

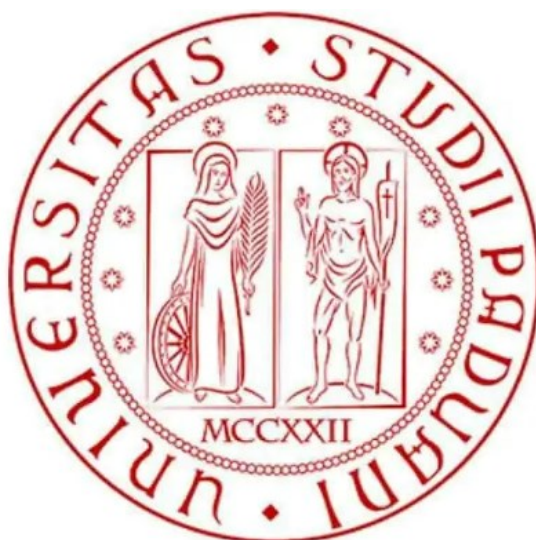
*A tutti coloro che stanno combattendo per la  
propria salute fisica, mentale e sociale.  
E a coloro che non ce l'hanno fatta.*



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

***VACCINIA VIRUS* ONCOLITICO: NUOVA  
FRONTIERA NEL TRATTAMENTO DEL  
CARCINOMA POLMONARE**

Tutor: Prof.ssa Calistri Arianna  
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureanda: Caierani Lisa

ANNO ACCADEMICO 2023/2024



# **INDICE**

## **Abstract**

Pagina 1

## **Capitolo 1: INTRODUZIONE AI VIRUS ONCOLITICI**

pagina 3

## **Capitolo 2: CARCINOMA POLMONARE**

pagina 7

## **Capitolo 3: *VACCINIA VIRUS***

pagina 9

## **Capitolo 4: *VACCINIA VIRUS* ONCOLITICO**

pagina 11

## **Capitolo 5: VACCINI ANTITUMORALI - CARCINOMA POLMONARE**

pagina 17

## **Capitolo 6: CONCLUSIONE**

pagina 21

## **Bibliografia**

pagina 23



## **Abstract**

I tumori sono una delle principali cause di morte a livello globale. Il trattamento del cancro, di qualunque forma di cancro si tratti, è una delle maggiori sfide che ancora oggi, dopo anni di ricerca e progressi, l'essere umano si trova ad affrontare. Tra le nuove strategie terapeutiche sviluppate ve ne è una nuova che, per quanto insolita, potrebbe rappresentare la svolta: l'utilizzo dei virus oncolitici. In questa trattazione verrà preso in considerazione uno dei tumori maggiormente diffusi, il cancro ai polmoni, e verrà considerata una nuova terapia formulata per il suo trattamento: il *Vaccinia virus* oncolitico. Potrà mai questa nuova strategia terapeutica risultare una valida alleata?





# 1. INTRODUZIONE AI VIRUS ONCOLITICI

## 1.1 Virus oncolitici

I virus. Agenti patogeni spesso riconosciuti solo come nemici da combattere possono, in realtà, rappresentare un'importante risorsa per l'uomo. Il 1990 fu un anno che segnò la storia nell'utilizzo di questi agenti biologici: i ricercatori iniziarono a chiedersi cosa sarebbe accaduto se i virus fossero stati in grado di uccidere in modo specifico cellule tumorali.

Un virus non è altro che un parassita intracellulare obbligato e una cellula infettata vede la modifica di tutte le sue funzioni vitali.

Nel caso specifico dei virus oncolitici, l'idea principale è stata quella di sfruttare le caratteristiche intrinseche di questi agenti biologici per utilizzarli all'interno del contesto della terapia tumorale. Infatti, i virus oncolitici altro non sono che agenti antitumorali in grado di replicarsi in modo selettivo all'interno di cellule neoplastiche.

Esistono principalmente due classi di virus oncolitici:

- virus oncolitici naturali: spesso utilizzati per studi di ricerca allo scopo di comprendere come possono rappresentare una risorsa nel trattamento di diverse neoplasie (esempi: virus del morbillo, reovirus o virus della malattia di Newcastle);
- virus oncolitici geneticamente modificati: studiati a lungo allo scopo di comprendere come la modifica del loro genoma potesse risultare utile in terapia.

I processi più spesso utilizzati per lo sviluppo di virus oncolitici prevedono la rimozione dei geni più virulenti dal loro genoma originale e/o l'inserimento di transgeni per promuoverne l'attività oncolitica. Nel 2015 venne approvato dall'FDA il primo virus oncolitico, basato su herpes simplex virus di tipo 1 (HSV-1), per il trattamento di pazienti affetti da melanoma. Fu un passo in avanti importante: la terapia oncolitica passò dall'essere una visione a realtà. <sup>[1]</sup>

## 1.2 Caratteristiche virus

Esistono virus a DNA e virus a RNA: i virus a DNA sono generalmente di dimensioni maggiori rispetto a quelli a RNA e ciò risulta utile in caso di necessità di inserimento

di transgeni di lunghezze importanti; di contro, i virus a RNA, proprio grazie alle loro dimensioni ridotte, risultano particolarmente utili nelle situazioni in cui il sistema oncolitico debba attraversare membrane biologiche come, ad esempio, la barriera ematoencefalica.

Un'altra differenza interessante tra le due tipologie di genomi risiede nel tasso di mutazione: virus a RNA sono meno stabili dal punto di vista genetico rispetto a quelli a DNA, sono quindi più inclini a sviluppare mutazioni.

### **1.3 Meccanismo d'azione della terapia virale**

I virus oncolitici sono in grado di lisare direttamente le cellule tumorali o di stimolare il sistema immunitario ad agire contro di esse: cellule tumorali infettate dal virus attivano la risposta infiammatoria esponendo antigeni sulla loro superficie.

