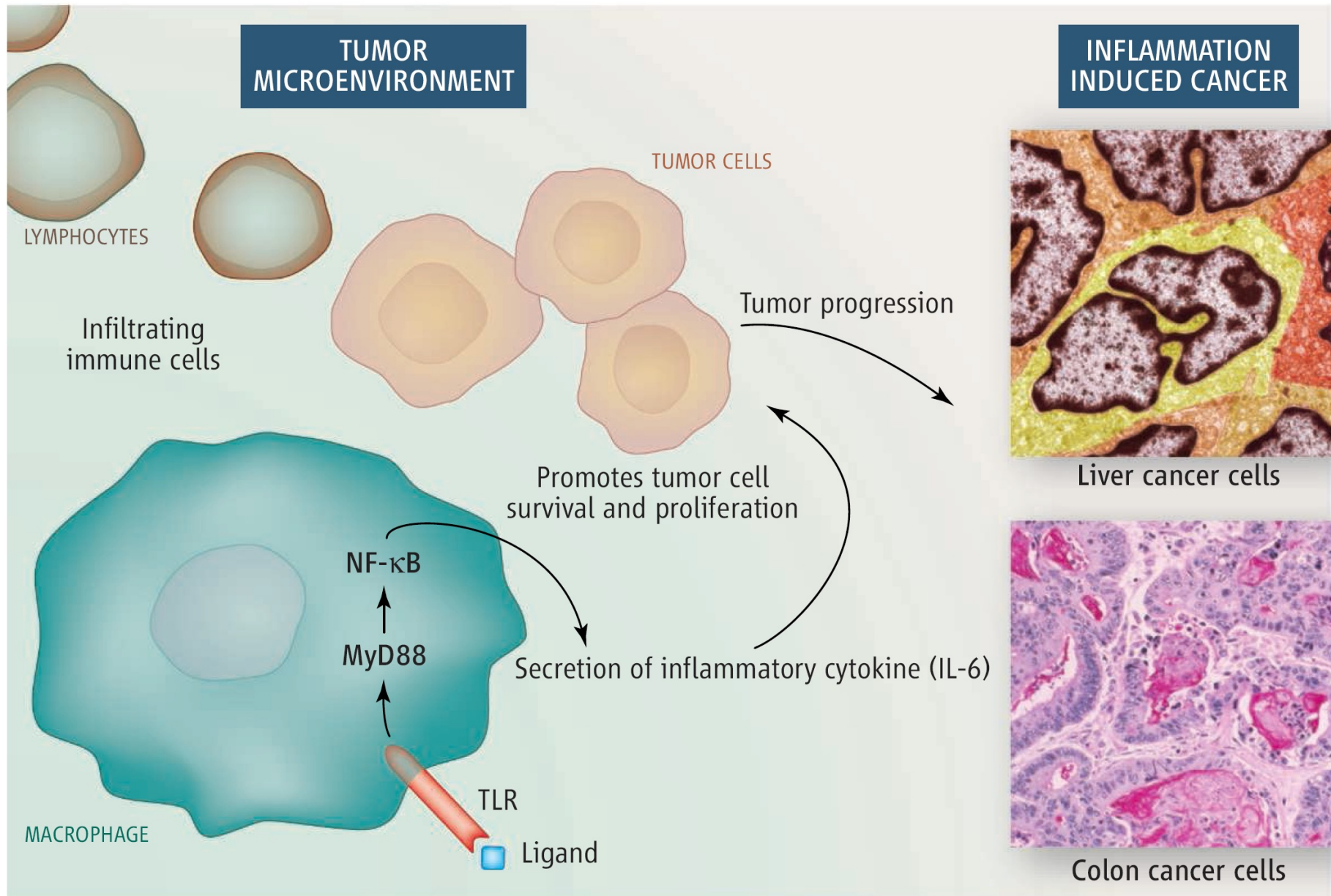
- **Inflammatory bowel diseases such as ulcerative colitis and Crohn's diseases are associated with an increased risk of colorectal cancer.**
- **Individuals with ulcerative colitis have a tenfold greater risk of developing colorectal cancer compared to the risk defined for the general population.**
- **Chronic exposure to irritants that cause inflammation in the bronchial track such as cigarette smoke, asbestos, and silica are associated with an elevated risk of lung cancer.**
- **Many cancers are linked with chronic pathogen exposure such as gastric cancers and *Helicobacter pylori*.**
- **Molecular, cellular, and organism studies in recent years emphasize a broad role of **NF-KB pathways** in mediating development and progression of cancer appears to be pathologic.**

