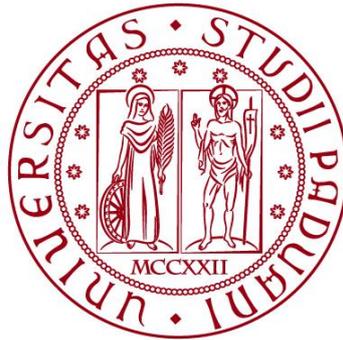


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**VACCINI TERAPEUTICI CONTRO IL CANCRO: LA NUOVA
FRONTIERA DEI VACCINI A mRNA**

**Tutor: Dott.ssa Regina Tavano
Dipartimento di Scienze Biomediche**

Laureanda: Linda Simioni

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

ABSTRACT	2
1. INTRODUZIONE	3
1.1 Vaccini preventivi e terapeutici	3
1.2 Il ruolo dei vaccini contro il COVID	3
2. VACCINI TERAPEUTICI CONTRO IL CANCRO	5
2.1 Gli antigeni tumorali usati nella vaccinazione	6
2.2 Le barriere biologiche che limitano l'efficacia del vaccino	9
2.3 Le piattaforme vaccinali	9
3. VACCINI A mRNA CONTRO IL CANCRO	12
3.1 La struttura di mRNA: differenze tra mRNA convenzionale e saRNA	12
3.2 Vantaggi, limitazioni e ottimizzazione dell'mRNA	13
3.3 Tipologie e metodi di delivery dei vaccini a mRNA	15
3.3.1 Vaccini a base di mRNA non formulati	15
3.3.2 Vaccini a base di mRNA formulati	15
3.3.3 Vaccini a mRNA a base di DC	17
4. L'IMPORTANZA DI UNA TERAPIA COMBINATA	20
5. CONCLUSIONI	21
BIBLIOGRAFIA	22

ABSTRACT

In seguito alla pandemia di COVID-19 le ricerche sui vaccini a mRNA hanno subito un forte incremento, rendendo questi vaccini una promettente alternativa per l'immunoterapia contro il cancro. A differenza dei vaccini profilattici che si limitano a prevenire il tumore, i vaccini terapeutici stabiliscono una duratura risposta antitumorale e provocano la regressione del tumore.

In questo lavoro di tesi si affronterà inizialmente il tema dei vaccini terapeutici, discutendo in particolare la scelta degli antigeni tumorali impiegati nella vaccinazione in base alla qualità e al tipo di antigene, i vari metodi di somministrazione di questi antigeni e i fattori che interferiscono con l'efficacia del vaccino; in seguito, verranno approfondite le diverse tipologie di vaccini a mRNA per la cura del cancro e saranno descritti i vantaggi e gli svantaggi di questa tecnologia innovativa.

Nonostante la grande versatilità della molecola di mRNA, la vaccinazione può non risultare totalmente efficace in alcuni pazienti, perciò la combinazione con altre immunoterapie rappresenta la direzione per le future ricerche in ambito oncologico.

1. INTRODUZIONE

A partire dal 1796, data della nascita del primo vaccino, la vaccinazione ha migliorato l'aspettativa di vita delle persone diventando la cura per molte infezioni letali. Malattie come vaiolo, poliomielite, difterite, pertosse, tetano e altre sono state eradiccate o sono mantenute sotto controllo grazie alla somministrazione di questi vaccini alla maggior parte della popolazione mondiale; tuttavia, non sono ancora stati sviluppati vaccini per diverse malattie gravi causate da patogeni come HIV, citomegalovirus, virus Herpes simplex o Epstein-Barr virus. La creazione di un vaccino non è immediata, richiede anni di studi e ricerche e spesso le conoscenze attuali non sono sufficienti (Li et al., 2023; Tian et al., 2022).

1.1 Vaccini preventivi e terapeutici

Esistono due categorie di vaccini: quelli preventivi e quelli terapeutici.

I vaccini preventivi o profilattici vengono normalmente somministrati ad individui sani e prevengono le malattie mediante l'iniezione di un antigene che scatena una risposta immunitaria specifica; alcuni di questi (come i vaccini contro HPV o HBV) prevengono la comparsa del tumore (Li et al., 2023). Per quanto possano essere efficaci e di successo, i vaccini profilattici non garantiscono l'immunità contro quei microrganismi in grado di instaurare infezioni persistenti (Tian et al., 2022).

I vaccini terapeutici, invece, vengono somministrati a coloro che già presentano la malattia e hanno il ruolo di migliorare la risposta immunitaria specifica da parte del corpo stesso e stabilizzare la malattia. Infatti, i vaccini terapeutici si focalizzano sul trattamento della malattia piuttosto che sulla sua prevenzione (Li et al., 2023).

Un'altra differenza che emerge tra vaccini preventivi e vaccini terapeutici è la percezione della cura da parte degli individui. Infatti, le persone a cui viene somministrato un vaccino profilattico sono meno inclini ad accettare eventuali effetti collaterali in quanto soggetti sani, al contrario di chi è già malato e si sottopone ai vaccini terapeutici (Li et al., 2023).

1.2 Il ruolo dei vaccini contro il COVID

La scoperta dell'mRNA nel 1961 aprì nuove strade alla ricerca scientifica sulle possibili applicazioni di questa molecola ma, per un periodo abbastanza lungo, si è ritenuto che fosse troppo fragile da manipolare. Nel corso degli anni '80 e '90 si eseguirono i primi esperimenti di veicolazione dell'mRNA nelle cellule e nei tessuti per l'espressione di proteine specifiche, ma la svolta si ebbe con lo sviluppo dei vaccini a base di mRNA durante la

pandemia di COVID-19 (Sayour et al., 2024). I vaccini contro SARS-CoV-2 hanno ricevuto l'autorizzazione ad essere commercializzati e somministrati in tutto il mondo in meno di un anno dall'inizio della pandemia grazie alla loro rapida produzione ed elevata sicurezza ed efficacia nella prevenzione del virus (Beck et al., 2021); gli studiosi si sono spinti oltre l'uso di questi vaccini nelle malattie infettive per trovare e sviluppare delle nuove immunoterapie contro i tumori, portando alla nascita dei vaccini terapeutici a mRNA (Miao et al., 2021).

Nei prossimi capitoli si affronterà il tema dei vaccini terapeutici contro il cancro. In particolare, nel capitolo 2 si tratterà degli antigeni tumorali normalmente impiegati nella vaccinazione, dei meccanismi che impediscono o diminuiscono l'efficacia del vaccino e delle piattaforme vaccinali per la somministrazione; in seguito, il capitolo 3 sarà completamente incentrato sulla nuova tecnologia dei vaccini a mRNA descrivendo la struttura degli mRNA utilizzati, i vantaggi e gli svantaggi di questa tecnologia e di come questi limiti possono essere superati ottimizzando il trascritto, le varie tipologie di vaccino e i metodi di somministrazione. Infine, nel capitolo 4 si accennerà all'importanza di combinare più terapie per ottenere risultati ottimali nella cura dei tumori.

