

## CAPITOLO OTTAVO

# Il *genome editing* incontra l'immunoterapia

### *La cura del cancro dall'interno*

Nel 2017 possiamo affermare che ormai esistono diverse terapie per curare il cancro. Se da una parte le strategie di prevenzione permettono di intervenire nelle prime fasi, quando la massa tumorale non si è ancora diffusa, dall'altra abbiamo a disposizione numerosi approcci con cui è possibile eliminare le cellule del cancro mediante metodi «classici» come la chirurgia, la radioterapia, la chemioterapia o attraverso cure sempre più efficaci e selettive. La sfida più grande per la cura del cancro<sup>17</sup> è trovare un metodo che sia in grado di individuare nel *mare magnum* del nostro organismo – composto da miliardi e miliardi di cellule – solo quelle cancerose, eliminarle e lasciare svolgere a tutte le altre il loro

<sup>17</sup> O, più correttamente, dovremmo parlare di cura per le varie tipologie di cancro, visto che sono molte e diversissime le malattie che possiamo raggruppare sotto questo termine.

lavoro. Avere come obiettivo le cellule in rapida moltiplicazione, come fanno i chemioterapici classici, non è un approccio selettivo perché implica l'eliminazione anche di cellule sane come quelle della pelle, dei capelli e del sangue, scatenando pesanti effetti collaterali sia fisici sia psicologici (la perdita di capelli, per esempio, può essere traumatica) che portano a un generale indebolimento dell'organismo. Così le nuove terapie in studio da diversi anni cercano di mirare precisamente al bersaglio della cellula tumorale.

Un'analisi molto fine che discrimina tra cellule sane e cellule «difettose» (infettate, vecchie o geneticamente aberranti) è svolta di routine da molti meccanismi interni di controllo del nostro organismo. Una parte importante di queste azioni di vigilanza è compiuta dal sistema immunitario. Per questo da tempo si stanno studiando a fondo i meccanismi per cui le nostre «vedette» interne, naturalmente preposte a vigilare per scongiurare gli attacchi provenienti dall'esterno (virus, batteri, parassiti, sostanze tossiche), falliscono nell'individuare e combattere cellule interne ma mutate nel loro comportamento, quali sono appunto le cellule del cancro.

In breve, si è capito che le cellule tumorali adottano dei metodi molto efficaci per evadere i meccanismi di controllo del sistema immunitario, interagendo con esso. Ripristinare tali meccanismi significa quindi promuovere un'azione di cura del tumore dall'interno. L'immunoterapia contro il cancro si prefigge proprio questo obiettivo; in que-

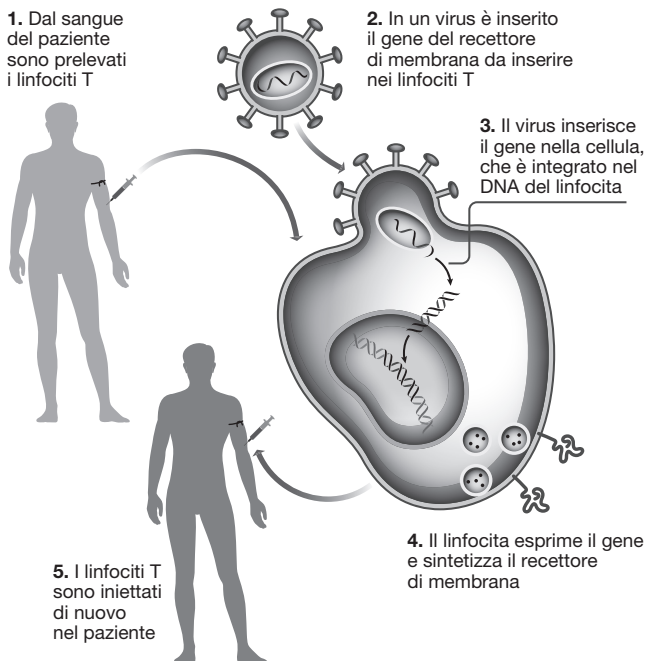
sto capitolo passeremo in rassegna come le terapie geniche ed editing del genoma stiano iniziando a essere utilizzati anche in questo settore.

