

NOVES ESTRATÈGIES PER AL TRACTAMENT DEL CÀNCER

FRANCISCO X. REAL

Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona i Memorial Sloan-Kettering Cancer Center,
New York, USA

Els darrers trenta anys de recerca bàsica i clínica en el desenvolupament de fàrmacs antineoplàstics han permès la identificació de fàrmacs i règims terapèutics actius en el tractament del càncer disseminat (e.g. càncer de testicle, limfoma de Hodgkin). Els darrers quinze anys, però, han posat en evidència les limitacions de la metodologia emprada i la necessitat de dissenyar nous sistemes per al *screening* preclínic i clínic de nous fàrmacs i explorar noves modalitats per al tractament del càncer avançat¹.

El desenvolupament preclínic i clínic de nous fàrmacs citotòxics ha seguit clàssicament el següent esquema: 1) Síntesi química o aïllament de noves molècules; 2) avaluació de l'activitat citotòxica *in vitro* amb un pannel de línies cel·lulars tumorals; 3) determinació de l'activitat antineoplàstica, toxicitat (dosi letal 50) i farmacocinètica en animals utilitzant tumors experimentals (e.g. leucèmies L1210 i P388); 4) determinació de la toxicitat i dosi màxima tolerada en malalts amb càncer (assaig fase I); 5) avaluació de l'activitat antineoplàstica en diferents tumors (assaig fase II); 6) avaluació de l'eficàcia del fàrmac (sol o en combinació); 7) comparació amb règims terapèutics convencionals (assaig fase III); i 8) desenvolupament d'anàlegs de síntesi que, mantenint l'activitat antineoplàstica, tinguin una toxicitat més baixa.

Aquest enfocament ha estat particularment predictiu per a la identificació de fàrmacs actius en el tractament de les neoplàsies hematopoètiques, però no en els tumors sòlids. Des que a començaments dels anys setanta s'iniciaren assaigs clínics amb el cisplatí, no s'ha identificat cap fàrmac que representi un avenç qualitatiu important en el tractament antineoplàstic¹.

En conseqüència, el National Cancer Institute dels Estats Units (la institució pública més important en la recerca de nous fàrmacs antineoplàstics) ha adoptat dues iniciatives: 1) cercar altres mètodes que prediguin millor l'eficàcia dels fàrmacs citotòxics en el tractament dels tumors sòlids humans, i 2) investigar altres modalitats terapèutiques. Aquesta revisió es cenyirà a aquest darrer punt.

El desenvolupament de la tecnologia per a la producció d'anticossos monoclonals i per a la clonació de gens, amb altres avenços en biologia cel·lular i molecular, han estat fonamentals per portar a la fase preclínica i clínica molècules biològiques l'activitat de les quals està essent explorada clínicament. La primera citocina produïda amb tècniques de DNA recombinant utilitzada en el tractament del càncer fou l'interferó alfa, i amb ella s'inicià l'era d'estudi dels modificadors de la resposta biològica en oncologia.

La Taula 1 resumeix alguns dels nous enfocaments per al tractament antineoplàstic. Ací discutiré solament els tipus d'estratègies que el nostre grup està investigant: 1) els anticossos monoclonals (AcMo), 2) el desenvolupament de vaccins immunògens i 3) la inducció de la diferenciació cel·lular terminal.

TAULA 1. Nous enfocaments per al tractament antineoplàstic

-
1. Nous fàrmacs actius, especialment substàncies naturals.
 2. Nous mètodes per al *screening* de fàrmacs citotòxics antineoplàstics.
 3. Fàrmacs inhibidors del procés de promoció neoplàstica.
 4. Fàrmacs antimetastàtics.
 5. Fàrmacs inhibidors de l'activació, transcripció o traducció d'oncogens.
 6. Fàrmacs blocadors de l'activació de receptors per a factors de creixement.
 7. Fàrmacs inductors de la diferenciació cel·lular.
 8. Fàrmacs que augmentin l'índex terapèutic dels agents citotòxics (*i.e.* G-CSF, GM-CSF).
 9. Manipulació del sistema immunitari:
 - 9.1. Immunoteràpia activa específica amb antígens tumorals purificats.
 - 9.2. Immunoteràpia activa específica amb anticossos anti-id.
 - 9.3. Immunoteràpia passiva específica amb anticossos monoclonals (murins, humans, químics).
 - 9.4. Immunoteràpia adoptiva (cèl·lules killer activades-LAK).
 - 9.5. Citoquines (*i.e.* interferons, TNF, IL-1, IL-2).
-

Els anticossos monoclonals en el tractament del càncer

L'extraordinària especificitat dels AcMo i la possibilitat d'obtenir preparacions químicament homogènies en quantitats il·limitades són els factors fonamentals que permeten la seva aplicació en el tractament del càncer. La qüestió més important de la immunologia tumoral —l'existència d'antígens específics de tumor en les neoplàsies espontànies humanes— continua essent objecte d'intens estudi^{2,3}. Cap dels AcMo generats contra tumors humans descrits fins a l'actualitat detecta antígens específics de cèl·lules neoplàstiques. Tanmateix, l'amplificació de l'expressió de certs antígens en les cèl·lules transformades o la diferent accessibilitat de l'antigen en les cèl·lules normals i neoplàstiques poden proporcionar un grau d'especificitat operacional.