2. VACCINI TERAPEUTICI CONTRO IL CANCRO

I vaccini terapeutici contro il cancro sono stati creati dai ricercatori con l'obiettivo di attivare una risposta immunitaria specifica stimolando il sistema immunitario del paziente attraverso l'uso di antigeni tumorali, in modo da scatenare una risposta antitumorale in grado di indurre la regressione ed eliminare il tumore (Bidram et al., 2021).

Affinché la terapia abbia successo, è fondamentale che vengano somministrate grandi quantità di antigeni di qualità assieme agli adiuvanti (sostanze che potenziano la risposta immunitaria contro l'antigene) provocando un'inflammatione locale che richiama particolari cellule presentanti l'antigene (APC), in particolare le cellule dendritiche (DC); in seguito alla loro maturazione e attivazione, queste cellule catturano, internalizzano, processano e presentano sulle molecole MHC gli antigeni tumorali forniti dal vaccino e successivamente migrano negli organi linfoidi secondari dove inducono l'attivazione dei linfociti T naïve CD4⁺ e CD8⁺. I linfociti T attivati escono dai linfonodi e raggiungono il tumore dove svolgono la loro attività citotossica contro le cellule tumorali (Saxena et al., 2021; Tian et al., 2022).

Nonostante la minuziosa attenzione nello sviluppo di questi vaccini, sono ancora numerose le sfide da affrontare. Spesso le APC reclutate dopo la somministrazione del vaccino presentano capacità di assorbimento variabili e marginali; inoltre, il loro processamento antigenico potrebbe essere difettoso e/o subottimale. Le cellule T devono riuscire a penetrare e a infiltrarsi nel microambiente tumorale o TME che è costituito non solo da cellule tumorali ma anche da cellule mesenchimali stromali e cellule immunitarie regolatorie che possono sopprimere l'attività citotossica dei linfociti T. Infine, il microambiente del paziente può essere immunosoppressivo, interferendo con la corretta attività delle DC (Sayour et al., 2024).

Nelle prime fasi della ricerca sui vaccini terapeutici la terapia aveva lo scopo di rifornire il paziente di cellule T reattive contro il tumore; con la produzione di Sipuleucel-T, il primo vaccino terapeutico contro il tumore alla prostata approvato dalla FDA nel 2010, non erano state considerate alcune variabili importanti come il meccanismo della soppressione immunitaria e l'eterogeneità altamente complessa del TME che causano quantità inadeguate di linfociti T, risposte immunitarie non durature e il fallimento della migrazione nel TME da parte delle cellule T (Tian et al., 2022).

2.1 Gli antigeni tumorali usati nella vaccinazione

Il successo dei vaccini terapeutici dipende dalla qualità degli antigeni somministrati; tuttavia, anche la scelta del tipo di antigene è determinante. Secondo Tian e coautori (Tian et al., 2022) l'antigene ideale dovrebbe essere presente sulla superficie di tutte le cellule tumorali e dovrebbe essere altamente immunogenico.

I primi antigeni ad essere stati utilizzati sono stati gli antigeni associati al tumore o TAA che possono essere molecole "self" espresse normalmente dalle cellule tumorali come gli antigeni di differenziazione, antigeni sovraespressi e quelli del cancro-testicolo, oppure molecole "non-self" di origine virale come le proteine di HPV ad alto rischio o di EBV. (Saxena et al., 2021; Tian et al., 2022). I vaccini a base di TAA sono più efficaci se associati ad una terapia combinata e sembrano essere più adatti per coloro che sono caratterizzati da un basso carico mutazionale del tumore (TMB), cioè da un basso numero di mutazioni per megabase nel tessuto tumorale (Saxena et al., 2021). Nonostante ciò, sono stati riscontrati diversi ostacoli nell'uso di questi antigeni tumorali tra cui l'identificazione di un numero limitato di TAA per alcuni tumori solidi, la loro elevata variabilità e la presenza di questi antigeni anche nei tessuti non tumorali (Miao et al., 2021). Queste problematiche portano ad una insufficiente e poco efficace risposta immunitaria antitumorale, riducendo la validità del vaccino (Tian et al., 2022).

Recentemente, alla luce delle difficoltà descritte sopra, l'attenzione si è spostata sugli antigeni tumorali specifici o TSA, detti anche neoantigeni. Queste molecole non sono presenti nelle cellule normali, ma vengono espresse da cellule tumorali e derivano da mutazioni somatiche casuali nel genoma della cellula. I ricercatori presumono che un alto TMB possa quasi certamente corrispondere ad un elevato numero di neoantigeni anche se non ci sono studi che lo confermano (Saxena et al., 2021).

I neoantigeni hanno la capacità di suscitare una risposta contro il TME da parte dei linfociti T helper e/o dei linfociti T citotossici, anche se ad oggi gli studi dimostrano che solo un sottoinsieme di questi TSA è in grado di fare ciò.

Prima di procedere con la creazione del vaccino, è necessario identificare le mutazioni somatiche specifiche del paziente attraverso una biopsia del tessuto tumorale che viene sottoposta a sequenziamento dell'esoma completo, dell'RNA o del trascrittoma; inoltre, queste mutazioni non sinonime possono essere individuate anche confrontando le sequenze del tessuto tumorale con quelle del tessuto sano. Infine, vengono analizzate e

selezionate le mutazioni con una maggiore immunogenicità (Miao et al., 2021).

La qualità di un neoantigene, ossia la capacità di indurre una risposta immunitaria antitumorale da parte dei linfociti T, dipende da diversi fattori [figura 1] come l' "estranità" (quanto la molecola mutata è diversa da quella *wild-type*; derivando da mutazioni, l'antigene viene riconosciuto come non-self e quindi non è ignorato dal sistema immunitario), la distribuzione clonale (come sono distribuiti i neoantigeni tra i vari sottoclone del tumore: le mutazioni clonali sono presenti in tutti i neoantigeni del TME, le mutazioni subclonali sono specifiche per i neoantigeni di ogni clone), lo stato della mutazione (*driver*, più conservate, stabili e fondamentali per la sopravvivenza del tumore, o *passenger*, meno permanenti), la capacità di essere processato e presentato su MHC di classe I e II con alta affinità e, infine, l'affinità con il recettore delle cellule T (TCR) (Saxena et al., 2021).

Per migliorare l'efficacia della vaccinazione a base di neoantigeni alcuni studi suggeriscono la combinazione con gli inibitori dei checkpoint immunitari o ICI, ovvero farmaci che bloccano l'azione di molecole che regolano i processi chiave della risposta immunitaria; gli ICI più comunemente impiegati nella terapia combinata sono quelli contro PD1, PDL1 e CTLA-4 (Saxena et al., 2021).