A functional link between inflammation and cancer

- ✓1) Inflammatory cytokine are involved in tumor promotion.**
- ✓2) Reduced cancer incidence in patients treated with long term anti-inflammatory drugs.**
- ✓3) Infiltration of innate immune cells into malignant tissue correlates with poor clinical outcome.**

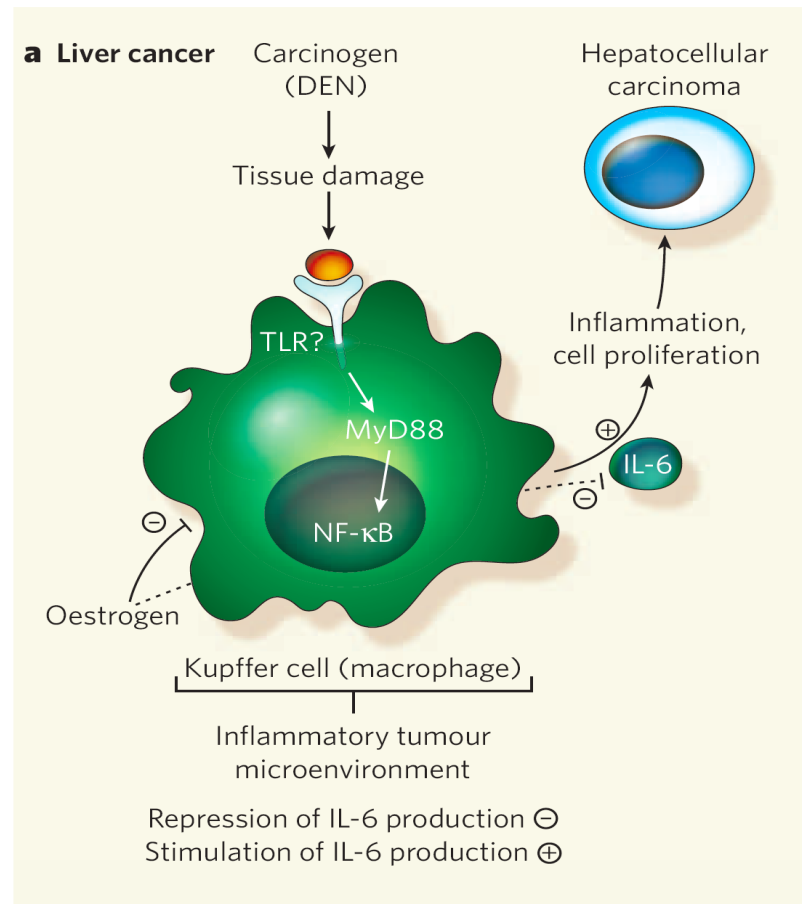
A functional link between inflammation and cancer

1a) Inflammatory cytokines are involved in tumor promotion



A functional link between inflammation and cancer

1b) Inflammatory cytokines are involved in tumor promotion



a Naugler et al. show that, in the liver, a carcinogen (diethylnitrosamine, DEN) causes tissue damage that (via Toll-like receptors, TLR) activates the MyD88–NF- κ B signalling pathway in Kupffer cells, which produce IL-6, which in turn promotes inflammation, cell proliferation and tumour formation. Oestrogens interfere with NF- κ B activity and IL-6 production, so females tend to be protected against liver cancer.

