

Human Programmed Cell Death 1 (hPD-1): studio bioinformatico della proteina e delle interazioni con il suo ligando ed il farmaco inibitore Nivolumab

AUTORI: Martinello V.¹, Levetti S.², Bushkolaj K.²

1) IRCCS CRO di Aviano (PN), 2) AO Ordine Mauriziano di Torino

INTRODUZIONE:

L'immunoterapia è una strategia terapeutica che consiste nell'utilizzo di farmaci che attivano il sistema immunitario dell'uomo e lo stimolano ad agire contro le cellule tumorali. Si differenzia dalle altre terapie oncologiche in quanto non agisce direttamente sul tumore ma sui meccanismi di difesa messi in atto contro il tumore. Per funzionare in modo corretto le cellule del sistema immunitario (in particolare i Linfociti T) necessitano di sistemi di attivazione e spegnimento (i cosiddetti "checkpoint") che regolano la loro attività.

I checkpoint del sistema immunitario sono dei recettori espressi sulla superficie dei linfociti T citotossici ed interagiscono con dei ligandi espressi dalle cellule che presentano l'antigene (APC), ma anche dalle cellule cancerose; una volta legati bloccano l'azione del linfocita aiutando il tumore a sfuggire al controllo del sistema immunitario (Fig.1).^a

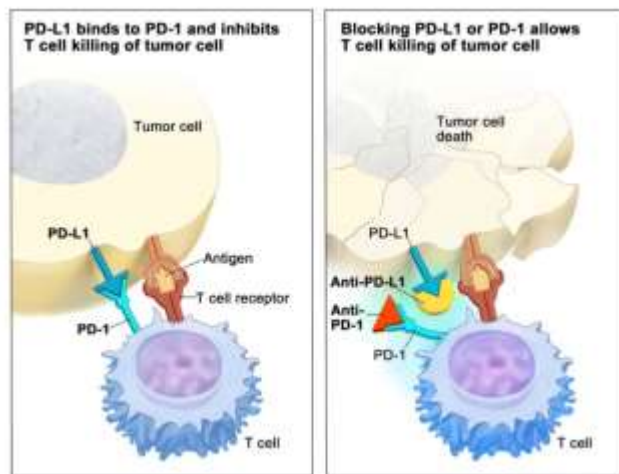


Fig.1: come si legano le cellule T al tumore. ^a

Gli inibitori di questi checkpoint, che sono gli anticorpi monoclonali contro loro diretti, impediscono il legame tra recettore e ligando bloccando il conseguente segnale. Gli inibitori approvati sono:

- anti CTLA-4 (Ipilimumab);^b
- anti PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab);
- anti PD-L1 (Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab).

Possono agire da soli o in combo (Fig.2).¹

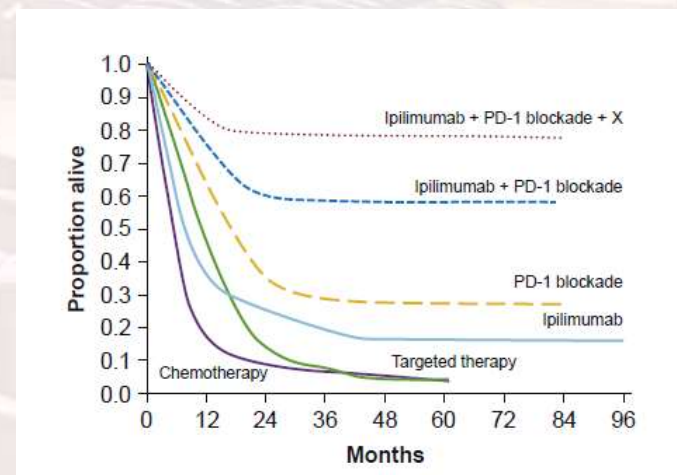


Fig.2: combinazione di più immunoterapie porta ad una sopravvivenza maggiore rispetto a quelle singole.¹

OBIETTIVO:

Lo scopo della Bioinformatica e della Biologia Computazionale è quello di offrire strumenti e metodologie capaci di gestire e analizzare la grande quantità di informazioni prodotte nel campo della ricerca biologica. Questo studio darà utili strumenti per prevedere funzioni e comportamenti di molecole simili a quelle studiate, di sempre maggiore interesse nelle terapie anti-tumorali.