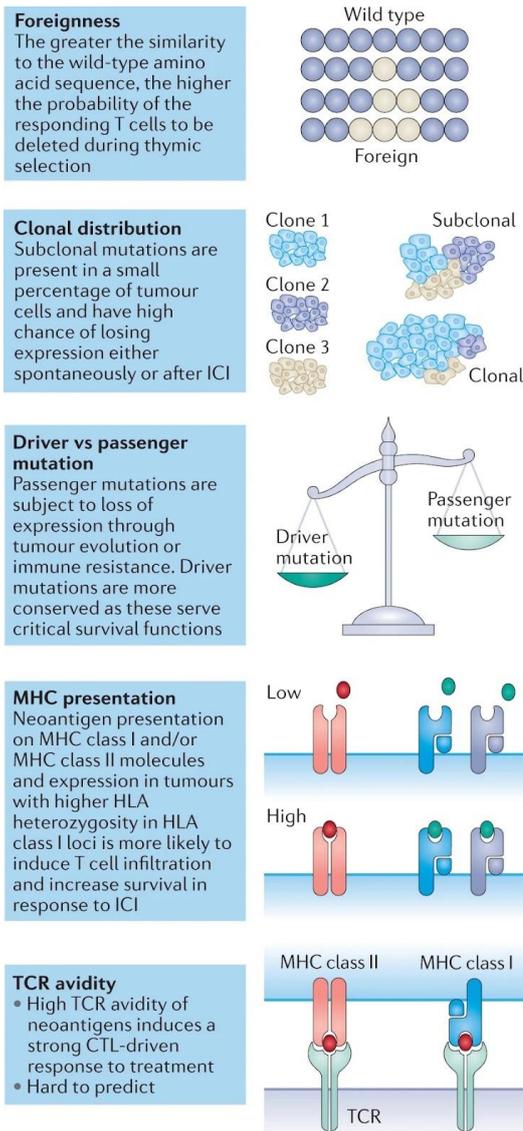


Figura 1: La qualità dei neoantigeni dipende da diverse caratteristiche: 1) 'foreignness' o 'estraneità', ovvero la misura di quanto si discosta il nuovo antigene rispetto a quello *wild-type*; 2) distribuzione clonale — le mutazioni clonali portano all'espressione di neoantigeni e correlano con una risposta positiva all'inibizione dei checkpoint immunitari, invece, le mutazioni subclonali sono più inclini a perdere l'espressione dei loro neoantigeni sotto la pressione selettiva degli ICI; 3) lo stato *driver* della mutazione, poiché le mutazioni *driver*, rispetto a quelle *passenger*, sono più stabili e meno propense ad altre modifiche che potrebbero far perdere la funzione; 4) la capacità del neoantigene di essere processato nel modo giusto e presentato su MHC di classe I e II con alta affinità di legame ed espressione; 5) la forza di legame tra TCR e l'antigene presentato su MHC (Saxena et al., 2021).

Malgrado i grandi successi, i vaccini basati su neoantigeni presentano degli ostacoli in quanto la loro produzione richiede risorse elevate e sono inefficaci contro i nuovi epitopi tumorali. Per superare queste difficoltà, sono state progettate delle nuove molecole, dette immunostimolanti somministrati *in situ* o ISV, che non sono specifiche per ogni mutazione somatica del tumore e stimolano i recettori di riconoscimento del pattern immunitario innato (PRR) per attivare le cellule immunitarie *in situ*, inducono

la morte cellulare immunogenica, migliorano la presentazione antigenica e attivano le cellule della memoria (Saxena et al., 2021).

2.2 Le barriere biologiche che limitano l'efficacia del vaccino

Non sempre la somministrazione del vaccino porta alle risposte immunitarie antitumorali attese; talvolta possono manifestarsi delle resistenze all'immunoterapia che favoriscono la "fuga" immunitaria. Se la resistenza si presenta come una mancanza di risposta diretta alla terapia si parla di resistenza primaria, invece quando si sviluppa in seguito ad una risposta iniziale alla terapia è resistenza secondaria; spesso, gli stessi fattori che causano la resistenza primaria possono determinare l'insorgenza di quella secondaria.

Le cause della resistenza possono essere raggruppate in meccanismi intrinseci (dovuti alle caratteristiche della cellula tumorale) e meccanismi estrinseci (dovuti all'azione di cellule immunitarie del TME). È risaputo, ormai, come il microambiente tumorale sia un sistema complesso, composto da cellule tumorali e da altre componenti che vanno a costituire lo stroma tumorale tra cui la matrice extracellulare, le cellule immunitarie (come i macrofagi associati al tumore (TAM), i linfociti T e le cellule NK), i fibroblasti associati al cancro e le cellule mesenchimali stromali.

La resistenza "intrinseca" deriva da fattori come la down-regolazione o non espressione dell'antigene tumorale, la scorretta elaborazione dell'antigene, la mancata espressione di HLA e tutto ciò che impedisce il riconoscimento delle cellule tumorali da parte dei linfociti T.

La resistenza "estrinseca" è dovuta, invece, da un accumulo locale e sistemico di cellule immunosoppressive quali cellule T regolatorie (Treg), TAM, fibroblasti associati al cancro o CAF, cellule soppressorie di derivazione mieloide o MDSC e neutrofili pro-tumorali; tutte queste cellule interferiscono con l'attivazione, la proliferazione e l'attività dei linfociti T e la produzione di citochine e specie reattive dell'ossigeno, convertono le cellule immunitarie presenti nel TME nel fenotipo pro-tumorigenico e sopprimono l'attività delle cellule dendritiche. Inoltre, nello specifico dei CAF, interferiscono con l'efficacia del vaccino modificando la matrice extracellulare, rendendola più densa per impedire l'infiltrazione e la migrazione delle cellule immunitarie (Saxena et al., 2021).

2.3 Le piattaforme vaccinali

La somministrazione dell'antigene può avvenire in modo diretto per via endovenosa, intramuscolare, sottocutanea o intranodale assieme ai corretti

adiuvanti che favoriscono l'attivazione delle cellule immunitarie locali e il richiamo delle DC.

A questo scopo sono state sviluppate delle piattaforme di somministrazione che includono vaccini a base di DNA, RNA e peptidi lunghi sintetici (SLP) [figura 2].

Nel primo caso sono richieste trascrizione e traduzione della molecola prima che avvenga la cross-presentazione da parte delle DC e si ha una migliore efficacia quando il DNA viene somministrato ad alte dosi per via intramuscolare in combinazione con l'elettroporazione.

Per i vaccini a RNA, invece, il numero di passaggi prima della cross-presentazione diminuisce in quanto non è prevista la trascrizione e vengono normalmente iniettati per via endovenosa tramite nanoparticelle lipoplex o LPX, ossia dei complessi costituiti da liposomi cationici che si autoassemblano attorno al trascritto mediante interazioni elettrostatiche (Bidram et al., 2021); queste strutture migliorano l'assimilazione da parte delle DC. Inoltre, le molecole a RNA sono più facili da produrre e hanno adjuvanti incorporati.