La terapia virale è resa possibile dalla modifica delle proteine che si trovano sulla superficie del virus stesso allo scopo di permettere il riconoscimento dei recettori presenti sulla superficie delle cellule tumorali; è importante considerare che tali cellule sono dotate di un metabolismo più attivo e di una crescita più rapida rispetto ad una cellula sana: queste caratteristiche le rendono particolarmente idonee a sostenere la replicazione virale. Modificare virus oncolitici tramite tecniche di ingegneria genetica, rimuovendo geni virali non essenziali ed inserendo promotori tumore-specifici, aiuta nella promozione della replicazione all'interno del tumore. <sup>[1]</sup>

Ultimo aspetto da considerare riguarda le modalità con le quali le cellule sane vanno a difendersi dall'infezione virale. Le cellule tumorali vedono una deficienza nella risposta antivirale mediata da interferone di tipo I (IFN-1) che, normalmente, si occupa di attivare una serie di pathway difensivi nelle cellule sane adiacenti alle cellule infettate da virus. Nel tumore, quando la cellula tumorale andrà incontro a lisi il virus si diffonderà amplificando l'oncolisi. <sup>[1]</sup>

**Figura 1.**

Virus oncolitici si riproducono all'interno di specifiche cellule tumorali e, in seguito alla loro lisi, vengono rilasciati procedendo all'infezione di cellule tumorali adiacenti. Nelle cellule sane, la replicazione è scarsa o addirittura nulla grazie all'efficiente sistema difensivo mediato da IFN-1. Grazie a questo sistema, i virus oncolitici usati per la terapia possono essere eliminati efficacemente dal sistema immunitario senza andare ad intaccare le cellule sane.

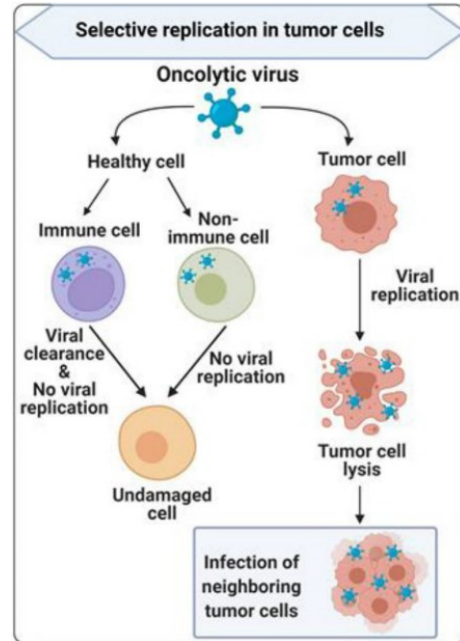


Immagine da [The emerging field of oncolytic virus-based cancer immunotherapy - Ma R. , et al.]

L'espressione dei transgeni virali può, col tempo, andare a diminuire in quanto le cellule infettate dal virus verranno uccise limitando la riproduzione del virus stesso; minor espressione dei transgeni virali all'interno del tessuto tumorale si traduce in risposte terapeutiche di minor durata. Il potenziale oncolitico dipende dal tipo di virus e dal suo tropismo, dalla dose somministrata, da quanto la cellula tumorale è suscettibile all'infezione e alla morte cellulare.<sup>[1]</sup>

In una terapia di questo tipo va comunque considerato anche il problema degli off-targets e della comparsa di effetti avversi anche su cellule sane che, per quanto limitati, si possono presentare.<sup>[1]</sup>



## 2. CARCINOMA POLMONARE

Il tumore del polmone rappresenta la principale causa di morte correlata a neoplasie nei paesi industrializzati (15% di tutte le diagnosi di tumore negli uomini, 6% nelle donne).<sup>[2]</sup>

Esistono varie tipologie di carcinoma polmonare che vengono suddivise in due gruppi principali: carcinoma polmonare a piccole cellule (in inglese: Small-Cell Lung Cancer, SCLC) e il carcinoma polmonare non a piccole cellule (in inglese: Non-Small-Cell Lung Cancer, NSCLC).

- Carcinoma polmonare a piccole cellule: o microcitoma, rappresenta il 10-15% dei casi e interessa i bronchi di diametro maggiore. Ad essere interessate sono cellule di piccole dimensioni e la prognosi generalmente non è buona in quanto si tratta di un tumore più aggressivo, e che si diffonde più in fretta, rispetto al carcinoma non a piccole cellule. Lo SCLC colpisce perlopiù fumatori e viene classificato in due sottogruppi in base alla sua evoluzione: limitato o esteso.
- Carcinoma polmonare non a piccole cellule: rappresenta il restante 85% dei casi e viene, a sua volta, suddiviso in varie tipologie quali carcinoma spinocellulare (ha la prognosi più positiva), adenocarcinoma (più frequente) e carcinoma a grandi cellule (meno frequente). In casi più rari, il tumore polmonare origina da tessuti diversi da quello costituente il polmone come dal tessuto endocrino (carcinoide polmonare) o dal tessuto linfatico (linfoma polmonare).<sup>[2]</sup>

I tumori che rientrano in queste tipologie vengono classificati in quattro stadi di gravità in base alla loro evoluzione (da I a IV) tenendo conto di dimensione, coinvolgimento di linfonodi ed eventuale presenza di metastasi a distanza.<sup>[2]</sup>

Tra i fattori di rischio più comuni si trovano il fumo di sigaretta, esposizione a cancerogeni chimici (amianto, radon), inquinamento atmosferico.