### *Il genome editing applicato all'immunoterapia*

Le strategie per stimolare il sistema immunitario a riconoscere ed eliminare le cellule cancerose possono essere diverse, ma due sembrano essere molto promettenti, anche per via di un ulteriore raffinamento reso possibile dalle tecniche di *genome editing*.

Il primo sistema, sviluppato per la prima volta alla fine degli anni Ottanta dal chimico e immunologo Zelig Eshnar presso il Weizmann Institute of Science in Israele, utilizza le cosiddette *cellule CAR-T*, dove la T del nome indica i linfociti T. Questa classe di globuli bianchi viene ingegnerizzata così che i linfociti possano esprimere sulla loro superficie dei recettori capaci di riconoscere e legare antigeni presenti solo sulle cellule tumorali (da cui il nome CAR che è l'acronimo di *Chimeric Antigen Receptors*). Il classico approccio di ingegnerizzazione prevede l'inserzione del gene CAR nelle cellule T attraverso retrovirus o lentivirus (figura 23).

Una delle criticità di questa tecnica è che l'inserimento di nuovi geni mediante vettori virali, come ricorderete, può avvenire in punti casuali del genoma, portando a effetti indesiderati. Le cellule CAR-T possono essere derivate dal paziente (cioè autologhe) oppure universali, cioè prelevate da un donatore e modificate in modo da riconoscere se-



*Figura 23.* L'immunoterapia con cellule CAR-T. I linfociti non riconoscono le cellule tumorali perché sprovviste di recettori specifici per i loro antigeni. Vengono prelevati linfociti dal paziente (o da un donatore) e ingegnerizzati per esprimere i giusti recettori. I linfociti vengono reinfusi nel paziente e attaccano le cellule tumorali.

lettivamente la massa tumorale e non provocare fenomeni di rigetto. Per ora i primi casi di successo di terapie con CAR-T si sono visti solo su tumori del sangue, e in particolare sulle leucemie che colpiscono i linfociti B. Studi promettenti alle prime fasi in Cina e Stati Uniti stanno lavorando su un diverso obiettivo per la cura del *mieloma multiplo*, mentre si stanno già avanzando ipotesi per usare la tecnica anche sui tumori degli organi solidi.

Un secondo approccio di immunoterapia per il cancro punta a modificare, sempre nei linfociti T, i geni che codificano la proteina PD-1. PD-1 (*Programmed Cell Death 1*) è una proteina di superficie dei linfociti T, identificata e caratterizzata nel 1992 da Tasuku Honjo, immunologo dell'Università di Kyoto.

PD-1, che fa parte di un gruppo di proteine cosiddette *check-point*, agisce come una sorta di freno all'azione *killer* dei linfociti, evitando quindi che i linfociti siano iperattivi anche nei confronti di cellule *self*, come avviene nel caso delle malattie autoimmuni. PD-1 può essere attivata e inattivata a sua volta da altre proteine, dette *ligandi*. Le cellule cancerose evitano la risposta immunitaria nel microambiente tumorale proprio esprimendo dei ligandi, chiamati PD-L1, che «abbracciano» PD-1 e la disattivano. I primi tentativi di immunoterapia che agiscono su questo meccanismo hanno quindi lavorato su farmaci che impediscono «l'abbraccio» tra ligando e proteina PD-1.

La strategia tramite *genome editing* prevede invece la disattivazione o il taglio del gene PD-1. In entrambi i casi è come se togliessimo il freno all'azione *killer* dei linfociti nei confronti del tumore.

