

Prof.ssa Adriana Albini

Angiogenesi come target di terapia

LA TERAPIA BIOLOGICA MIRATA: LE PREMESSE

Anche se la base comune delle neoplasie è rappresentata dalla crescita incontrollata di cellule trasformate, i tumori insorgono in diversi tessuti del corpo, ognuno dei quali ha le proprie caratteristiche specifiche. Per questo motivo da molti anni il cancro viene trattato anche come una patologia d'organo e la sua cura è spesso frutto di una collaborazione tra oncologi e specialisti (urologi, ginecologi, pneumologi, ematologi, gastroenterologi...).

È noto che il cancro deriva da fattori esterni (fumo di tabacco, sostanze cancerogene, radiazioni e organismi infettivi) e fattori intrinseci (mutazioni ereditate, ormoni, alterazioni del sistema immunitario). Questi due tipi di evento possono verificarsi insieme, o in sequenza, per iniziare o promuovere il processo che si definisce di trasformazione. Possono passare anni o decenni prima che l'esposizione a fattori esterni si tramuti in cancro. È quindi una funzione dell'età: più si allunga la vita e più siamo esposti al rischio di tumori, in quanto aumentano le probabilità di danno genetico e il tempo per espandere questo danno.

Come si interviene sui tumori? Le vie tradizionali sono chirurgia, radioterapia, chemioterapia, affiancate da ormonoterapia e immunoterapia. In ognuno di questi approcci si sono compiuti grandi progressi nel corso degli ultimi anni. Inoltre si sono aggiunti recentemente la terapia "biologica" mirata, detta *a bersaglio*, la terapia cellulare e la terapia genica. È raro ormai utilizzare un unico tipo di intervento, piuttosto le varie terapie si combinano per ottenere i risultati migliori.

Dei circa trentamila geni e le ancor più numerose proteine da loro codificate, sono solo una decina i bersagli verso i quali si sono orientate le strategie più recenti, la "terapia mirata", ma se ne stanno alacremente analizzando molti altri.

Il bersaglio biologico più tradizionale e affermato sono i recettori ormonali. Riguardano principalmente due tipi di neoplasie molto diffuse: il carcinoma della mammella principalmente e il tumore della prostata. La cellula epiteliale mammaria è regolata nella sua crescita dall'ormone estrogeno. Questo si lega, per funzionare, a molecole recettoriali che sono coinvolte nella trascrizione di geni e nella replicazione cellulare. Il primo passo è stato quello di utilizzare molecole antagoniste dell'estrogeno, che occupano i suoi recettori impedendo all'ormone di funzionare. Di queste la più nota è il tamoxifene. Poi si è pensato ad una via alternativa di antagonizzare il fenomeno, ovvero bloccare la produzione di estrogeni a monte. Da qualche anno la chimica ha messo a punto farmaci, gli inibitori della aromatasi, che bloccano la sintesi di estrogeno, e hanno dato risultati promettenti. Tra questi l'anastrozolo e il letrozolo. Questi farmaci vengono utilizzati nella terapia post-operatoria, definita "adiuvante".

In Italia si registrano circa 11.000 casi nuovi all'anno di tumore della prostata. Il tumore è raro in età giovanile, mentre aumenta il rischio in uomini che hanno superato i 60 anni di età (1 caso su 8 persone di sesso maschile fra i 60 e gli 80 anni).

Il 99% dei tumori della prostata sono adenocarcinomi e originano dalle cellule ghiandolari. Spesso si utilizzano in individui a rischio sostanze che combattono i fattori di crescita di queste cellule, i derivati degli androgeni. Il testosterone, per essere attivo sulla prostata, deve essere trasformato in diidro testosterone DHT; questo avviene attraverso l'enzima chiamato 5-alfa reduttasi. La letteratura scientifica ha prodotto dati incoraggianti sugli inibitori dell'enzima, quali la finasteride e, ancora in corso di studio, il suo omologo Dutasteride.

Nell'iperplasia prostatica benigna, altra condizione di rischio, si utilizzano anche gli antagonisti dell'alfa adrenocettore, o alfa bloccanti, che danno sollievo dalla sintomatologia dell'iperplasia. Uno dei farmaci più utilizzati è la Tamsulosina (Omnice, Pradif) per la sua selettività d'azione.

Oltre agli ormoni, si sono affermati numerosi altri bersagli biologici. La "targeted therapy", associata alla terapia "convenzionale" interviene soprattutto contro le numerose coppie "interruttore-segnale", che, attivando la cellula neoplastica, le danno un comando, un segnale, che fa partire la proliferazione incontrollata. Uno dei primi tra questi target di terapia biologica è stato un oncogene, letteralmente gene che induce malattia oncologica, che si chiama *erbB2*, *neu* o anche HER2. Costituisce una forma anomala di recettore, frequente nel tumore della mammella. Il farmaco più noto mirato a questo bersaglio è l'herceptin (trastuzumab), un anticorpo monoclonale, entrato nella realtà della clinica. Dopo herceptin altre molecole contro lo stesso target sono state sviluppate e il loro uso viene esteso a neoplasie diverse di quella mammaria.