Tres estratègies fonamentals per a l'ús d'AcMo estan essent estudiades: a) l'explotació de l'activitat biològica dels AcMo (fixació de complement, citotoxicitat mitjançada per cèl·lules); b) l'ús d'AcMo com transportadors que augmentin o selectivitzin el lliurament de fàrmacs, toxines o partícules radioactives en el tumor; i c) la modulació dels processos de proliferació i diferenciació cel·lular.

1. Dos exemples d'anticossos amb funció biològica efectora són els AcMo R24 i 3F8^{4,6}. L'anticòs R24 es caracteritza per ésser una IgG3 que detecta el gangliòsid GD3, expressat en alta densitat a la membrana de cèl·lules de melanoma (fins a 800.000 molècules/cèl·lula). R24 té capacitat per a lisar cèl·lules mitjançant complement o monòcits (ADCC). En un assaig fase I de l'AcMoR24 en malalts amb melanoma s'observaren regressions parcials o completes del tumor en 5/21 malalts⁵. L'administració de l'AcMoR24 s'acompanya de la

inducció d'un infiltrat inflamatori peritumoral compost per cèl·lules CD8⁺, neutròfils i mastòcits, i deposició de components del sistema de complement, inclòs C9⁵.

L'anticòs 3F8, que detecta el gangliòsid GD2, té característiques similars a l'AcMoR24: isotip IgG3, detecció d'un antigen expressat en altes quantitats a la membrana cel·lular, inducció de lisi cel·lular mitjançada per complement o monòcits. En un assaig fase I d'aquest AcMo en malalts amb neuroblastoma i melanoma s'observaren regressions tumorals en 4/17 malalts⁶.

Malgrat que els paràmetres predictius de l'activitat clínica dels AcMo encara no han estat determinats amb certesa, aquests dos estudis suggereixen que una alta densitat antigènica a la membrana cel·lular i la capacitat efectora dels anticossos (fixació de complement, ADCC, inducció d'inflamació a nivell tumoral) són prerequisits per a la inducció de regressions tumorals *in vivo*. Per determinar la validesa d'aquesta hipòtesi cal estendre aquest estudis a altres sistemes antigènics en altres tipus de tumors.

2. La utilització dels anticossos com a transportadors selectius d'agents citotòxics al tumor depèn fonamentalment de l'especificitat de l'anticòs i del seu comportament farmacològic. L'ús de fàrmacs citotòxics, toxines i radioisòtops conjugats a AcMo està essent explorat actualment. Un aspecte a considerar en l'aplicació d'aquesta estratègia és la necessitat de dissenyar sistemes per a conjuguar els agents citotòxics a les molècules d'anticòs sense afectar la seva immunoreactivitat i especificitat. Alguns avantatges d'aquesta estratègia són: 1) en el cas dels radioisòtops, la lesió radiògena pot estendre's més enllà d'una sola cèl·lula, cosa que és particularment interessant per resoldre el problema de l'heterogeneïtat en l'expressió antigènica en el tumor; 2) algunes de les toxines, com la ricina, són extraordinàriament potents i una molècula de toxina és suficient per a la mort cel·lular. Els factors limitants en l'ús d'immunoconjugats són: 1) la quantitat total d'AcMo lliurat a nivell del tumor (per als tumors sòlids aquesta és de l'ordre de 10^{-4} — 10^{-5} de la dosi injectada per gram de tumor) i 2) la relació entre quantitat d'immunoconjugat lliurat en el tumor i en els teixits normals. És probable que aquests problemes no siguin tan importants per a les neoplàsies hematopoètiques, en les quals l'antigen és més fàcilment accessible a l'AcMo.

3. La tercera estratègia es basa en la capacitat dels anticossos per modular la proliferació i/o diferenciació cel·lular. Un exemple és l'efecte dels autoanticossos contra el receptor de la TSH per estimular o bloquejar la síntesi d'hormones tiroïdals en les malalties de Graves i Hashimoto. Hom ha identificat alteracions en l'expressió de receptors per a factors de creixement en les cèl·lules neoplàstiques, que poden ésser explotades farmacològicament.