A livello molecolare, i meccanismi interessati nello sviluppo neoplastico riguardano la modifica di diversi geni: nel NSCLC sono colpiti gli oncosoppressori p53 e p16 e l'oncogene K-RAS, nel SCLC compaiono mutazioni degli oncosoppressori p53 e RB1.<sup>[2]</sup>

Il trattamento di un carcinoma polmonare NSCLC prevede: uso della chirurgia (scelta più comune), radioterapia sola o in associazione a chemioterapia (se la terapia chirurgica non è possibile), chemioterapia standard, terapie a bersaglio molecolare, immunoterapia e trattamenti locali. [2]

Il trattamento di un carcinoma polmonare SCLC prevede: chemioterapia (usata nella gran parte dei casi poiché la diagnosi spesso avviene quando sono già presenti metastasi), immunoterapia (in corso di studio e associata a chemioterapia) e radioterapia. [2]

### 3. *VACCINIA VIRUS*

Il *Vaccinia virus*, noto anche come virus vaccinico, è un virus facente parte della grande famiglia *Poxviridae* i cui membri sono caratterizzati da grandi dimensioni, genoma a DNA a doppio filamento e presenza di envelope.

Questo agente virale venne utilizzato nella sintesi del vaccino contro il vaiolo umano e rappresentò un'importante risorsa viste le sue caratteristiche di ridotta virulenza ed efficienza nell'induzione di una risposta immunitaria adeguata. [3]

Nella seconda metà del 18esimo secolo, Edward Jenner notò come l'inoculazione di materiale infettivo proveniente da lesioni causate da vaiolo animale portava i pazienti a sviluppare l'immunità nei confronti della malattia del vaiolo umano. Inizialmente si pensava che il virus utilizzato da Jenner fosse proprio del vaiolo bovino (CPXV), ma successivamente alcune evidenze misero in luce che il poxvirus usato era, in realtà, un virus equino che veniva trasmesso dai cavalli ai bovini: a tale virus venne dato il nome, nel 1939, di virus vaccinico (in inglese *Vaccinia virus*, VACV). [3]

L'origine di VACV è tutt'ora sconosciuta. Si tratta di un virus con genoma di grandi dimensioni, approssimativamente di misura pari a 190kbp, contenente all'incirca 200 ORF e a replicazione citoplasmatica. Il genoma è bidirezionale e codifica per proteine in entrambi i sensi (R= right e L=left vanno ad indicare la direzione dell'ORF). [3]

I primi vaccini basati su VACV vennero utilizzati nella campagna vaccinale intrapresa tra 1967 e 1977. Nel Maggio 1980 venne annunciata l'eradicazione del vaiolo umano come risultato della somministrazione del vaccino a livello mondiale. [3]

Inizialmente prodotto all'interno di animali vivi, nel tempo vennero aggiornati i metodi di sintesi arrivando a produrre il vaccino su colture cellulari, questo al fine di evitare le contaminazioni microbiche e ridurre la probabilità di reazioni allergiche. Con il maggior sviluppo delle tecniche di ingegneria genetica, *Vaccinia virus* venne poi utilizzato per lo sviluppo di vettori virali e vaccini ricombinanti. [3]





## 4. *VACCINIA VIRUS* ONCOLITICO

### 4.1 *Vaccinia virus* oncolitico

Lo sviluppo di virus oncolitici ha affrontato, soprattutto negli ultimi anni, una crescita notevole. I vettori progettati hanno caratteristiche diverse e vanno considerati, per ognuno, vantaggi e svantaggi del loro impiego basandosi anche sul tipo di condizione che si desidera trattare.

Il confronto di VACV con altri vettori mette in luce diversi vantaggi:

- 1) *Vaccinia virus* è in grado di replicarsi nel citoplasma e ciò lo rende un candidato ottimale alla terapia in quanto non vi è rischio di integrazione nel genoma dell'ospite;
- 2) il genoma di grandi dimensioni risulta idoneo all'inserimento, all'interno di un singolo vettore, di geni terapeutici esogeni di dimensioni notevoli;
- 3) replicazione rapida che conduce a lisi cellulare;
- 4) tropismo tumorale naturalmente presente;
- 5) replicazione anche in condizioni ipossiche;
- 6) non vi sono limitazioni recettoriali in quanto *Vaccinia virus* è infettivo nei confronti di ospiti di varie specie e in un'ampia varietà di tessuti;
- 7) possibilità di esercitare un effetto antitumorale tramite la risposta immunitaria. [4]

Potenzialmente, i primi virus derivanti da replicazione in cellule tumorali vengono rilasciati nel corso delle prime otto ore successive alla somministrazione; dopo le prime 48-72 ore le cellule infettate vengono distrutte. [4]

Diversi studi sono stati in grado di dimostrare come la delezione di diversi geni chiave (Tabella 1) abbia un impatto notevole sull'efficacia antitumorale di vettori virali basati su VACV, sulla loro sicurezza e sulla capacità di stimolazione della risposta immunitaria. [4]

**Tabella 1.**

Geni chiave implicati nella funzione del virus vaccinico oncolitico ed effetti della loro delezione.

<b>Nome del gene</b>	<b>Funzione della proteina corrispondente al gene</b>	<b>Funzione oncolitica ottenuta con delezione del gene</b>
<b>TK</b>	Enzima essenziale per la replicazione del DNA.	Aumento di sicurezza e selettività del trattamento.
<b>VGF</b>	Polipeptide con omologia di sequenza amminoacidica del fattore di crescita epidermico e TGF- $\alpha$ .	Aumento della sicurezza e attenuazione della virulenza.
<b>B18R</b>	Legame e rimozione di interferone di tipo I (IFN-1).	Aumento della sicurezza e della selettività IFN-dipendente.
<b>F1L</b>	Legame e inibizione del Nod-Like Receptor del tipo NLRP1 come inibitore dell'apoptosi.	Aumento di sicurezza e capacità oncolitica.
<b>N1L</b>	Inibizione dell'apoptosi e dell'attività di NF-kB.	Miglioramento della memoria di cellule T CD8 <sup>+</sup> e della risposta da parte di cellule NK.
<b>B2R</b>	cGAMP nucleasi virale specifica.	Aumento della fosforilazione di IRF3 e dell'espressione di IFN-1, miglioramento della risposta immunitaria antitumorale.
<b>E5R</b>	cGAS inhibitor	Induzione dell'aumento dei livelli di IFN-1 e miglioramento della risposta immunitaria antitumorale.