I farmaci che intervengono sul sistema PD-1 e ligandi si sono rilevati molto efficaci. Da pochissimo il *pembrolizumab*, una molecola di questa classe di farmaci commercialmente chiamato *Keytruda* e prodotto dall'azienda farmaceutica MS, ha ottenuto l'approvazione da parte dell'agenzia regolatoria americana Food and Drug Administration per es-

sere usato non in base al tipo di tumore (tumore della pelle, tumore al polmone ecc.) ma in base al profilo genetico del paziente che dovrà mostrare un *biomarker* specifico, cioè una mutazione all'interno del suo genoma. Questo risultato ha segnato un cambio di passo epocale nella strategia per combattere i tumori.

Ora vediamo un esempio di applicazione concreta di tecniche di *genome editing* all'immunoterapia. Nel giugno 2015 una bambina di nemmeno un anno di nome Layla Richard era stata colpita da una forma molto aggressiva di leucemia (chiamata ALL, da *Acute Lymphoblastic Leukaemia*, leucemia acuta linfoblastica): sia la chemioterapia sia il trapianto di midollo non avevano avuto nessun effetto. Layla è stata così la prima paziente al mondo trattata con una cura sperimentale all'incrocio tra l'immunoterapia e il *genome editing* presso il Great Ormond Street Hospital di Londra, sotto la guida di Waseem Qasim, professore di Terapia cellulare e genica dell'University College of London.

Dopo aver ottenuto in via eccezionale<sup>18</sup> il parere positivo a procedere del comitato etico della clinica, i ricercatori hanno prelevato i linfociti T di un donatore per modificarli tramite la tecnologia TALEN. Lo scopo era fare in modo che una volta infusi nell'organismo della bambina i linfociti potessero contrastare le cellule del sangue tumorali.

<sup>18</sup> Questo tipo di strategia veniva usato per la prima volta sull'uomo dopo alcuni test, se pur promettenti, effettuati solo su animali.

Dopo neanche un mese, la leucemia fu considerata già in remissione e Layla andò incontro a un secondo trapianto di midollo per ripristinare il set di cellule del sangue che erano state debellate dal trattamento. Una seconda piccola paziente è stata poi trattata con successo con un procedimento simile. A distanza di un anno e mezzo sia in Layla sia nella seconda bambina non erano comparsi effetti collaterali importanti né la leucemia era riapparsa, come indicano i dati sui due casi pubblicati sulla rivista *Science Translational Medicine*. Ovviamente è ancora troppo presto per dire se la terapia è così efficace da poter pensare che, un giorno, possa essere utilizzata abitualmente. Per ora, sulla base di questi primi risultati decisamente incoraggianti per il settore, si sta procedendo con una sperimentazione rigorosamente controllata sugli adulti.

### *La nuova scommessa: CRISPR + immunoterapia*

Come vi abbiamo raccontato nello scorso capitolo, CRISPR sta rivoluzionando rapidamente molti settori della ricerca medica. Quindi anche nel campo dell'immunoterapia diversi ricercatori stanno esplorando il suo utilizzo. Lo stesso gruppo di Waseem Qasim, di cui vi abbiamo appena descritto gli ottimi risultati contro ALL, sta ora lavorando con CRISPR.

È una tecnologia nuova: come ricorderete con una serie di dilemmi scientifici ed etici ancora aperti, stanno cominciando ora le prime sperimen-

tazioni. Il 28 ottobre 2016 la rivista *Nature* ha annunciato il primo test nell'uomo di immunoterapia e CRISPR. Questa sperimentazione è anche la prima in assoluto in cui si prova a capire l'affidabilità della tecnologia CRISPR. L'oncologo Lu You, della Sichuan University a Chengdu in Cina, a fine ottobre è partito con il primo test su un paziente colpito da tumore metastatico al polmone per valutare la non tossicità del trattamento. I ricercatori hanno prelevato dal paziente i linfociti T e li hanno modificati tramite CRISPR tagliando via il gene che codifica PD-1. I linfociti modificati, riattivati nella loro azione *killer* contro il tumore, sono stati poi reiniettati nel malato. A quel primo paziente, in cui non si sono riscontrati effetti collaterali, se ne aggiungeranno altri nove nel corso della sperimentazione (fino al 2018); tutti riceveranno quattro inoculi di linfociti editati nel genoma.