How tumor-infiltrating innate immune and inflammatory cells promote cancer development and progression?

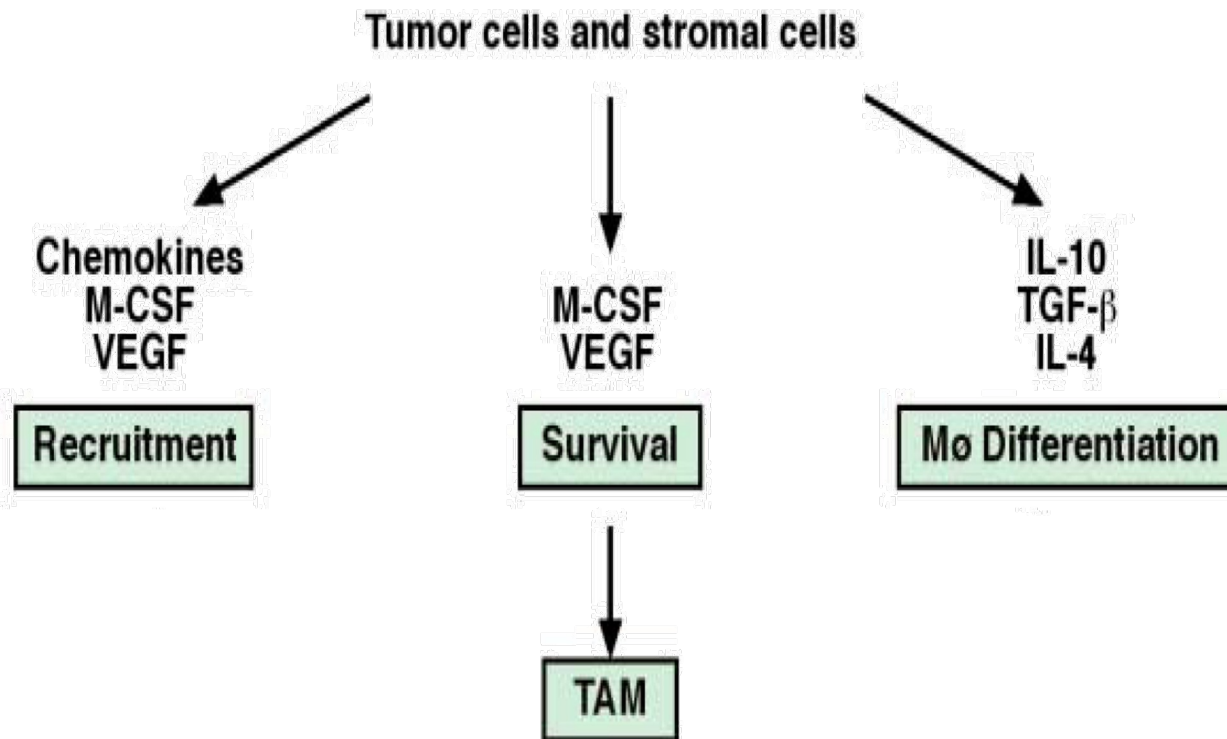
- **Inhibition of anti-tumor response**
- **Promotion of tumor proliferation, stroma deposition, angiogenesis**
- **Stimulation or exacerbation of DNA damage**

Which are the tumor-infiltrating innate immune and inflammatory cells that promote cancer development and progression?