Tabella modificata da [Oncolytic *Vaccinia virus* and cancer immunotherapy - Xu L. , et al.]

## 4.2 Meccanismo *Vaccinia virus* oncolitico

Il virus vaccinico oncolitico utilizza tre meccanismi per agire nei confronti del tumore: lisi di cellule tumorali, distruzione dei vasi associati al tumore, attivazione del sistema immunitario. [4]

**Figura 2.**

Schema riassuntivo dei meccanismi d'azione di *Vaccinia virus* oncolitico.

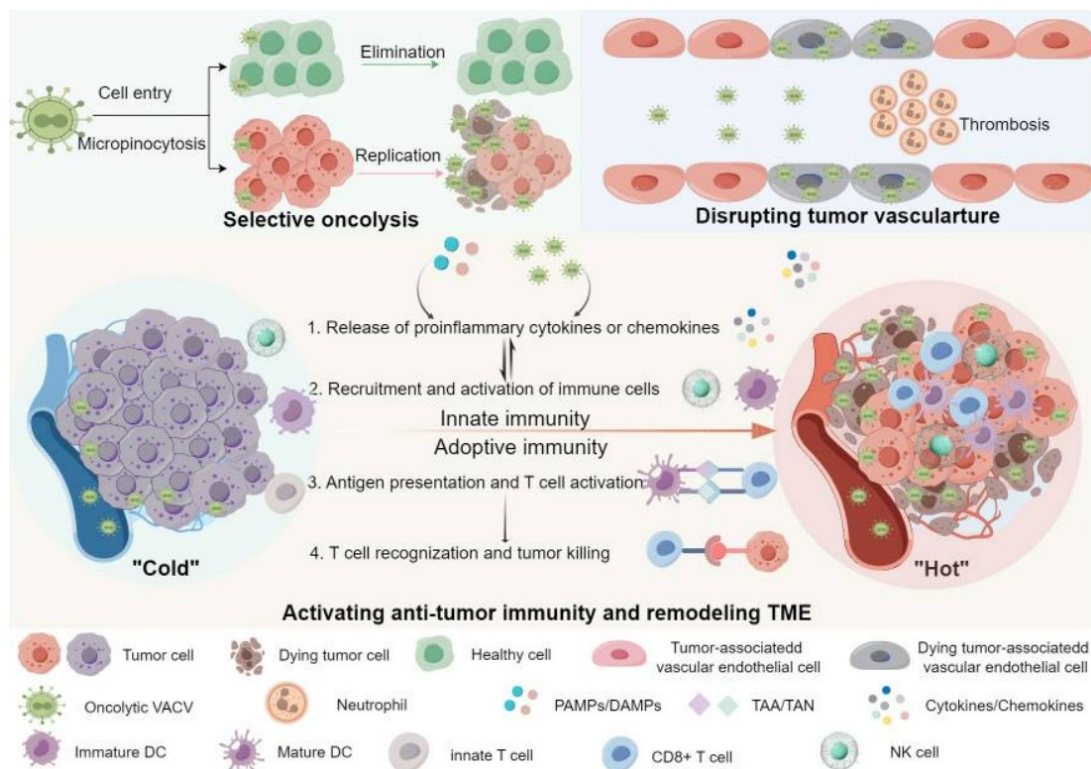


Immagine da [Oncolytic vaccinia virus and cancer immunotherapy - Xu L. , et al.]

- **Oncolisi di cellule tumorali**

Come già specificato, il virus vaccinico possiede un tropismo tumorale che può essere sfruttato a vantaggio della terapia. L'agente virale penetra nella cellula sfruttando un particolare processo di micropinocitosi recettore indipendente; le varie componenti virali (proteine, DNA) vengono prodotte nel citoplasma e il virus si replica. La progenie virale, rilasciata in seguito, sarà in grado di andare ad infettare cellule tumorali non ancora colpite dalla terapia proseguendo nell'attività oncolitica. [4]

VACV è un virus selettivo che riesce a distinguere in modo adeguato le cellule tumorali dalle cellule sane e ciò è dovuto alle differenze che intercorrono tra le due tipologie cellulari. La downregolazione di geni oncosoppressori, come p53, e di segnali antivirali, tra cui quello mediato da IFN-1, avviene in modo importante nelle sole cellule tumorali e ciò permette al virus di sopravvivere e moltiplicarsi con più facilità all'interno di esse, il tutto a vantaggio della selettività visto che nelle cellule sane questa regolazione negativa non è presente. [4]

Altro fattore da considerare è legato ai geni deleti nei virus utilizzati nella terapia (Tabella 1): tra loro si trova il gene TK ( timidina chinasi). Il gene della timidina chinasi è essenziale per la replicazione del DNA virale e viene over-espresso solo nella cellula tumorale e non nella cellula sana, il che significa che in quest'ultima l'agente virale non sarà in grado di replicarsi. [4]

- **Distruzione di vasi associati al tumore**

A livello della periferia della massa tumorale si trovano cellule endoteliali implicate nel processo di crescita tumorale e di metastasi. L'idea principale, in questo caso, è quella di “soffocare” il tumore privandolo di nutrienti andando ad agire proprio sulle cellule appena citate.