Carcinomes escamosos de diversos orígens expressen quantitats de receptor (r) per al factor de creixement epidèrmic (EGF) entre 5 i 100 vegades superiors a les expressades per les cèl·lules normals del mateix origen histològic. Alguns d'aquests tumors produeixen factor de creixement transformant tipus alfa (TGF — α), que té homologia estructural amb l'EGF, interacciona amb el rEGF i induïx la proliferació cel·lular com ell. Alguns AcMo anti-rEGF bloquegen l'activació del rEGF inhibint la unió d'EGF o TGF — α amb el receptor, amb la qual cosa es bloca l'estimulació autocrina i paracrina de la proliferació neoplàstica. L'AcMo225 és un exemple d'aquests anticossos i s'utilitza actualment en malalts amb carcinoma escamós de pulmó⁷. Altres exemples d'aquesta estratègia són l'ús d'AcMo antireceptor de transferrina en diversos tumors que expressen alts nivells de receptor de transferrina, i AcMo antibombesina (pèptid alliberador de gastrina, GRP) en carcinoma de pulmó de cèl·lula petita.

En aquests casos, les molècules detectades pels AcMo també són expresades per diverses cèl·lules normals i hom aprofita l'amplificació de l'expressió d'aquestes molècules en el tumor.

Immunització activa de pacients amb càncer

A més d'ésser agents farmacològics *per se*, els AcMo han permès identificar antígens cel·lulars l'expressió dels quals és amplificada en les cèl·lules neoplàstiques. Si aquests antígens tenen una distribució restringida en els teixits normals, esdevenen dianes interessants per a la immunització activa específica. Aquest enfocament suposa un pas qualitatiu transcendent en comparació amb l'ús d'agents estimuladors inespecífics de la resposta immunitària (e.g. BCG), els quals han tingut poca rellevància en oncologia clínica fins ara. Els objectius d'un programa d'immunització activa específica en malalts amb càncer són: 1) dissenyar un vaccí immunogen (immunogen, adjuvant immunitari, inhibidors de cèl·lules T supressores); 2) determinar si la inducció d'immunitat específica té algun efecte sobre el curs clínic de la malaltia (malalts amb càncer avançat) i 3) estudiar l'efecte de la inducció d'immunitat específica sobre el curs clínic en malalts amb alt risc de recurrència del tumor (estudis prospectius).

Les investigacions més avançades en aquesta àrea són en malalts amb melanoma. Dues observacions són la base d'aquests estudis: 1) els gangliòsids GM2 i GD2 són dos components majoritaris de les cèl·lules de melanoma i 2) diversos estudis han demostrat que el sèrum d'alguns malalts amb melanoma conté anticossos que reaccionen amb els gangliòsids GM2 i GD2, fet que indica que aquestes molècules poden ésser immunògenes en l'home. Resultats recents d'investigadors a la University of California Los Angeles i a Memorial Sloan-Kettering Cancer Center han demostrat que hom pot induir sistemàticament anticossos anti-GM2 de classe IgM i IgG, i suggereixen que títols d'anticossos sèrics anti-GM2 $>1/40$ poden tenir una significació pronòstica⁸. Per a determinar la relació exacta entre el procés d'immunització activa específica amb GM2, la inducció d'anticossos anti-GM2 i el millor pronòstic clínic, s'està duent a terme un estudi randomitzat prospectiu adjuvant en malalts amb melanoma.

El nostre grup ha iniciat estudis d'immunoteràpia activa específica amb dos antígens associats a carcinoma, Tn i sialil-Tn. Aquests epitops estan restringits a tumors epitelials, no són expressats per les cèl·lules epitelials dels teixits adults i són immunògens en ratolins. Una vegada s'hagi dissenyat un vaccí sistemàticament immunogen en ratolins procedirem a estudis en humans.

Inducció de la diferenciació cel·lular terminal

En les cèl·lules normals, la diferenciació cel·lular és regulada en estreta relació amb els processos de proliferació cel·lular. La transformació cel·lular s'acompanya de canvis en la regulació del procés de diferenciació i diverses observacions suggereixen que la manipulació d'aquest procés pot constituir una nova modalitat de tractament antineoplàstic.