Infine, i peptidi lunghi sintetici o SLP (da 25 a 35 amminoacidi) hanno il vantaggio di non richiedere trascrizione e traduzione e di essere processati e presentati nelle MHC di DC solo nei linfonodi che drenano il vaccino (Saxena et al., 2021).

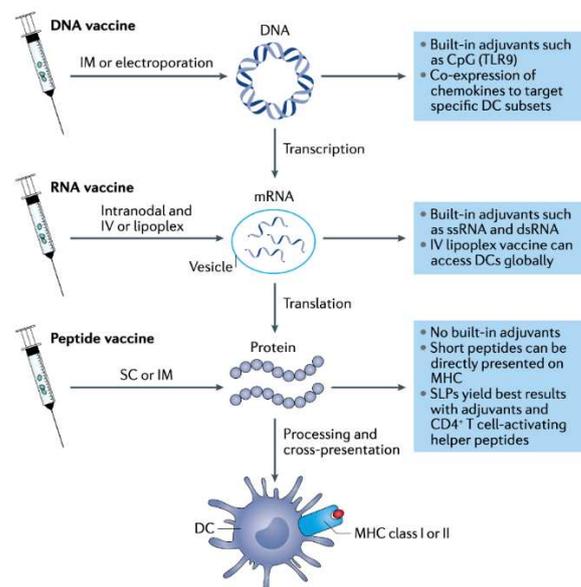


Figura 2: Vie di somministrazione degli antigeni. Gli antigeni, sotto forma di vaccino, possono essere somministrati direttamente per via endovenosa, intramuscolare, sottocutanea o intranodale. I vaccini a DNA vengono solitamente elettroporati e richiedono un ulteriore passaggio rispetto ai vaccini a RNA prima della presentazione antigenica sulle molecole MHC delle DC; i vaccini a RNA, invece, necessitano piattaforme di delivery più specifiche come nanoparticelle lipidiche (lipoplex). I vaccini basati su peptidi richiedono ancora meno passaggi prima della presentazione antigenica (Saxena et al., 2021).

Un altro metodo di somministrazione si avvale di DC caricate *ex vivo* con gli antigeni [figura 3]. Nello specifico, le cellule vengono isolate a partire da cellule staminali del sangue adulto periferico o cordonale del paziente, oppure da monociti differenziati i quali, sfortunatamente, non presentano l'intero repertorio di molecole co-stimolatorie e i meccanismi di presentazione antigenica. In seguito all'isolamento, queste cellule vengono coltivate e caricate *ex vivo* con gli antigeni d'interesse (TAA o TSA) attraverso vari meccanismi quali la pulsazione diretta, l'elettroporazione di mRNA, la fusione con cellule tumorali o l'incubazione con l'intero lisato tumorale *ex vivo*. Infine, le DC caricate sono reinfuse nel paziente tramite iniezione intracutanea, sottocutanea o intravenosa (Saxena et al., 2021).

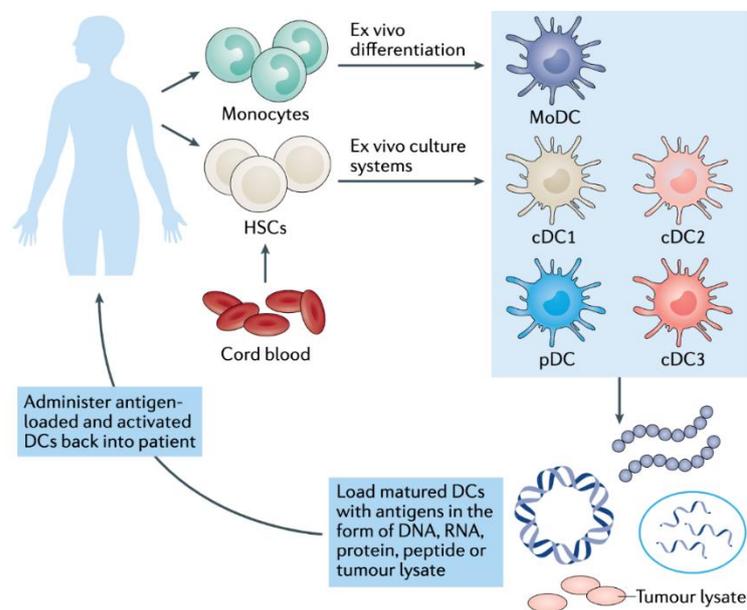


Figura 3: DC caricate *ex vivo*. Le DC derivano da monociti (MoDC) o da cellule staminali ematopoietiche (HSC) le quali si dividono in DC convenzionali di tipo 1, 2 e 3 (cDC1, cDC2, cDC3) e in DC plasmacitoidi (pDC); inoltre, possono essere isolate dal sangue adulto periferico o cordonale del paziente. Queste cellule vengono caricate *ex vivo* e iniettate nel paziente (Saxena et al., 2021).

Tra tutte le piattaforme vaccinali descritte, i vaccini a mRNA sono considerati una valida alternativa ai vaccini a base di DNA e superano di gran lunga le altre piattaforme in termini di elevata potenza, somministrazione sicura, rapido sviluppo del vaccino e costi contenuti di produzione (Bidram et al., 2021; Miao et al., 2021).

3. VACCINI A mRNA CONTRO IL CANCRO

3.1 La struttura di mRNA: differenze tra mRNA convenzionale e saRNA

Esistono due tipologie di vaccini a mRNA usati nell'immunoterapia: quelli basati su mRNA convenzionale non replicante e quelli basati su mRNA autoamplificante, detti saRNA [figura 4].

L'mRNA convenzionale non replicante corrisponde all'mRNA eucariotico "maturo", è una molecola a singolo filamento costituita da una struttura base e codifica per un solo antigene date le piccole dimensioni e la semplicità. La sua struttura si compone di un cap al 5', una regione UTR in 5', la sequenza nucleotidica che codifica per l'antigene o antigeni di interesse, un'altra regione UTR in 3' e una coda poli(A) al 3'.

Il saRNA presenta una struttura molto simile all'mRNA convenzionale con la capacità di codificare non solo l'antigene di interesse ma anche il macchinario di replicazione virale (Bidram et al., 2021). Questa molecola deriva dal genoma di un alphavirus (come il virus dell'encefalite equina venezuelana, Sindbis virus e il virus della foresta di Semliki) i cui geni che codificano per le proteine strutturali virali sono stati eliminati in modo da impedire la formazione di particelle virali infettanti; al loro posto sono state inserite le sequenze che codificano per l'antigene (o gli antigeni) di interesse e una lunga ORF che permette l'espressione della RNA polimerasi RNA-dipendente (detta replicasi) e di quattro proteine non strutturali virali che formano assieme un complesso multi-enzimatico (Beck et al., 2021; Karam & Daoud, 2022; Miao et al., 2021).