Il secondo farmaco di successo in questa categoria di "pallottole mirate" è il glivec (imatinib o STI), che colpisce un oncogene, tipico della leucemia mieloide cronica, il *bcr-abl*, ma funziona anche nei tumori gastrointestinali stromali.

Uno dei più interessanti tra i bersagli è l'EGFr, il recettore di membrana dell'EGF (fattore di crescita dell'epidermide), attaccato dai farmaci Cetuximab, Gefintinib, Erlotinib e altri. Gli inibitori di EGFr sono stati considerati indicati per la cura del carcinoma polmonare, poiché il recettore dell'EGF è spesso attivato in questa malattia. I risultati sono stati -in parte- meno esaltanti di quelli attesi, anche perché l'applicazione clinica è stata più veloce della diagnostica molecolare. Bloccare un interruttore serve solo se questo è funzionale ed accende una luce. La lampadina è, per la cellula, l'attivazione interna, che spesso si realizza con la "fosforilazione", l'aggiunta di un gruppo fosfato, ad una proteina che stimola la cellula. Dunque, prima di somministrare una cura a "bersaglio" dovremmo non solo sapere se l'interruttore c'è, ma anche se l'accensione illumina la cellula neoplastica: questo non è facile, ma sta diventando possibile.

Esiste poi un modo di "aggirare l'ostacolo", ovvero non si agisce sul tumore, ma sulle cellule che con il tumore interagiscono, il cosiddetto microambiente. La prima strategia "ambientale" è stata quella immunologica, che consiste nello stimolare, direttamente o indirettamente, le difese dell'organismo parzialmente ingannate dalla cellula neoplastica.

In quest'ambito un bersaglio salito alla ribalta terapeutica da poco più di un anno è il VEGF (fattore di crescita vascolare), una proteina che fa crescere i vasi sanguigni, nutrendo i tumori. Combattere i vasi neoformati significa prendere il cancro "per fame", o soffocarlo. L' "antidoto" fin ora più efficace contro il VEGF è l'avastin (bevacizumab), sperimentato principalmente su pazienti con tumori metastatici del colon, ma il cui uso si sta estendendo ad altre neoplasie, tra cui quella polmonare. Alternative farmacologiche, ad esempio il PTK787/ZK222584 sono in corso di studio, ma fin ora l'avastin resta il farmaco principe.

Non si deve dimenticare però che una delle chiavi principali delle nuove terapie è il loro uso in combinazione con chemioterapici citotossici o radioterapia.

Lo studio ACROBAT ha rivelato che l'aggiunta di Erbitux (cetuximab) al regime terapeutico "FOLFOX 4" a base di oxaliplatino, 5-fluorouracile e leucovorin, ha ottenuto una risposta nell'81 per cento dei casi di cancro del colon e la possibilità di sottoporre a intervento un quinto di pazienti che prima del trattamento erano ritenuti inoperabili (terapia definita "neoadiuvante"). Nel caso di aggiunta di cetuximab alla terapia di "prima linea" basata su irinotecan, in pazienti con diffusione tumorale a distanza, e ritenuti inoperabili, si è arrivati a prolungamento significativo della sopravvivenza e l'operabilità delle metastasi.

Anche l' antagonista di VEGF, Bevacizumab, combinato a 5-fluorouracile e leucovorin, prolunga speranza di vita e tempo di progressione nel tumore al colon metastatico.

Queste combinazioni di chemioterapici e farmaci biologici vengono generalmente comprovate prima nella terapia della malattia metastatica e, se sufficientemente efficaci e ragionevolmente poco tossiche, possono essere "promosse" in terapia adiuvante, ovvero post-operatoria.

Conta molto, nella prevenzione di malattia intestinale, la dieta, che deve essere ricca di fibre e povera di carne.

Ogni neoplasia ha sue particolari caratteristiche genetiche e presenta bersagli specifici. Nell'era tecnologica l'analisi dei geni "espressi" da un tumore, di cui si è ottenuta la biopsia, o la composizione dettagliata delle proteine circolanti, dopo un semplice prelievo di siero, consente di avere ritratti molecolari o profili "proteomici" che consentiranno una terapia sempre più personalizzata. Sono numerosi i centri in Italia che si occupano della cosiddetta genomica funzionale, per associare le alterazioni geniche, monitorate velocemente attraverso l'uso di microchip o "array", ad una modificata funzione biologica.

Si fa sempre più strada il concetto dell'infiammazione come importante nello sviluppo delle neoplasie. Una teoria ormai provata per il colon, inizia ad affermarsi per prostata e altri organi. Sappiamo che le cellule dell'immunità cosiddetta "nativa", macrofagi, granulociti etc, possono diventare, da alleate, nemiche e "promuovere" la progressione neoplastica. Pazienti a rischio di

sviluppare tumore del colon presentano spesso l'intestino infiammato. Studi molto promettenti utilizzano antiinfiammatori non steroidei (FANS) in prevenzione.