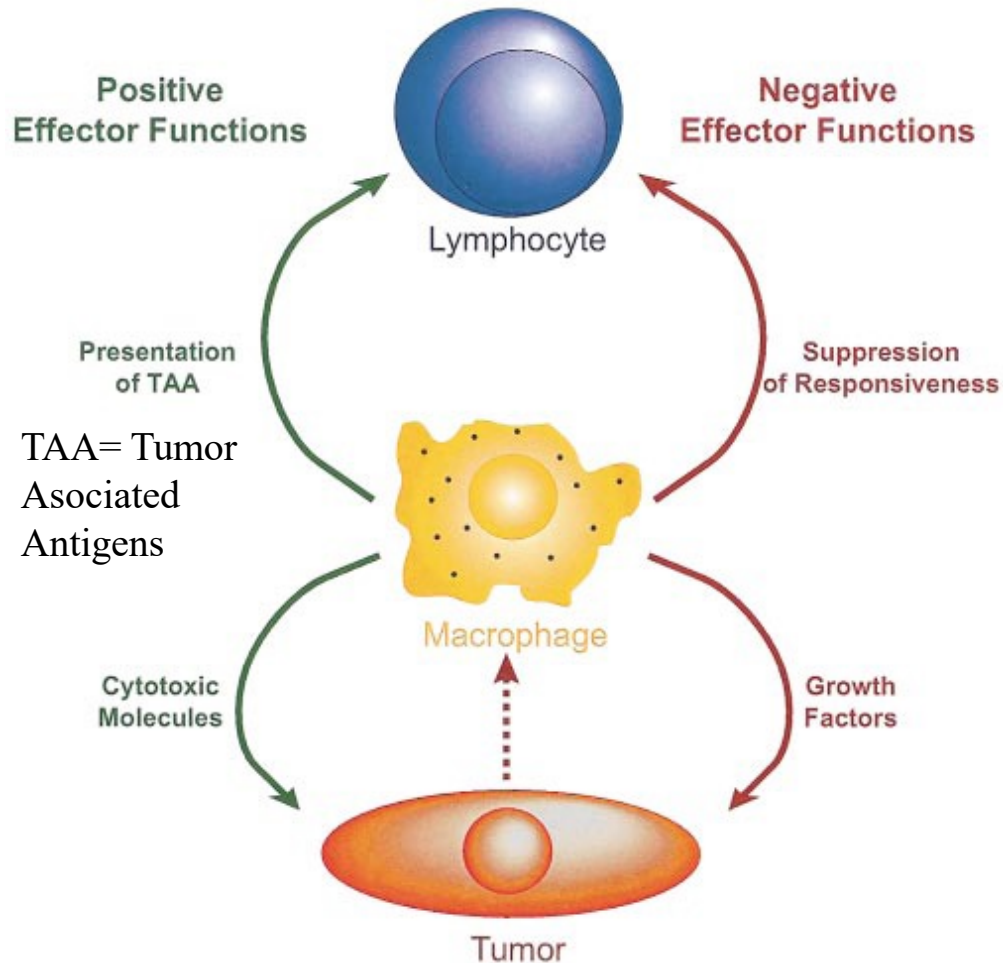
- 1. Tumor-associated macrophages (TAM)**
- 2. Neutrophils**
- 3. Dendritic cells (DC)**
- 4. Mast cells**
- 5. Eosinophils**

1) Tumor-associated macrophages (TAM)

Monocytes are attracted by cytokines and chemokines (CSF-1, GM-CSF, MCP-1), released by tumor cells or cells of the tumor microenvironment, and once within the tumor, became **TAM!!!**



Inflammation and cancer: role of macrophages



Macrofagi protettivi (M1)

- ✓ Risposte Th1
- ✓ Infiammazione di tipo I, reazione di ipersensibilità ritardata
- ✓ Uccisione dei parassiti intracellulari
- ✓ Resistenza ai tumori
- ✓ Produzione di IL-1, IL-12, IL-23

Macrofagi associati a tumori avanzati (macrofagi M2)