Il saRNA risulta, dunque, avere delle dimensioni maggiori (9-12kDa) rispetto all'mRNA convenzionale (Karam & Daoud, 2022).

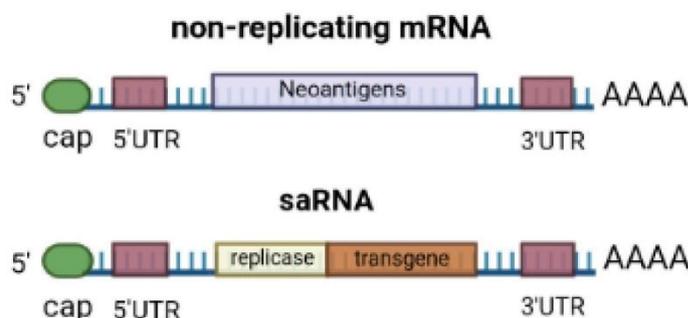


Figura 4: Struttura di mRNA convenzionale non replicante e di RNA autoamplificante (Bidram et al., 2021).

L'utilizzo di saRNA nel vaccino sembra essere più vantaggioso in quanto consente di esprimere massicce e durature quantità di antigene, richiede una dose di vaccino eccezionalmente bassa, genera risposte umorali e cellulari specifiche più potenti e scatena anche il Sistema Immunitario innato (Karam & Daoud, 2022).

Nei primi studi i vaccini basati su saRNA erano veicolati al paziente tramite particelle simili a virus (dette VRP) con il rischio, però, di indurre immunogenicità e tossicità aspecifiche ad opera delle proteine strutturali virali; ad oggi, per eliminare questi effetti collaterali, il saRNA (e anche l'mRNA convenzionale non replicante) viene trascritto *in vitro* utilizzando delle polimerasi batteriofagiche (T3, T7 o SP6) e delle molecole lineari di DNA (Miao et al., 2021).

3.2 Vantaggi, limitazioni e ottimizzazione dell'mRNA

Il principio su cui si basa questa immunoterapia è quello di consegnare l'RNA d'interesse (mRNA o saRNA che codifica per uno o più TAA o TSA) all'interno delle APC affinché processino e presentino sulle molecole MHC l'antigene per attivare risposte immunitarie antitumorali da parte sia di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, sia linfociti B (Miao et al., 2021).

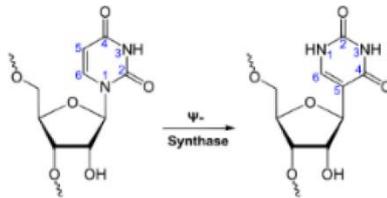
I vaccini a mRNA risultano avere una sicurezza superiore rispetto a quelli basati su DNA, infatti l'RNA consente un'espressione transitoria dell'antigene nel citoplasma senza il rischio che si integri nel genoma delle cellule del paziente. Come accennato nel capitolo precedente, l'mRNA ha adiuvanti incorporati quindi non necessita di particolari sostanze che aumentino l'immunogenicità perché il trascritto esogeno si comporta come i PAMPs e viene riconosciuto dai recettori PRR presenti sulle APC (principale bersaglio del vaccino), negli endosomi e nel citoplasma delle cellule. Il riconoscimento della molecola scatena sia risposte innate che adattative, eppure la risposta innata (fondamentale per attivare quella adattativa) può sopprimere la traduzione dell'mRNA. Questo effetto paradossale deriva dall'attivazione delle vie dell'interferone di tipo I (IFN) da parte dei PRR nell'endosoma: contemporaneamente l'interferone stimola la risposta immunitaria adattativa, favorisce la maturazione delle APC e potenzia la presentazione antigenica, però inibisce l'espressione dell'antigene.

Infine, la produzione di questi vaccini è rapida e a basso costo e, nonostante gli scienziati si stiano dirigendo verso una terapia personalizzata, il processo rimane identico per tutti i pazienti (Bidram et al., 2021; Sayour et al., 2024). Sfortunatamente questa tecnologia innovativa non è ancora totalmente sicura perché ad oggi si trova nelle prime fasi degli studi clinici e può

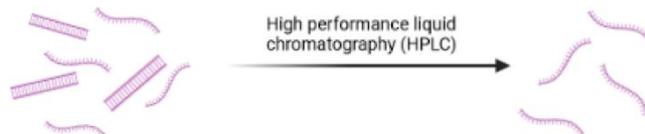
instaurare una risposta autoimmune; infatti, ci sono delle limitazioni da tenere in considerazione: i vaccini a base di mRNA sono altamente sensibili alle risposte innate e alle nucleasi che possono degradare la molecola. Inoltre, l'mRNA è una molecola grande, idrofila e carica negativamente che non è in grado di oltrepassare la membrana cellulare liberamente, quindi è necessario sviluppare degli opportuni metodi di “delivery” alle cellule bersaglio (Bidram et al., 2021).

Per superare l'ostacolo dell'immunogenicità innata, l'mRNA viene modificato e la sua struttura ottimizzata. Nello specifico, l'uridina viene sostituita con la N1-metil-pseudouridina (1m Ψ) aumentando la stabilità della molecola [figura 5A], il composto viene purificato dai dsRNA che si formano durante la trascrizione tramite la tecnica HPLC [figura 5B], per evitare la comparsa di codoni rari e per migliorare la traduzione dell'antigene vengono utilizzati codoni ricchi in GC (anche se non è ancora stata evidenziata questa correlazione) [figura 5C] e, infine, si operano delle modifiche in tutte quelle parti coinvolte nella stabilità del trascritto come il cap, la coda poli(A) e le regioni UTR (Bidram et al., 2021; Miao et al., 2021).

A. Chemical sequence modification with nucleotide substitution



B. Purification of the product from double-stranded RNA impurities



C. Selection of codons containing the largest number of GC pairs



Figura 5: Metodi di modificazione dell'mRNA. Sostituzione di uridina con pseudouridina tramite modificazione chimica (A), purificazione della soluzione tramite High Performance Liquid Chromatography (HPLC) per eliminare i dsRNA (B), e scelta dei codoni ricchi in GC (C) (Bidram et al., 2021).

Tuttavia, per quanto riguarda il problema del “delivery” dell'mRNA, è stato necessario sviluppare delle strategie per introdurre la molecola all'interno delle cellule (Bidram et al., 2021) che saranno approfondite successivamente.

3.3 Tipologie e metodi di delivery dei vaccini a mRNA

Con il passare degli anni e grazie al crescente interesse verso questa immunoterapia, sono stati sviluppati e testati diversi tipi di vaccini a mRNA contro il cancro che si possono suddividere in due macrocategorie: vaccini a base di mRNA (non formulati o formulati) e vaccini a base di cellule dendritiche con mRNA (Beck et al., 2021; Bidram et al., 2021).