ANGIOGENESI COME BERSAGLIO: APPROFONDIMENTO

Come abbiamo detto, il farmaco bevacizumab, anticorpo monoclonale contro il fattore di crescita vascolare VEGF, ha dato buoni risultati in termine di aumento di sopravvivenza in combinazione con chemioterapici. Il principale bersaglio cellulare della terapia (o prevenzione) anti-angiogenica è la cellula endoteliale, anche se il nostro laboratorio sta lavorando intensamente anche al ruolo dell'infiltrato infiammatorio nella neoangiogenesi tumorale. Nel corso degli anni sono stati studiati vari target; tra di essi:

- le metalloproteasi, enzimi preposti all'invasione tissutale
- i recettori dei fattori di crescita, in particolare flk-1-KDR il recettore di VEGF
- l'attività in generale della cellula vascolare, con molecole endogene quali angiostatina ed endostatina
- farmaci anti-angiogenici "per caso" ovvero nati con altra funzione e rivelatisi anti-angiogenici come la talidomide e la citochina IL12 e composti anti-infiammatori come l'aspirina o inibitori della COX2 selettivi (studi interrotti per questioni di tossicità).

Tra le diverse molecole che agiscono su un bersaglio recettoriale noi abbiamo studiato le proprietà antiangiogeniche della Somatostatina (SST).

La SST, oltre a svolgere un ruolo di controllo su numerosi ormoni peptidici, è stata identificata quale inibitrice della crescita di alcuni tumori epiteliali e neuroendocrini. La sua attività è mediata dall'induzione di enzimi fosfotirosina-fosfatasi, che bloccano i segnali proliferativi di altri mediatori solubili.

La nostra sperimentazione ha indicato che la SST può anche agire indirettamente anche su tumori che non posseggano i recettori specifici, operando come potenziale antiangiogenico. Le cellule endoteliali esprimono il recettore SSTR3 e sono sensibili alla sua inibizione da parte di SST. Nelle cellule HUVEC (endoteliali da cordone ombelicale), la SST induce inibizione della sintesi del DNA con una IC50 = 1nM. Nonostante SSTR3 sia un recettore -tra i 5 della SST- a trasdurre un segnale citotossico, non risulta tale per le cellule endoteliali (di cui non induce morte apoptotica) per le quali risulta unicamente citostatico.

Le cellule endoteliali, tappezzando i vasi sanguigni, sono frequentemente esposte a questo ormone. Non è chiaro quale sia la funzione fisiologica della presenza del recettore sull'endotelio, informazione critica nel momento in cui lo si sceglie come bersaglio diretto.

Come meccanismi, abbiamo dimostrato che la SST è in grado di inibire il segnale delle MAP-chinasi erk1 e 2 indotte dai surnatanti (terreni di cultura condizionati) di tumori angiogenici nelle cellule endoteliali, agendo come un'inibitore specifico. La sua attività è stata confrontata

con l'inibitore sintetico di erk PD98059. L'uso dello specifico inibitore di SSTR3, BN81658, è in grado di ripristinare completamente la segnalazione tramite erk.

La SST si è inoltre dimostrata capace di inibire la eNOS indotta in cellule endoteliali dai surnatanti tumorali, riducendo del 60% la produzione di NO, un importante mediatore angiogenico con proprietà vasodilatatorie.

L'inibizione della crescita di un tumore vascolarizzato in vivo (sarcoma di Kaposi) da parte di SST come fattore singolo è significativa; è necessario però studiarne la combinazione con farmaci citotossici o radioterapia. Inoltre non si hanno riscontri clinici, in pazienti con tumori di origine endocrina trattati con SST, se risulti un'effettiva inibizione della componente angiogenica. Questo sarebbe fondamentale per un prova del principio.

Una delle proposte recenti della ricerca è quella di utilizzare alcuni chemioterapici (a basse dosi e per periodi più lunghi). In questi protocolli il basso dosaggio del farmaco ha scarsa influenza sul tumore, ma colpisce l'endotelio - una cellula normale - generando difficilmente fenomeni di resistenza alla terapia. L'uso contemporaneo di una terapia metronomica ed una terapia antiangiogenica permette di potenziare l'effetto terapeutico.

CONCLUSIONI

Vi sono oltre 40.000 molecole potenziali candidate a diventare farmaci antitumorali. Solo poche si confermano tali, ancor più difficile è comprovare le combinazioni. Perché una terapia sia eticamente proponibile e somministrabile va dimostrato che porta un reale vantaggio, validato statisticamente in studi di fase II, della sopravvivenza, in un certo tipo di neoplasia, rispetto ai protocolli di consenso approvati ormai internazionalmente.

NOTE: Una parte del testo, utilizzata come base introduttiva, è stata rielaborata da un articolo scritto per Salute di Repubblica e pubblicato a fine ottobre 2005.