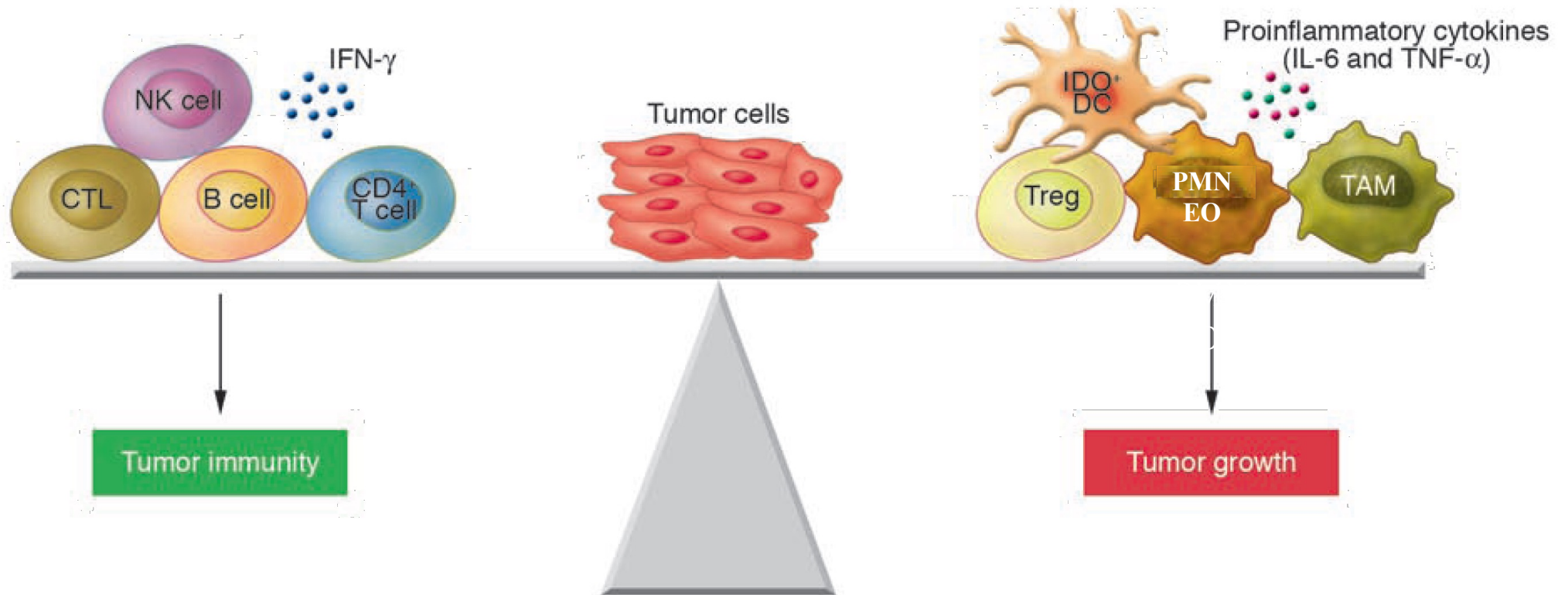
- ✓ Risposte Th2
- ✓ Infiammazione di tipo II, allergia
- ✓ Uccisione e incapsulamento dei parassiti
- ✓ Deposizione della matrice e rimodellamento
- ✓ Promozione tumorale
- ✓ Produzione di IL-10 e TGF- β

Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW.
Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection.
J Leukoc Biol. 1998;64:275-90.

Schema modificato da Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, Sica A.
Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer.

Immunobiology. 2009;214:761-77.

THE IMMUNE SYSTEM IS A “DOUBLE-EDGED SWORD”



Cells of both the innate and adaptive arms of the immune system can mediate antitumor immunity, including CTLs, CD4⁺ T cells, B cells, and NK cells. However, as tumors progress, they often develop ways in which to escape immune recognition. For example, they can induce the production of proinflammatory cytokines, the expression of IDO by APCs, and the differentiation of Tregs and various suppressor cells of myeloid origin. TAM, tumor-associated macrophage.