3.3.1 Vaccini a base di mRNA non formulati

Il termine “non formulato” indica che il trascritto viene consegnato “nudo” tramite iniezione intradermica o intranodale diretta della soluzione di mRNA a patto che vengano rispettate delle condizioni: l’mRNA nudo [figura 6] deve essere disciolto in una soluzione che presenta Ca^{2+} , detta soluzione di Ringer. Il Ca^{2+} favorisce l’assorbimento dell’mRNA in modo dipendente dagli ioni ma ad oggi non è ancora chiaro come il trascritto venga assorbito dalle cellule (si ipotizza possa avvenire per macropinocitosi) (Bidram et al., 2021). L’mRNA nudo ha il vantaggio di presentare bassi livelli di tossicità e di tradurre più rapidamente le proteine; tuttavia, stimola una risposta immunitaria innata indesiderata contro la molecola stessa (Bidram et al., 2021).

3.3.2 Vaccini a base di mRNA formulati

In questa tipologia di vaccini l’mRNA si trova protetto dall’azione delle RNasi extracellulari grazie a strutture peptidiche, lipidiche, polimeriche, virali o ibride [figura 6] che avvolgono il trascritto, facilitando anche l’assorbimento da parte delle APC *in vivo* (Beck et al., 2021).

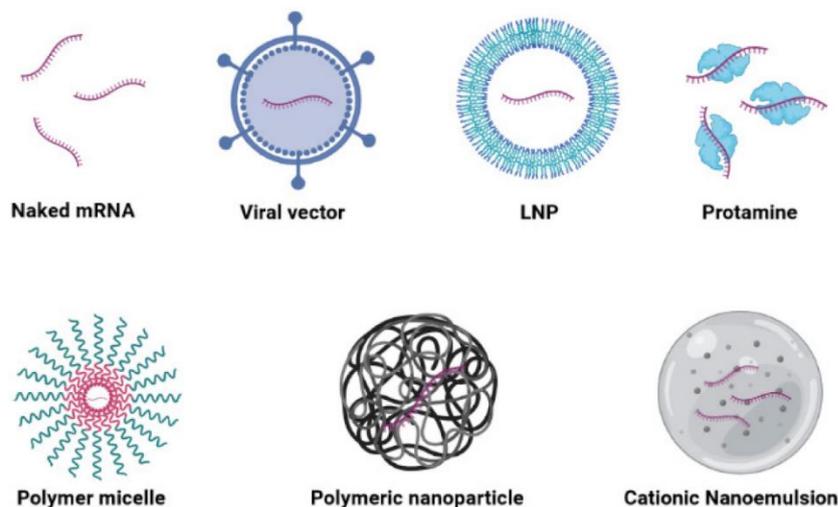


Figura 6: I diversi carrier per il “delivery” di mRNA (Bidram et al., 2021).

I vaccini a base di peptidi consentono una bassa immunogenicità e tossicità e una maggiore stabilità; i peptidi che li compongono sono corti e possono essere cationici (carichi positivamente) o anionici (carichi negativamente). I primi interagiscono facilmente con le cariche negative dell'mRNA e di questo gruppo fanno parte le protamine e i peptidi penetranti nelle cellule o CPP. La tecnologia a base di protamina è stata una delle prime ad essere utilizzata per il "delivery" di mRNA, infatti protegge la molecola dall'attacco delle nucleasi; tuttavia, l'uso esclusivo di protamina riduce l'efficacia del vaccino. Per questo motivo è stato introdotto un nuovo sistema, detto RNActive, in cui il complesso mRNA-protamina funge da adiuvante, inducendo una risposta immunitaria adattativa: il vaccino è, dunque, costituito da questo complesso e da un mRNA nudo che codifica per l'antigene di interesse. I CPP, invece, sono peptidi di 8-30 amminoacidi che sono altamente efficaci nella trasfezione e favoriscono la fuoriuscita dell'mRNA dall'endosoma poiché agiscono con un effetto spugna che porta al rigonfiamento osmotico dell'endosoma e alla sua conseguente rottura. Contrariamente ai peptidi cationici, i peptidi anionici, avendo carica negativa come il trascritto, richiedono la presenza di un co-polimero cationico per incapsulare l'mRNA e sono associati ad un aumento della trasfezione (Bidram et al., 2021).

I vaccini a base di lipidi sono formati da liposomi o nanoparticelle lipidiche (LNP) che avvolgono gli acidi nucleici, favorendo una rapida consegna alle cellule. In particolare, i lipoplex (LPX), costituiti da liposomi cationici e mRNA, inducono forti risposte antitumorali delle cellule T effettrici e della memoria (Bidram et al., 2021) e la loro carica può essere modificata in modo da favorire l'assorbimento da parte delle APC senza l'uso di molecole di targeting (Beck et al., 2021).

Sfortunatamente, i lipidi cationici favoriscono una rapida eliminazione e una elevata tossicità; per superare questi ostacoli, sono state sviluppate le nanoparticelle lipidiche basate su lipidi ionizzabili che, a pH acido e fisiologico, hanno rispettivamente carica positiva e neutra. Le LNP si compongono di quattro parti: un lipide ionizzabile, colesterolo, fosfolipidi e polietilenglicole o PEG. Il lipide permette l'incapsulamento dell'mRNA e favorisce il suo rilascio nel citoplasma, sfuggendo agli endosomi; il colesterolo agisce fornendo stabilità; i fosfolipidi donano supporto alla particella; infine, il PEG aumenta l'emivita della nanoparticella in quanto previene che il trascritto si associ ad altre proteine plasmatiche (Bidram et al., 2021). I complessi RNA-LNP sono stati sfruttati nella creazione dei primi

due vaccini approvati contro SARS-Cov-2 (Beck et al., 2021). Attualmente, il sistema RNA-LNP è stato testato prevalentemente contro infezioni virali, tuttavia ci sono studi per la terapia contro il melanoma che garantiscono la riduzione delle dimensioni della massa tumorale (Bidram et al., 2021).

I vettori a base di polimeri includono polimeri cationici e anionici. I primi sono preferenzialmente utilizzati poiché presentano cariche positive che interagiscono con le cariche negative dell'mRNA formando un complesso; inoltre, interagendo anche con le cariche negative sulla membrana degli endosomi, facilitano la fuoriuscita del trascritto. Le strutture polimeriche ad oggi più sfruttate sono le nanoparticelle poliplex e micelleplex. Spesso i polimeri cationici vengono sostituiti da quelli anionici, i quali richiedono l'aggiunta di lipidi cationici affinché possano instaurare legami con l'mRNA (Bidram et al., 2021).