Ad esempio, il virus oncolitico JX-59 (deleto per gene TK) risulta in grado di raggiungere le cellule endoteliali associate alla massa tumorale e replicarsi in modo specifico all'interno di esse, ciò grazie ad un aumento della concentrazione del fattore di crescita VEGF mediato dall'over-espressione di timidina chinasi. [4]

Vi sono evidenze di come *Vaccinia virus* oncolitico sia coinvolto nell'accumulo di neutrofili, grazie al richiamo mediato da citochine e chemochine, nei vasi associati al tumore; questa particolare condizione è in grado di alterare il flusso ematico portando a trombosi e, di conseguenza, al collasso dei vasi stessi.

In seguito alla somministrazione endovenosa di VACV oncolitico non sono stati riscontrati segni di danno a vasi sanguigni sani. [4]

- **Attivazione del sistema immunitario contro il tumore**

Il virus vaccinico oncolitico è in grado di attivare il sistema immunitario (immunità innata e adattativa) e al tempo stesso di rimodellare il microambiente tumorale (tumor microenvironment, TME).<sup>[4]</sup>

Il microambiente tumorale è identificato come l'ambiente che circonda il tumore ed è caratterizzato dalla presenza di: cellule (come fibroblasti associati al tumore e cellule del sistema immunitario), matrice extracellulare e vasi sanguigni. Il TME è particolarmente rilevante visto l'impatto che esercita su: crescita tumorale, predisposizione a generare metastasi e risposta alle immunoterapie.<sup>[4]</sup>

Il tumor microenvironment risulta spesso immunosoppressivo attraverso due meccanismi: ignoranza immunitaria (immuno-ignorance) e tolleranza al sistema immunitario (immuno-tolerance).

Il rilascio di chemochine e citochine da parte del tumore ha un impatto sulla maturazione di cellule dendritiche (Dendritic Cells, DC), da cui deriva l'ignoranza immunitaria, e sul funzionamento di linfociti T helper di tipo 1 (Th1) e linfociti T citotossici.

La tolleranza al sistema immunitario deriva soprattutto dalla capacità delle cellule tumorali di attivare specifiche popolazioni cellulari implicate nell'immunosoppressione come linfociti T regolatori (Treg), macrofagi associati al tumore (TAMs), neutrofili associati al tumore e cellule soppressori di derivazione mieloide (MDSCs).<sup>[5]</sup>

**Figura 3.**

Meccanismi immunosoppressivi del TME.

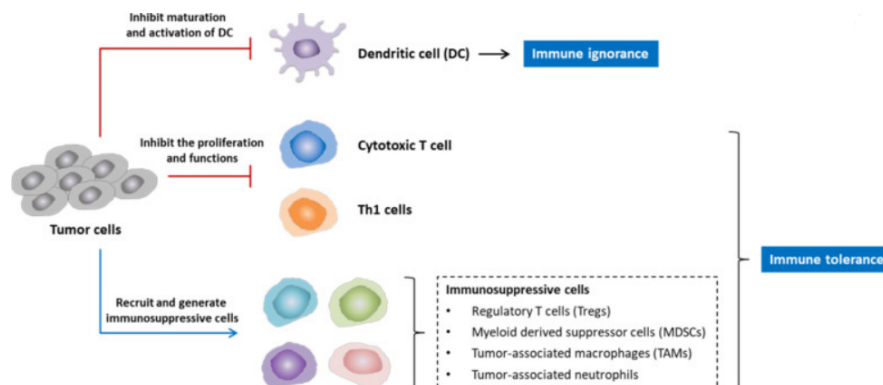


Immagine da [Oncolytic Vaccinia Virus in Lung Cancer Vaccines - Truong CS and Yoo SY]

Il virus vaccinico interviene infettando le cellule tumorali e promuovendo la presenza di PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) all'interno del TME. I recettori PRRs (Pattern Recognition Receptors) situati sulle cellule facenti parte dell'immunità innata andranno a percepire i PAMPs presenti e procederanno al rilascio di citochine e chemochine portando alla modifica del TME. In particolare, avviene l'attivazione di molteplici componenti cellulari, come cellule dendritiche (DCs), neutrofilo e macrofagi, che vengono stimolate a rispondere nei confronti delle cellule tumorali infette. Le citochine e chemochine rilasciate stimolano la risposta infiammatoria che, aumentando l'effetto dell'immunità innata, permette il passaggio da un microambiente tumorale "cold", quindi scarsamente popolato di cellule, ad un microambiente tumorale "hot", quindi ampiamente popolato di cellule. [4]

Altre evidenze portano a pensare che il virus vaccinico oncolitico sia in grado di appoggiare la morte cellulare mediata dall'immunità. Nello specifico, pare che tale virus promuova il rilascio di DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) come HMGB1 (high mobility group box 1) e ATP (segnale "find-me"); tali segnali sono in grado di stimolare la maturazione delle cellule dendritiche che saranno spinte a presentare antigeni specifici tumorali alle cellule T. Il fine è quello di attivare una risposta immunitaria adattativa in grado di mediare la morte delle cellule tumorali e, contemporaneamente, di sviluppare una memoria immunologica coinvolgente le cellule T della memoria che garantirà un effetto antitumorale a lungo termine. [4]

## 5. VACCINI ANTITUMORALI – CARCINOMA POLMONARE

### 5.1 Vaccini contro carcinoma polmonare

Il fatto che il numero di studi inerenti alle modalità di funzionamento del sistema immunitario e delle cellule tumorali sia cresciuto molto negli ultimi decenni sicuramente rappresenta un passo avanti importante nello sviluppo di una terapia alternativa ai classici trattamenti usati contro NSCLC che, come già in precedenza specificato, è il tipo di carcinoma polmonare più diffuso. Le ricerche che hanno preso in esame l'immunoterapia contro il carcinoma polmonare non a piccole cellule sono andate a concentrarsi su due strategie differenti: inibitori dei checkpoint immunitari (Immune Checkpoint Inhibitors, ICIs) e vaccini antitumorali. [5]