Verrà confrontata la struttura proteica (Fig.3)^c con la struttura dell'anticorpo monoclonale Nivolumab inibitore del complesso (Fig.4).^d

Fig.3: PD-1 è una glicoproteina di superficie, espressa sulla superficie dei linfociti T attivati. I suoi ligandi sono le proteine PD-L1 e PD-L2. In condizioni fisiologiche, il legame tra la proteina e i suoi ligandi previene un'eccessiva stimolazione linfocitaria e mantiene la tolleranza verso gli antigeni self regolando negativamente la risposta immunitaria e sopprimendo i linfociti T iperattivi.^c



Fig.4: PD-1 è contenuta nel farmaco inibitore Nivolumab; legandosi a hPD-1 blocca la sua interazione con PD-L1 e PD-L2. Attraverso il blocco di questo legame potenzia le risposte delle cellule T. Assieme ad altre molecole rivolte contro PD-1 o PDL1-PDL2 viene usata nelle terapie antitumorali.^d

MATERIALI E METODI:

Per la caratterizzazione bioinformatica delle proteine hPD-1, PDL1 e dell'anticorpo inibitore anti hPD-1 sono state usate banche dati genomiche (GENBANK), strutturali (PDB) e programmi informatici come JPRED, SWISS PDB VIEWER e JMOL per la previsione e il confronto delle strutture proteiche (Fig.5).²

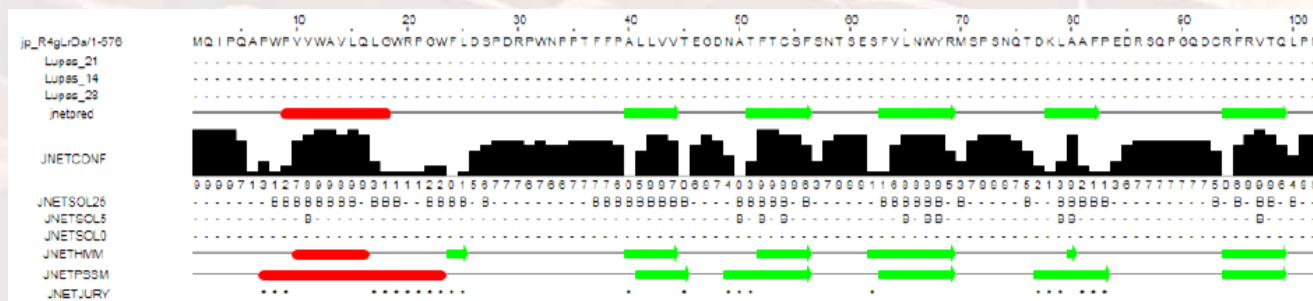


Fig.5: esempio di analisi su segmento di hPD-1 ottenuta con il programma J-PRED per la previsione della struttura secondaria della proteina , con indicazione delle alfa eliche (in rosso) e dei foglietti beta (in verde).²

RISULTATI:

Grazie alle sequenze recuperate dalle banche dati e applicate ai programmi informatici precedentemente citati, si sono potuti svolgere diversi studi sulla struttura della proteina hPD-1.³ I risultati più interessanti riguardano le previsioni dei siti di interazione (Fig.6)^d e il confronto tridimensionale tra PD-1 ed altre proteine (Fig.7).^e