La molecola di mRNA può essere consegnata anche attraverso vettori virali. Questi vaccini sono basati su virus modificati e ingegnerizzati come adenovirus (data la grande efficienza di trasduzione), picornavirus, flavivirus e alphavirus. Gli svantaggi di questa tecnologia sono il rischio di integrazione nel genoma della cellula, la tossicità e l'immunogenicità (Bidram et al., 2021).

I ricercatori hanno combinato varie molecole sviluppando vaccini basati su vettori ibridi che comprendono nanoemulsioni cationiche e lipopoliplessi. Le nanoemulsioni cationiche o CNE presentano una fase oleosa (composta da diversi lipidi, tra cui lo squalene) e una fase acquosa che si combinano a formare delle emulsioni contenenti mRNA. Questa tecnologia è impiegata prevalentemente per la somministrazione di vaccini a base di saRNA e presenta il vantaggio di utilizzare delle sostanze già clinicamente testate e con un'alta sicurezza. I lipopoliplessi, invece, sono delle strutture simili a LPX e poliplex costituite da una componente interna di mRNA e polimeri o peptidi cationici e da un rivestimento lipidico esterno. Questa formulazione ibrida rende il vaccino più efficiente rispetto a quelli basati su LPX o poliplex (Bidram et al., 2021).

3.3.3 Vaccini a mRNA a base di DC

La produzione di questi vaccini è un processo costoso, complesso e laborioso e richiede diversi passaggi che consistono nel caricare *ex vivo* le DC con l'mRNA corrispondente agli antigeni e, successivamente, nel loro reinserimento all'interno del paziente.

Precisamente, si comincia con l'isolamento dei monociti o delle cellule progenitrici ematopoietiche dal circolo sanguigno che vengono, poi, coltivati *ex vivo* in terreni di coltura appositi, si induce il loro differenziamento in DC che, infine, sono caricate con il trascritto di interesse (solitamente tramite elettroporazione, lipofezione, nucleofezione o sonoporazione (Bidram et al., 2021)) e reinserte nel paziente per via endovenosa, intranodale o sottocutanea (Beck et al., 2021).

Sono stati studiati e messi in pratica due metodi di caricamento delle DC: uno prevede che le cellule vengano caricate con mRNA totale del tumore, l'altro utilizza mRNA sintetico.

Nel primo caso l'mRNA estratto in massa dal tumore non contiene solo trascritti che codificano per gli antigeni di interesse ma rappresenta tutte le molecole che appartengono a quel tumore, perciò gli antigeni rilevanti per l'immunoterapia sono pochi e lo sviluppo del vaccino diventa difficile.

Il secondo metodo, invece, si basa sulla creazione di un mRNA sintetico che, una volta internalizzato nel citoplasma, codifica per gli antigeni specifici e ciò permette alle DC di esprimere alti livelli di TAA, al contrario della tecnica precedente (Beck et al., 2021).

Sfortunatamente, entrambi i metodi inducono deboli risposte immunitarie antitumorali da parte dei linfociti T; per superare questo ostacolo, i ricercatori hanno tentato di favorire la presentazione antigenica su MHC di classe II sfruttando l'ingegnerizzazione delle cellule stesse. Inoltre, sono state studiate delle strategie per migliorare la stimolazione dei linfociti T da parte delle DC come la co-trasfezione con mRNA che codifica per ligandi e recettori immunostimolanti o citochine co-stimolatorie (Beck et al., 2021).

Nonostante la complessità e il costo elevato di produzione come già accennato inizialmente, questa tecnologia offre il vantaggio di poter caricare le DC con mRNA che codificano per più antigeni rendendo il vaccino ancora più personalizzato (Sayour et al., 2024).

L'immunoterapia contro il cancro non sfrutta solo mRNA che codifica per gli antigeni tumorali, come esaminato finora, ma prevede anche l'utilizzo di trascritti che codificano per recettori antigenici, immunomodulatori e altre molecole come gli anticorpi [figura 7].

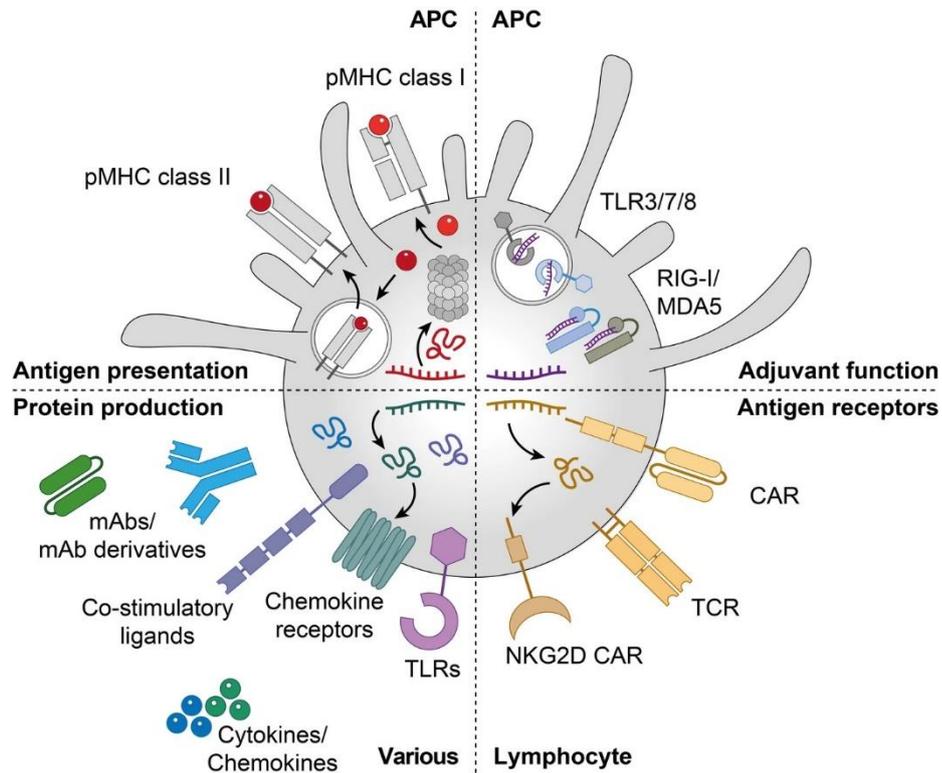


Figura 7: mRNA sfruttato nella vaccinazione contro il cancro. Può codificare per antigeni tumorali che vengono processati e presentati nelle MHC di classe I e II delle APC (in alto, a sinistra), stimolare il sistema immunitario innato (in alto, a destra), stimolare l'espressione di recettori antigenici nelle cellule T (in basso, a destra), e favorire la produzione di immunomodulatori e anticorpi da parte di varie cellule immunitarie (in basso, a sinistra) (Beck et al., 2021).