In pazienti affetti da una forma di NSCLC, in stadio avanzato o con metastasi, sicuramente la terapia basata sul trattamento con inibitori di checkpoint immunitari ha rappresentato un'opzione rilevante. Tuttavia, la maggior parte dei pazienti andava incontro a refrattarietà del tumore in seguito al primo ciclo di terapia e la risposta al trattamento andava a ridursi ulteriormente (<20%) nel secondo e terzo ciclo. [5]

Lo sviluppo di vaccini contro il cancro rappresenta l'innovazione nell'immunoterapia e i risultati del loro utilizzo sono incoraggianti; efficacia e sicurezza sono state testate in numerosi trials clinici arrivati allo sviluppo di fase I e fase II, mentre i dati delle fasi successive non sono stati riportati. Nonostante i risultati promettenti, i vaccini di questa tipologia devono essere ancora perfezionati per riuscire a sviluppare una giusta formulazione di adiuvanti e sostanze attive al loro interno. [5]

I virus oncolitici potrebbero rappresentare un'ottima risorsa che può essere sfruttata anche nell'ambito della sintesi di vaccini antitumorali. Il trattamento con virus oncolitici possiede una selettività ottimale verso le cellule target; non solo, tale terapia può essere combinata ad altre immunoterapie, come ICIs, per migliorarne la reazione contro il carcinoma. *Vaccinia virus* rappresenta la novità e viene utilizzato nell'ambito della ricerca allo scopo di sviluppare un agente terapeutico contro NSCLC in grado di generare una risposta immunitaria antitumorale forte e duratura. [5]

## 5.2 Meccanismo d'azione dei vaccini antitumorali

I vaccini antitumorali hanno lo scopo di scatenare la risposta immunitaria nei confronti della massa tumorale trattata e possono essere utilizzati sia a scopo preventivo che terapeutico.

In seguito alla somministrazione del vaccino, all'interno dell'organismo viene stimolata la presentazione di antigeni associati al tumore (Tumor Associated Antigens, TAAs) da parte delle cellule APC. A questo punto, la reazione immunitaria procede sfociando nell'attivazione di linfociti T di tipo CD8-citotossici e linfociti T di tipo CD4-helper. I linfociti CD8+ procederanno all'eliminazione di cellule tumorali inducendone l'apoptosi. I linfociti CD4+ andranno a migliorare la risposta cellulo-mediata attraverso la secrezione di citochine apposite, promuoveranno l'attività citotossica di cellule NK (Natural Killer), miglioreranno l'attività fagocitica mediata da macrofagi e andranno a sostenere l'attività di linfociti B in grado di sviluppare anticorpi diretti contro il tumore. Grazie a questa serie di eventi, si ottengono due risposte immunitarie contestuali: una cellulo-mediata e una umorale. [5]

**Figura 4.**

Schema riassuntivo del meccanismo d'azione dei vaccini antitumorali.

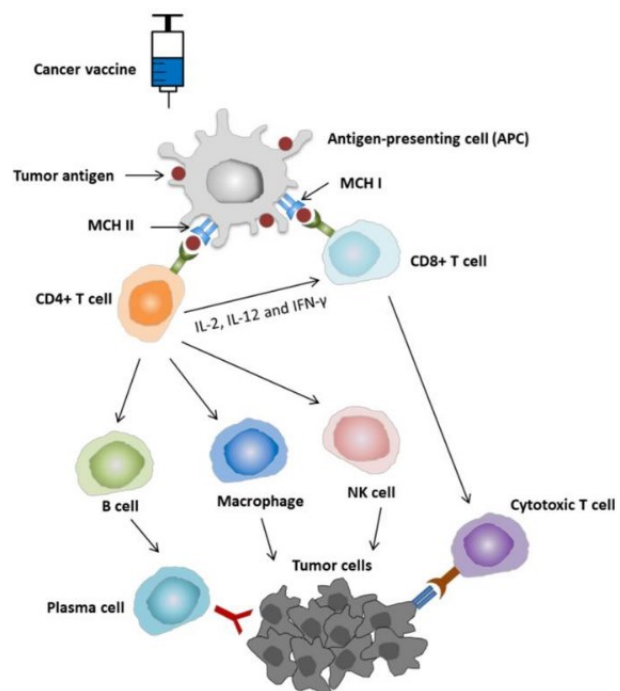


Immagine da [Oncolytic Vaccinia Virus in Lung Cancer Vaccines - Truong CS and Yoo SY]



### **5.3 Vaccini contro carcinoma polmonare non a piccole cellule e *Vaccinia virus***

Un vaccino antitumorale efficace dovrebbe essere in grado di sviluppare un'adeguata risposta in entrambe le tipologie di linfociti T (CD8+ e CD4+); tuttavia, molto spesso gli antigeni associati a tumore non sono del tutto efficienti nella stimolazione in quanto poco immunogenici. Alla luce di queste considerazioni, nel caso dei vaccini antitumorali la formulazione gioca un ruolo fondamentale e la scelta dei giusti adiuvanti può rappresentare il fattore che farà pendere l'ago della bilancia verso il successo terapeutico, anziché verso il fallimento.

Un altro importante fattore da considerare è l'età in cui si arriva ad una diagnosi nel paziente. Il carcinoma polmonare, infatti, viene talvolta diagnosticato in fasi avanzate, ovvero quando il sistema immunitario sta andando incontro ad un fisiologico declino; in questi casi, la scelta degli adiuvanti idonei risulta ancora più decisiva. [5]

Studi recenti si sono andati a concentrare su un aspetto innovativo nella sintesi di vaccini antitumorali: uso di cellule tumorali derivate da cellule somatiche riprogrammate e infettate da virus (virus-infected reprogrammed somatic cell-derived tumor-cell vaccination – VIREST).