Immuno-terapia: strategie di trattamento nell'uomo con citochine

Cytokines as cancer therapy	
IFN-alpha	Enhances tumor antigen presentation and cytotoxicity (systemic)
IFN-gamma	Enhances tumor antigen presentation and cytotoxicity (systemic, local)
IL-2	Enhances NK cell and CD8 T cell function; increases vascular permeability (systemic, local)
GM-CSF	Enhances tumor antigen presentation (systemic, local)
TNF-alpha	Induces tumor cell apoptosis; activates endothelium and granulocytes (local)

Modificato da Dranoff G.

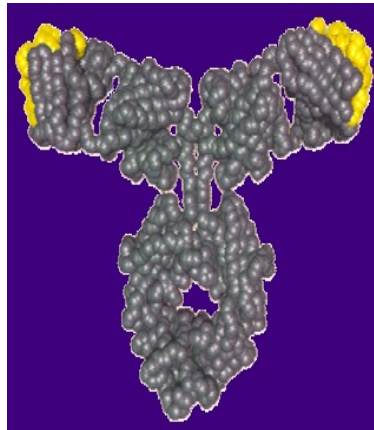
Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy.

Nat Rev Cancer. 2004;4:11-22.

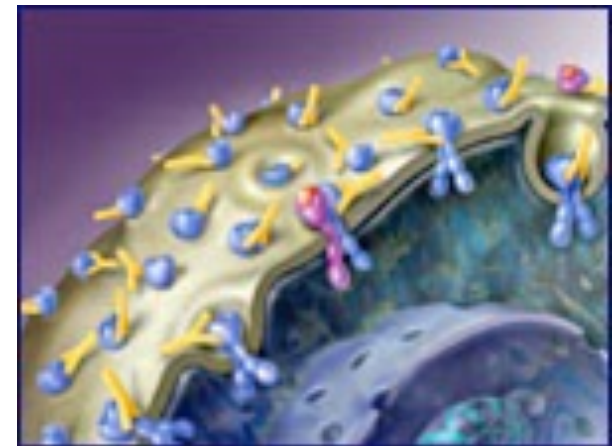
*Trastuzumab [un anticorpo diretto contro l'human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)]
[nome commerciale HERCEPTIN]:
Storia di un Successo...*