L'integrazione di mRNA che codifica per recettori antigenici come recettori delle cellule T (TCR) o recettori chimerici dell'antigene (CAR) permette di reindirizzare i linfociti T contro le cellule tumorali; normalmente, il trascritto viene inserito all'interno dei linfociti tramite vettori retrovirali o lentivirali. Inoltre, la risposta immunitaria antitumorale può essere indotta utilizzando molecole di mRNA che codificano per anticorpi o per immunomodulatori come citochine (in particolare IL-2, IL-12, IL-15), chemochine, ligandi e recettori co-stimolatori che stimolano l'attività dei linfociti T e di altre cellule immunitarie (Beck et al., 2021).

4. L'IMPORTANZA DI UNA TERAPIA COMBINATA

Per quanto lo sviluppo di vaccini terapeutici a mRNA abbia permesso alla comunità scientifica di fare grandi passi avanti nell'ambito delle terapie antitumorali, tuttora non sono totalmente efficaci in quei pazienti che presentano tumori ad uno stadio avanzato o "freddi" a causa della loro insensibilità all'immunoterapia (Saxena et al., 2021).

La vaccinazione non rappresenta l'unica alternativa alla cura dei tumori, esistono altre immunoterapie come l'inibizione di checkpoint immunitari e la terapia cellulare adottiva.

Gli inibitori dei checkpoint immunitari o ICI, come già accennato, sono dei farmaci che bloccano i checkpoint immunitari. Tra i checkpoint conosciuti, i più studiati sono CTLA4, PD-1 e PD-L1. Normalmente, in una persona sana queste molecole frenano l'azione del Sistema Immunitario dopo l'eliminazione del patogeno, impedendo che questo agisca contro le cellule "self" dell'organismo. Tuttavia, il TME è in grado di convertire l'attività dei checkpoint immunitari a proprio favore permettendo la proliferazione del tumore. Gli ICI agiscono bloccando l'attività dei checkpoint e, quindi, togliendo il freno ai linfociti T che attaccano le cellule tumorali e scatenano una risposta antitumorale (Saxena et al., 2021).

La terapia cellulare adottiva o ACT, come segnalato nel capitolo precedente, consiste nell'ingegnerizzare le cellule T tramite integrazione di recettori antigenici (TCR o CAR) per reindirizzarle contro le cellule tumorali. Attualmente, le cellule CAR-T sono le più studiate e applicate nei trial clinici: i linfociti T vengono estratti dal paziente malato, coltivati *ex vivo* e modificati mediante tecniche lentivirali o retrovirali che permettono l'inserimento del recettore CAR nella cellula (Beck et al., 2021; Gao et al., 2024).

Nonostante queste terapie abbiano mostrato un grandissimo successo, alcuni individui instaurano dei meccanismi di resistenza agli inibitori che rendono inefficace la cura. I ricercatori hanno, quindi, ipotizzato che fosse necessario combinare varie immunoterapie per ottenere risposte cliniche ottimali: non solo ridurre il tumore tramite chirurgia, chemioterapia o radioterapia, ma anche somministrare vaccini terapeutici in combinazione con ICI o ACT (Saxena et al., 2021). Vari studi hanno dimostrato come la combinazione di vaccini a mRNA e ICI aumenti il tasso di risposta all'immunoterapia e come la trasfezione di cellule CAR-T con mRNA migliori l'efficacia della risposta antitumorale in pazienti con cancro al seno e tumore al pancreas (Gao et al., 2024).

5. CONCLUSIONI

Con l'aumento dell'aspettativa di vita anche la comparsa di malattie non trasmissibili come i tumori è incrementata. La ricerca e lo sviluppo di nuove immunoterapie, quindi, è diventato sempre più necessario: tra tutte, la vaccinazione a base di mRNA ha suscitato particolare interesse nella comunità scientifica, soprattutto dopo il rapido successo dei vaccini contro SARS-CoV-2. Con la pandemia, infatti, gli studi sui vaccini a base di mRNA sono aumentati dirigendosi verso la maturazione di una nuova immunoterapia alternativa a quelle già esistenti per migliorare la vita degli individui affetti da tumori.

A partire dalla sua scoperta, in tutti questi anni di studi e sperimentazioni si è compreso che la molecola di mRNA è molto versatile e la sua capacità di codificare per diverse proteine (antigeni tumorali, recettori antigenici, immunomodulatori, anticorpi, ecc) in base alla sequenza inserita può essere sfruttata in molti ambiti. Finora le ricerche hanno portato alla creazione di vaccini terapeutici contro diverse tipologie di tumori; tuttavia, a causa delle numerose limitazioni, gli studi sono fermi alle prime fasi dei trial clinici.

Per garantire il successo di questi vaccini, gli scienziati sono indirizzati verso una terapia personalizzata che, in futuro, potrà essere rivoluzionaria nella cura dei tumori; inoltre, si dovrà lasciare ampio spazio all'utilizzo di terapie combinate che potrebbero offrire nuove speranze ai pazienti oncologici.

BIBLIOGRAFIA

- Beck, J. D., Reidenbach, D., Salomon, N., Sahin, U., Türeci, Ö., Vormehr, M., & Kranz, L. M. (2021). mRNA therapeutics in cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 20(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01348-0>
- Bidram, M., Zhao, Y., Shebardina, N. G., Baldin, A. V., Bazhin, A. V., Ganjalikhany, M. R., Zamyatnin, A. A., & Ganjalikhani-hakemi, M. (2021). mRNA-Based Cancer Vaccines: A Therapeutic Strategy for the Treatment of Melanoma Patients. *Vaccines*, 9(10), Articolo 10. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101060>
- Gao, Y., Yang, L., Li, Z., Peng, X., & Li, H. (2024). mRNA vaccines in tumor targeted therapy: Mechanism, clinical application, and development trends. *Biomarker Research*, 12(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00644-3>
- Karam, M., & Daoud, G. (2022). mRNA vaccines: Past, present, future. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(4), 491–522. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.05.003>
- Li, T., Qian, C., Gu, Y., Zhang, J., Li, S., & Xia, N. (2023). Current progress in the development of prophylactic and therapeutic vaccines. *Science China. Life Sciences*, 66(4), 679–710. <https://doi.org/10.1007/s11427-022-2230-4>
- Miao, L., Zhang, Y., & Huang, L. (2021). mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 20(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01335-5>
- Saxena, M., Van Der Burg, S. H., Melief, C. J. M., & Bhardwaj, N. (2021). Therapeutic cancer vaccines. *Nature Reviews Cancer*, 21(6), 360–378. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00346-0>
- Sayour, E. J., Boczkowski, D., Mitchell, D. A., & Nair, S. K. (2024). Cancer mRNA vaccines: Clinical advances and future opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 21(7), 489–500. <https://doi.org/10.1038/s41571-024-00902-1>
- Tian, Y., Hu, D., Li, Y., & Yang, L. (2022). Development of therapeutic vaccines for the treatment of diseases. *Molecular Biomedicine*, 3, 40. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00098-9>