La tecnica VIREST può essere utilizzata per sviluppare un tipo di vaccinazione personalizzata, applicabile sia a scopo preventivo che terapeutico, basata sull'utilizzo di cellule tumorali polmonari derivate da cellule staminali pluripotenti indotte (induced Pluripotent Stem-Cells, iPSCs). Il progetto si sviluppa a partire da cellule staminali sane che, in vitro, vengono modificate allo scopo di dare origine a progenitori di cellule polmonari. Intervenendo a livello genomico, tali cellule si ottengono saranno spinte a presentare sulla loro superficie antigeni tumorali che andranno a mimare la situazione delle cellule caratterizzanti il carcinoma diventando, a tutti gli effetti, sovrapponibili a cellule tumorali, almeno a livello antigenico.

A questo punto si potrà procedere con la messa a punto del vaccino. Lo sviluppo inizia dall'infezione di queste “cellule tumorali indotte” con un virus oncolitico, in genere *Adenovirus* o *Vaccinia virus*, che andrà a ricoprire il ruolo di adiuvante; le “cellule tumorali indotte” infettate potranno ora essere iniettate. [6]

La tecnica VIREST è stata testata su modelli murini e ha restituito dati significativi ed incoraggianti. Sembra che utilizzare la pre-infezione delle cellule iniettate permetta di migliorare la formulazione vaccinale rendendola maggiormente efficace.

Recentemente è nata un' ulteriore strategia che si va a basare su un trattamento sequenziale delle “cellule tumorali indotte” prima con *Adenovirus* e, solo successivamente, con *Vaccinia virus*; in questo caso, l'efficacia antitumorale sembra essere ancora più presente (trattamento su animali, confronto con vaccini basati su virus da solo).<sup>[5]</sup>

#### **5.4 Effetti avversi nel trattamento antitumorale con *Vaccinia virus***

Gli effetti avversi derivati dall'utilizzo di *Vaccinia virus* in terapia sono piuttosto rari, considerandone anche il notevole impiego; diversi studi hanno dimostrato che l'agente è ben tollerato dal soggetto trattato.

Si sono registrati casi di reazioni avverse corrispondenti a necrosi, encefaliti ed eczema ma con un'incidenza veramente molto bassa (~ 0.1%). Le reazioni più significative sono state riscontrate in caso di utilizzo di vie di inoculazione differenti dalla classica iniezione, ad esempio via subcutanea, intramuscolare o intratumorale. In ogni caso, la tossicità si manifesta solo con trattamento ad alte dosi.<sup>[5]</sup>

Studio esempio: trial clinico per *Vaccinia virus* modificato GL-ONC1.

La fase I del trial è stata pianificata allo scopo di testare la sicurezza del virus in esame quando inoculato per via endovenosa in pazienti affetti ad uno stadio avanzato di cancro alla parte superiore del corpo (testa, collo). In 19 dei pazienti considerati vennero riscontrati sintomi quali febbre e reazioni di ipersensibilità di grado I e II; inoltre, ulteriori 6 pazienti sperimentarono reazioni avverse riconducibili a reazioni di ipersensibilità di grado III con sintomi quali nausea, vomito e ipotensione. Non sono state riscontrate reazioni di ipersensibilità di tipo IV (eccezione di un soggetto diabetico colpito da ipoglicemia riconducibile a reazione avversa da ipersensibilità di tipo IV).<sup>[5]</sup>

## 6. CONCLUSIONE

Nell'ambito del trattamento antitumorale molte sono le sfide che spesso si devono affrontare; ad esempio, il fatto che la massa tumorale presenti anche un microambiente in grado di circondarla, proteggerla e promuoverne lo sviluppo rappresenta un problema importante che deve essere affrontato tenendo conto di molteplici variabili.

La storia ci ha insegnato che l'utilizzo dei virus come agenti terapeutici/preventivi può rivelarsi una valida risorsa (capitolo 3: vaccinazione contro il vaiolo).

I vantaggi derivati dall'uso di virus oncolitici sono stati messi in luce da una numerosa serie di trials (nel 2017 i trials clinici in corso erano 340, mentre gli agenti coinvolti negli studi preclinici raggiungeva quota 260<sup>[5]</sup>). *Vaccinia virus* sembra adatto all'induzione di una forte risposta del sistema immunitario mediata da cellule T.

L'utilizzo di vaccini terapeutici è sicuramente un'arma utile nel trattamento del cancro; tuttavia, il loro utilizzo è ancora limitato visto il loro lento meccanismo d'azione. Il professor Michele Maio (direttore del Centro di Immuno-Oncologia presso l'ospedale Policlinico S. Maria alle Scotte di Siena e presidente di Fondazione NIBIT) sostiene che per ottenere un primo effetto occorrono alcuni mesi; le persone che possono trarne maggior beneficio risultano, pertanto, coloro che hanno già subito un'asportazione chirurgica della massa tumorale. In ogni caso, risulta ancora necessario ricorrere ad una combinazione di strategie per riuscire a colpire in modo quanto più efficiente e preciso possibile il tumore.<sup>[7]</sup>

La ricerca si muove continuamente e non è difficile immaginare che presto queste nuove strategie saranno sempre più di uso comune.



## Bibliografia

1. The emerging field of oncolytic virus-based cancer immunotherapy  
[Ma R. , et al.]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9877109/>
2. Tumore del polmone  
[Agenzia Zoe]  
<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-al-polmone>
3. Vaccinia Virus: from crude Smallpox vaccines to elaborate viral vector vaccine design  
[Kaynarcalidan O. , et al]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8698642/>
4. Oncolytic vaccinia virus and cancer immunotherapy  
[Xu L. , et al]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10811104/>
5. Oncolytic Vaccinia Virus in Lung Cancer Vaccines  
[Truong CS and Yoo SY]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8875327/>
6. Treatment and Prevention of lung Cancer Using a Virus-Infected Reprogrammed Somatic Cell-Derived Tumor Cell Vaccination (VIReST) Regime  
[Zhang Z. , et al]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7438408/>
7. Fondazione Veronesi - Vaccini anticancro: cosa sono? A cosa servono?  
[Banfi Daniele]  
<https://www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/oncologia/vaccini-anti-cancro-cosa-sono-a-cosa-servono>



## RINGRAZIAMENTI

Laurearmi è sempre stato il mio sogno ed ora che l'ho, letteralmente, coronato, mi sento di ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutata ad arrivare fino a qui.