HER-2 iperespresso

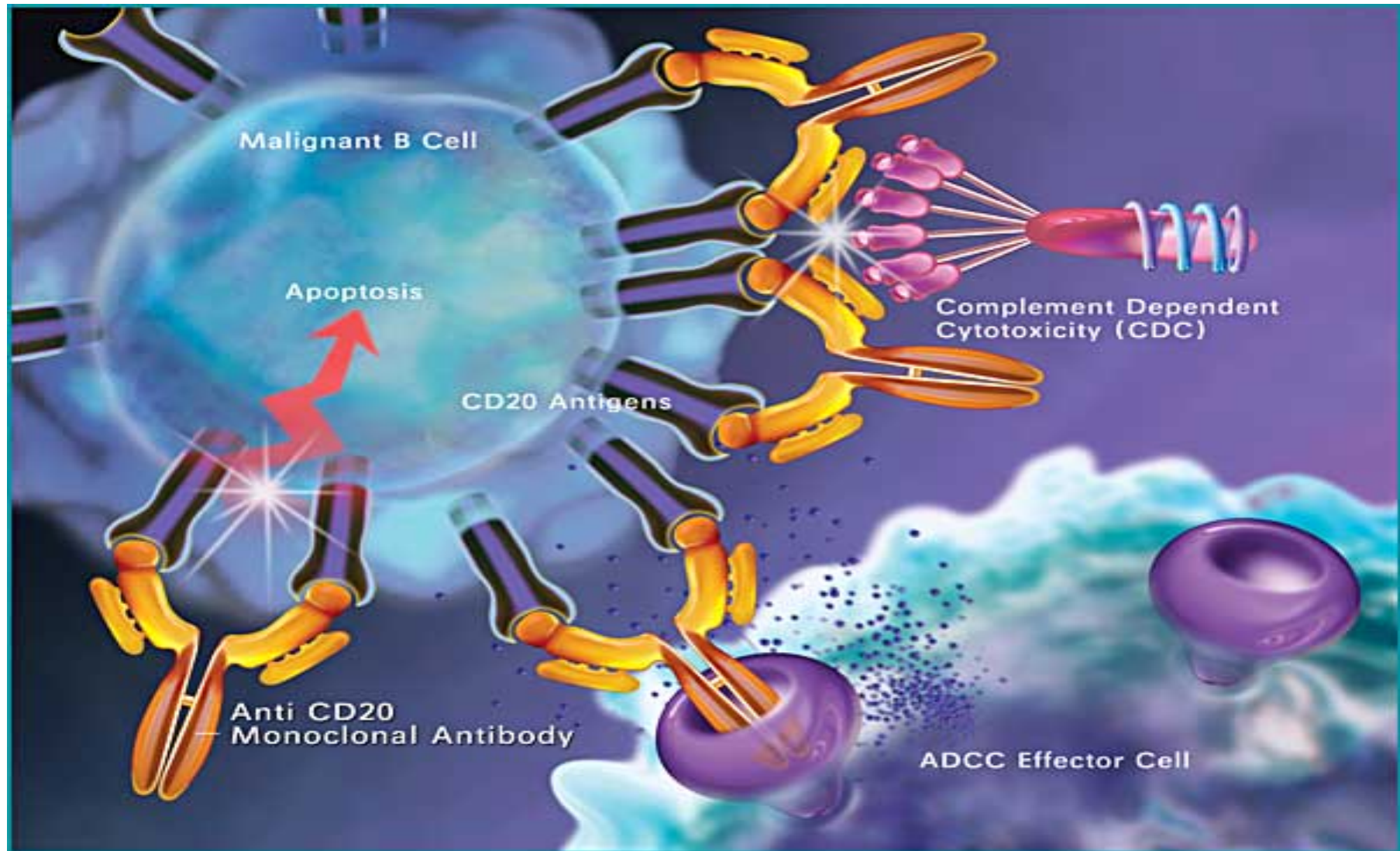


HERCEPTIN



HERCEPTIN blocca HER-2

*Rituximab [un anticorpo diretto contro l'antigene CD20 overespresso da linfociti B tumorali]:
Storia di un altro Successo...*