Il passaggio all'uomo di CRISPR per alcuni è avvenuto un po' troppo rapidamente visto che sono passati solo pochi anni dalla sua scoperta, anche se il razionale scientifico dietro alla sperimentazione è solido, perché deriva dalla recente comprensione di alcuni meccanismi regolatori della risposta immune contro il cancro, come ha spiegato in un'intervista Antonio Russo, professore di Oncologia Medica presso l'Università di Palermo<sup>19</sup>. In ogni caso, altri gruppi si stanno preparando a lavorare con CRISPR

<sup>19</sup> L'intervista ad Antonio Russo è parte dell'articolo "Pechino vuole creare il Google dell'editing genetico", apparso il 3 dicembre 2016 sul settimanale *Pagina99*.



su promettenti immunoterapie contro il cancro.

Negli Stati Uniti il gruppo guidato da uno dei pionieri di queste tecniche, Carl June, ricercatore della Pennsylvania University, da più di un anno è pronto a partire con le sue sperimentazioni, dopo aver superato gli scogli della valutazione sulla bioetica e sulla biosicurezza dei National Institutes of Health, sotto il cui vaglio devono passare tutte le nuove terapie biotech prima di essere applicate all'uomo. Intanto a pochi giorni dalla chiusura di questo libro, una terapia basata su CAR-T *cells* (ma senza l'utilizzo di tecniche di *genome editing*) sviluppata dal team di Carl June (e che verrà commercializzata dall'azienda Novartis) ha avuto parere unanime e positivo della Oncologic Drugs Advisory Committee dell'FDA, passaggio necessario e precedente all'immissione in commercio.

Allo stesso tempo al Memorial Sloan Kettering Cancer Centre di New York, anche il gruppo dell'immunologo Michel Sadelain, pioniere nel campo dell'immunoterapia basata su cellule autologhe CAR-T per la cura di tumori del sangue, ha già compiuto degli studi su topo che sono stati pubblicati a inizio 2017 su *Nature*, in cui si evidenzia che l'uso di CRISPR migliora la precisione di inserzione del gene CAR, rendendo il sistema più potente e attivo più a lungo. Ora il prossimo passo sarà comparare l'approccio classico di CAR-T ingegnerizzate tramite vettori virali con il metodo che utilizza CRISPR. E al centro di New York sono previste due sperimentazioni imminenti di questo tipo per la cura di leucemie.

*Grandi benefici e per ora molte incognite*

Il *genome editing* abbinato all'immunoterapia in questo momento è uno dei settori di ricerca biofarmaceutica che sta attirando più attenzioni (e fondi): la convergenza di queste due potenti e specifiche tecnologie potrebbe infatti dare vita a terapie che, per ora su piccoli numeri, hanno fatto davvero la differenza nella vita dei pazienti. Come abbiamo cercato di raccontarvi in questo libro, però, tutto ciò che sembra promettente ha comunque davanti a sé un lungo percorso di verifica su un numero sempre più ampio di pazienti e una quantità di regole da seguire che servono a garantire che la terapia funzioni davvero e non provochi danni maggiori dei benefici apportati.

Per ora questo nuovo campo dell'immunoterapia per la cura del cancro è ancora giovane per essere valutato nella sua interezza e anche quelli che sembrano casi quasi «miracolosi» sono evidenze su piccolissimi gruppi di pazienti che hanno bisogno di conferme nel tempo. Il sistema immunitario ha un funzionamento complesso e fine che si basa su un delicato bilanciamento di interazione tra vari sistemi dell'organismo. Per quanto ci siano già diverse informazioni sulle interazioni tra cellule tumorali e sistema immunitario, c'è ancora molto da capire e approfondire.

I primi test di sperimentazione clinica degli approcci di immunoterapia che vi abbiamo descritto hanno portato in alcuni casi a risultati eclatanti di remissione in pochissimo tempo, ma hanno anche