Mamma, ti ringrazio per la pazienza durante le sessioni d'esame, per tutti i pranzi che mi hai preparato, per avermi scaldato la cena quando finivo di allenarmi la sera tardi, per avermi accompagnata a prendere un'infinità di treni.

Papà, grazie per avermi dato l'opportunità di studiare concentrandomi sull'università; è una fortuna che, purtroppo, non tutti hanno.

Grazie nonno, mi hai insegnato a giocare a briscola e hai sopportato le mie marachelle. Nonostante io sia cresciuta, so che resterò sempre la tua bimba.

Spero che voi, la mia famiglia, siate fieri di vedermi oggi per quella che sono. Non sono perfetta, non lo sono mai stata, ma questa mia soddisfazione di oggi è anche per voi. Vi voglio bene.

Grazie a Sara, la mia sorellona e compagna di vita. Ti ho sempre detto che per me sei stata e continui ad essere come una seconda mamma. Ti ringrazio per essere stata la mia confidente e per avermi spinta a tentare anche quando non ero convinta di quali potessero essere i risultati. Un giorno mi hai detto che dovevo guardarmi indietro, vedere quanta strada avevo fatto ed esserne fiera; mi hai detto anche che ero stata coraggiosa per aver scelto di fare qualcosa di così grande senza alcun riferimento e che tu non ne saresti stata in grado. La verità è che, se sono quello che sono, lo devo anche a te. Sì, è vero, abbiamo fatto scelte diverse, ma ciò non significa che il mio percorso valga meno del tuo. Sento di doverti dire che sono fiera di te e che non ti devi sottovalutare mai, perché sei forte e puoi fare qualunque cosa. Oggi e per sempre, ti voglio bene.

Grazie a Federico, mi hai conosciuta che ero piccola e mi hai vista crescere e cambiare poco alla volta fino ad oggi, come un fratello. Ho perso il conto delle pizze mangiate in compagnia, dei film visti insieme, del numero di feste condivise negli anni. Sei entrato a far parte della mia famiglia e sono davvero contenta di questo.

Grazie a Gaia, mia collega fidata. Abbiamo condiviso questi tre anni di studio lamentandoci, aspettando treni spesso in ritardo, affrontando la tempesta e il caldo afoso. Ci siamo sempre aiutate nel momento del bisogno (anche al sushi) e ti ringrazierò sempre per questo e per aver alleggerito le mie giornate. Sei la mia compagna di laboratorio di fiducia.

Ringrazio i miei amici, quelli che ci sono da più tempo e quelli che sono entrati nella mia vita di recente. Ricorderò sempre i pomeriggi di distrazione ai Comics, le serate passate a bere qualcosa e a ridere, le giornate al mare o in qualsiasi altro posto, gli aperitivi e tutte le volte in cui: “ma... un gelatino?” Per queste, e per molte altre cose, grazie di cuore.

Ringrazio chiunque abbia creduto in me, chi mi ha accolto nella sua vita a braccia aperte. Non do mai per scontato ciò che una persona fa per me, per questo sarò sempre grata anche del più piccolo pensiero a me dedicato.

Ringrazio Cinzia per le ottime ricette che, grazie a lei, ho potuto aggiungere alla mia collezione, Federico per le melodie che mi ha fatto ascoltare con la sua pianola (e per aver tentato di spiegarmi come funziona il tennis, anche se ancora non ho capito, mi spiace), Michele per consigliarmi sempre qualcosa di nuovo da guardare, le famose “lezioni di vita” (anche se ci metto sempre un po’ a seguire i vari consigli), e Monica per quella volta in cui mi ha detto che sono “di famiglia” rendendomi davvero felice.

Poi ringrazio Francesco, il ragazzo speciale che mi ha tenuto la mano per cinque anni. Avere un luogo dove rifugiarsi quando si è tristi, ma anche felici o semplicemente stanchi penso sia una grande ricchezza: per me, quel luogo sei tu. Ti ho sempre detto che tu credi in me più di quanto io creda in me stessa e lo confermo, dato che prima di ogni sessione d’esame ti chiedevo se, secondo te, ce l’avrei fatta e tu mi rispondevi sempre di sì. Avevi ragione, alla fine ce l’ho fatta (ricorda questo momento, non ti do ragione tutti i giorni). Ci sarebbero tante cose per cui vorrei ringraziarti, tante cose che vorrei dirti, ma lascerò che il tempo le faccia venire alla luce poco per volta, sotto forma di parole o di gesti, perché sia io che te sappiamo quanto sia importante anche semplicemente esserci. Per ciò che mi hai dato e fatto provare in questi anni, ti Amo.



L'ultimo ringraziamento, a costo di sembrare estremamente egocentrica, va a me stessa. In alcune occasioni penso sarebbe bello andare a incontrare la me del primo anno, quella ragazza che aveva fallito il suo primo esame e che si è ritrovata da sola nel parco affianco all'università, delusa in un modo che non sarebbe mai stata in grado di descrivere. Se davvero potessi andare a trovarla le darei un bacio sulla fronte e le direi di non temere, che ce la farà. Poi ci ripenso e credo che, invece, non lo farei, perché senza quella delusione non avrei trovato in me la forza di farcela da sola e quella Lisa non sarebbe mai diventata la ragazza che sono.

Oggi più che mai: Io credo in me.