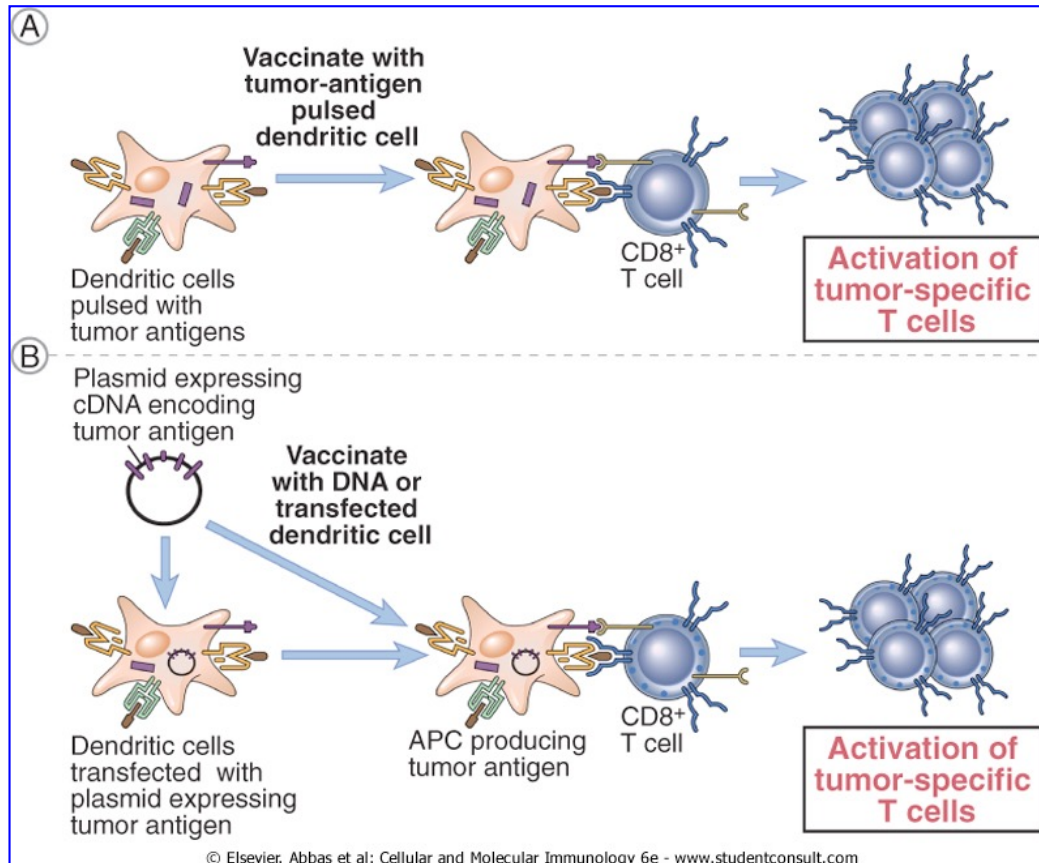


...e storia di un molti altri successi !!!

Table 1 Therapeutic mAbs approved for use in oncology

Generic name (trade name)	Origin	Isotype and format	Target	Indication	Year approved by FDA
Unconjugated mAbs					
Trastuzumab (Herceptin)	Humanized	Human IgG1	HER2/ <i>neu</i>	Breast cancer	1998
Rituximab (Rituxan)	Murine-human chimeric	Human IgG1	CD20	Lymphoma	1997
Cetuximab (Erbix)	Murine-human chimeric	Human IgG1	EGF receptor	Colorectal cancer	2004
Bevacizumab (Avastin)	Murine-human chimeric	Human IgG1	VEGF	Colorectal, lung cancers	2004
Alemtuzumab (Campath-1H)	Humanized	Human IgG1	CD52	Chronic lymphocytic leukemia	2001
Immunoconjugates					
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin) together with rituximab	Murine	⁹⁰ Y-radiolabeled murine IgG1	CD20	Lymphoma	2002
Tositumomab and ¹³¹ I tositumomab (Bexxar)	Murine	¹³¹ I-radioabeled murine IgG2a	CD20	Lymphoma	2003
Gemtuzumab (Myelotarg)	Human (drug derived from streptomycete)	Human IgG4 conjugated to calicheamicin	CD33	Acute myelogenous leukemia	2000

Immuno-terapia: strategie di trattamento nell'uomo con vaccini anti-tumoriali



✓ Peptidi antigenici

✓ Cellule dendritiche pulstate con peptidi antigenici

✓ Antigeni tumorali (proteine)

✓ Cellule tumorali irradiate

✓ Proteine da stress (Heat Shock Proteins) isolate dal tumore

✓ Cellule dendritiche trasfettate con DNA codificanti per antigeni tumorali

✓ DNA plasmidici e vettori microbici codificanti per antigeni tumorali

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, "Cellular and Molecular Immunology", Elsevier (6° edizione, 2007)

Prevenzione dei tumori: quali individui trattare?

- ✓ Individui con **malattia residua minima**, per prevenire le recidive del tumore e prolungare la sopravvivenza senza malattia
- ✓ Individui **sani con aumentato rischio di cancro** (ad es. individui geneticamente predisposti, persone esposte a carcinogeni esogeni oppure portatori di lesione pre-neoplastiche multifocali)

= > Attenzione alla lunga latenza dello sviluppo tumorale!

E' preferibile scegliere come antigeni bersaglio proteine essenziali alla trasformazione tumorale

Come indurre immunità di lunga durata?

Come misurare la risposta immunitaria protettiva?

Come evitare il rischio di reazioni auto-immunitarie?