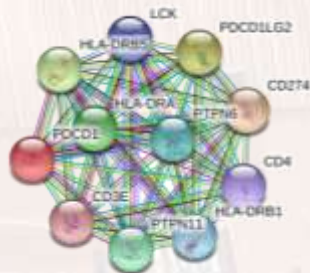


Fig. 6: Grazie al programma possiamo vedere nella figura una descrizione sintetica della proteina *target*, a cui seguono una serie di proteine a lei associate per interazione:

la proteina hPD-1 è un inibitore di superficie coinvolto nella regolazione delle cellule T, interagisce particolarmente con le proteine CD274 (essenziale per la proliferazione dei T), con il suo ligando PDCL-1, con le molecole HLA del complesso maggiore di istocompatibilità e così via.^d

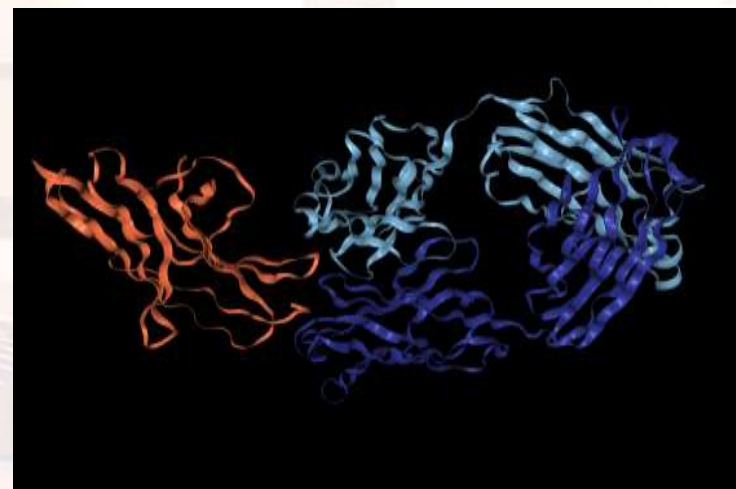
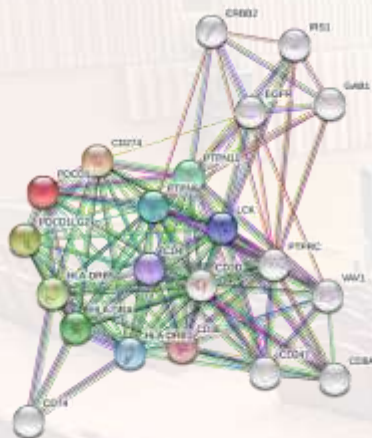


Fig. 7: Con JMOL, è stata accostata la struttura dell'anticorpo NIVOLUMAB (blu e azzurro) alla proteina hPD-1 (rosa).^e

CONCLUSIONI:

A seguito dello studio bioinformatico si sono appresi gli strumenti per poter ricercare le informazioni nei *database online*, per poter indagare adeguatamente la struttura primaria, secondaria e terziaria del complesso, per scoprire tutte le possibili interazioni di questo con altre molecole. Tutto questo è indispensabile in un'ottica di sempre maggior progresso scientifico, che richiede una competenza aggiornata sui sistemi e metodi informatici, che sono diventati ormai delle "biblioteche molecolari".

SITOGRAFIA:

- <https://www.listarfish.it/news/pd-1-l1-e-anti-pd-1-test-per-il-dosaggio-della-molecola-e-del-farmaco/>
- <https://www.aimac.it/farmaci-tumore/anticorpi-monoclonali/ipilimumab>
- <http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/index.html>
- <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=mra4XRR1Wb4E>
- <http://jmol.sourceforge.net/>

BIBLIOGRAFIA:

- 1) "Clinical Impact of Checkpoint Inhibitors as Novel Cancer Therapies"
K. Shih, T. Arkenau, et al., *Drugs*. 2014; 74(17): 1993–2013. Published online 2014 Oct 25.
- 2) "Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1"
K. Zak, R. Kite, et al., *Structure*. 2015 Dec 1; 23(12): 2341–2348.
- 3) "Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response"
L. V. Riella, A. M. Paterson, et al., *Am J Transplant*. 2012 Oct; 12(10): 2575–2587. 2012 Aug 17