Els dos millors exemples de tumors experimentals sensibles a l'efecte d'agents inductors de la diferenciació cel·lular són l'eritroleucèmia de Friend (ELF)⁹ i el teratocarcinoma F9¹⁰. L'ELF és resultat de la infecció d'esplenòcits de ratolí per un retrovirus incomplet. Les cèl·lules d'ELF estan bloquejades en la seva diferenciació, proliferen amb temps de doblament de 20h, i no s'hi detecta mRNA d'hemoglobina. En presència d'hexametilè-bis-acetamida

(HMBA) en el medi de cultiu es produeix en primer lloc el compromís (*commitment*) cel·lular per diferenciar-se (amb una inhibició de la síntesi de DNA i una disminució dels nivells de mRNA corresponent a diversos oncògens cel·lulars) i la inducció de la transcripció del gen de globina fins a la diferenciació cel·lular terminal. La presència de l'agent inductor en el cultiu és necessària fins que es produeix el compromís cel·lular de diferenciar-se. Altres agents químics tenen efectes similars sobre les cèl·lules ELF (e.g. DMSO, esters de forbol). Han estat duts a terme experiments similars amb una línia cel·lular derivada d'una leucèmia promielocítica humana (HL-60), i es pot induir la diferenciació d'aquesta cap a neutròfils o cap a monòcits depenent de l'agent inductor emprat.

En presència d'àcid retinoic les cèl·lules del teratocarcinoma F9 de ratolí es diferencien terminalment cap a cèl·lules amb fenotip neuronal. La totipotencialitat de les cèl·lules F9 es demostra perquè la seva implantació en mares pseudo-embarassades s'acompanya del desenvolupament d'un nou individu totalment normal. Aquest és el millor exemple que justifica afirmar que l'oncogènesi és una repetició de l'embriogènesi.

El problema més important de l'avaluació d'agents inductors de la diferenciació en humans es l'extraordinària heterogeneïtat fenotípica que existeix espontàniament en els tumors. Aquest problema constitueix un repte metodològic extraordinari que mai s'havia plantejat en els assaigs de fàrmacs citotòxics.

Han estat iniciat estudis fase I amb HMBA en humans i han definit les dosis a utilitzar en assaigs fase II. L'ús d'aquest enfocament per al tractament de les neoplàsies requerirà desenvolupaments paral·lels en els nostres coneixements sobre els processos de diferenciació de les cèl·lules transformades, particularment en els tumors sòlids.

Conclusions

Els futurs avenços en el tractament del càncer i en la investigació de noves modalitats terapèutiques estan estretament lligats als avenços en els coneixements bàsics de biologia cel·lular i molecular.

L'avaluació de fàrmacs moduladors de la resposta biològica presenta noves dificultats metodològiques, especialment la determinació dels canvis histològics i fenotípics que precedeixen i acompanyen la regressió tumoral induïda per agents biològics.

Avui més que mai hom pot preveure un enfocament multidisciplinari del tractament del càncer.

Referències

1. WITTES R. Current emphases in the clinical drug development program of the National Cancer Institute. Cancer. Principles and practice of oncology update. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. (eds.) JB. Lippincott (1987) 1: 12,1-15.
2. OLD LJ. Cancer immunology: The search for specificity. GHA. Clowes Memorial Lecture. Cancer Res. 1981; 41: 361-375.
3. REAL FX, MATTES MJ, HOUGHTON AN, OETTGEN HF, LLOYD KO, OLD LJ. Class 1 (unique) tumor antigens of human melanoma. Identification of a 90,000 Mr cell surface glycoprotein by autologous antibody. J. Exp. Med. 1984; 160: 1219-1233.
4. DIPPOLD WG, LLOYD KO, LI LTC., IKEDA H, OETTGEN HF, OLD LJ. Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980; 77: 6114-6118.

5. HOUGHTON AN, MINTZER D, CORDON-CARDO C, WELT S, FLIEGEL B, VADHAN S, CARSWELL E, MELAMED MR, OETTGEN HF, OLD LJ. Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: A phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82: 1242-1246.
6. CHEUNG NKV, LAZARIS H, MIRALDI FD, ABRAMOWSKI CR, KALLICK S, SAARINEN UM, SPITZER T, STRANDJORD SE. Ganglioside GD2-specific monoclonal antibody 3F8: A phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1987; 5: 1430-1440.
7. KAWAMOTO T, SATO JD, LE A, POLIKOFF J, SATO GH, MENDELSON J. GROWTH STIMULATION OF A431 cells by epidermal growth factor: identification of high affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 1337-1341.
8. LIVINGSTON PO, NATOLI EJ, JONES CALVES M, STOCKERT E, OETTGEN HF, OLD LJ. Vaccines containing purified GM2 ganglioside elicit GM2 antibodies in melanoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 2911-2915.
9. MARKS PA, RIFKIND RA. Erythroleukemia differentiation. *Ann. Rev. Biochem.* 1978; 47: 419-438.
10. MARTIN GR. Teratocarcinoma as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell* 1975; 5: 229-243.