

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E
DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO

BIOMATERIALI PER LA SOMMINISTRAZIONE DI VACCINI PER LA
TERAPIA IMMUNO-ONCOLOGICA

Elaborato in
BIOMATERIALI

Relatore

PROF. JOSEPH LOVECCHIO

Presentata da

ALESSIA LINDEMANN

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

ABSTRACT _____ p. 4

1. INTRODUZIONE

1.1 *Incidenza del cancro negli Stati Uniti* _____ p. 5

1.2 *Terapie attualmente note* _____ p. 7

1.3 *Immunoterapia: cenni storici e basi scientifiche* _____ p. 8

1.4 *Differenza principale tra vaccinazione e ACT* _____ p. 12

1.5 *Immunoterapia attiva: sviluppo di vaccini contro il cancro* _____ p. 12

2. OBIETTIVI _____ p.16

3. MATERIALI E METODI PER LA SOMMINISTRAZIONE DI IMMUNOTERAPIA E VACCINI CONTRO IL CANCRO

3.1 *Tipologie e proprietà dei biomateriali* _____ p. 17

3.2 *Scaffold per la somministrazione localizzata di vaccini* _____ p. 19

3.2.1 *Scaffold realizzati con materiali polimerici* _____ p. 21

3.2.2 *Scaffold realizzati con materiali inorganici* _____ p.23

3.3 *Vettori per la somministrazione dei vaccini contro il cancro:*

nanoparticelle biomateriali _____ p.24

3.3.1 *Caratteristiche fisiche delle nanoparticelle biomateriali* _____ p. 26

3.3.2 *Applicazione delle nanoparticelle per la somministrazione dei vaccini a mRNA* ___ p. 27

3.4 *Principali differenze tra vaccini somministrati tramite scaffold o nanoparticelle* ___ p. 28

**4. STUDI SULL'UTILIZZO DI BIOMATERIALI PER LA SOMMINISTRAZIONE DI VACCINI
PER LA TERAPIA IMMUNO-ONCOLOGICA**

4.1 Melanoma _____ p. 29

4.2 Cancro al seno _____ p. 33

4.3 Leucemie e linfomi _____ p. 35

4.4 Tumori pancreatici _____ p. 36

4.5 Tumore alla prostata _____ p. 38

4.6 Carcinoma polmonare _____ p. 39

5. CONCLUSIONI _____ p.42

6. BIBLIOGRAFIA _____ p.47

RINGRAZIAMENTI _____ p.52

ABSTRACT

Il cancro è una delle principali cause di morte al mondo. Nel 2019, solo negli Stati Uniti, i nuovi casi di cancro sono stati 1.762.450 con 606.880 decessi.

Ad oggi, sono numerosi gli studi interdisciplinari in atto aventi come fine ultimo quello di trovare una cura per il cancro più efficiente ed efficace di quelle tradizionali.

La seguente trattazione descrive una soluzione che coniuga le conoscenze mediche del campo immunoterapico con quelle ingegneristiche del settore dei biomateriali.

Nello specifico, vengono analizzati scaffold e nanoparticelle biomateriali utilizzati per la somministrazione di vaccini contro il cancro.

Gli obiettivi principali, infatti, risultano essere il raggiungimento di una memoria immunitaria, per contrastare metastasi e ricadute, e la diminuzione degli effetti collaterali che i pazienti oncologici sono costretti a sopportare sottoponendosi alle terapie convenzionali.

I risultati mostrano dati molto promettenti, poiché l'utilizzo combinato dei biomateriali con fattori caratterizzanti il sistema immunitario permette di ottenere vaccini somministrabili in maniera sicura, seppur le indagini cliniche per molte tipologie di cancro siano ancora in atto.

PAROLE CHIAVE: *cancro, immunoterapia, biomateriali, scaffold, nanoparticelle, vaccini*

1. INTRODUZIONE

1.1 Incidenza del cancro negli Stati Uniti

Il cancro è una delle principali cause di morte al mondo.

Unicamente nel 2018 sono stati identificati oltre 1,7 milioni di nuovi casi di cancro di cui 600.000 decessi solo negli Stati Uniti.²⁷

Nel 2019, invece, i nuovi casi di cancro sono stati 1.762.450 con 606.880 decessi.²⁹

Questi numeri sconvolgenti sono stati ricavati grazie alle analisi svolte con cadenza annuale dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in collaborazione con l'American Cancer Society (ACS), il National Cancer Institute (NCI) e la North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR) per fornire informazioni aggiornate sull'insorgenza del cancro negli Stati Uniti.²⁸

Leggendo i dati statistici ricavati, nel complesso, i tassi di mortalità per cancro sono diminuiti in media dell'1,5% all'anno nel periodo 2013-2017, diminuendo dell'1,8% all'anno tra i maschi e dell'1,4% all'anno tra le femmine.

I maggiori cali dei tassi di mortalità sono stati osservati per il melanoma della pelle (diminuzione del 6,1% all'anno tra i maschi e del 6,3% tra le femmine) e del polmone (diminuzione del 4,8% all'anno tra i maschi e del 3,7% tra le femmine).

Tra i bambini di età inferiore ai 15 anni, i tassi di incidenza del cancro sono aumentati in media dello 0,8% all'anno, nel periodo 2012-2016, e i tassi di mortalità sono diminuiti in media dell'1,4% all'anno, nel periodo 2013-2017. Tra gli adolescenti e i giovani adulti di età compresa tra 15 e 39 anni, i tassi di incidenza del cancro sono aumentati in media dello 0,9% all'anno, nel periodo 2012-2016, mentre i tassi di mortalità sono diminuiti in media dell'1,0% all'anno, nel periodo 2013-2017.²⁸

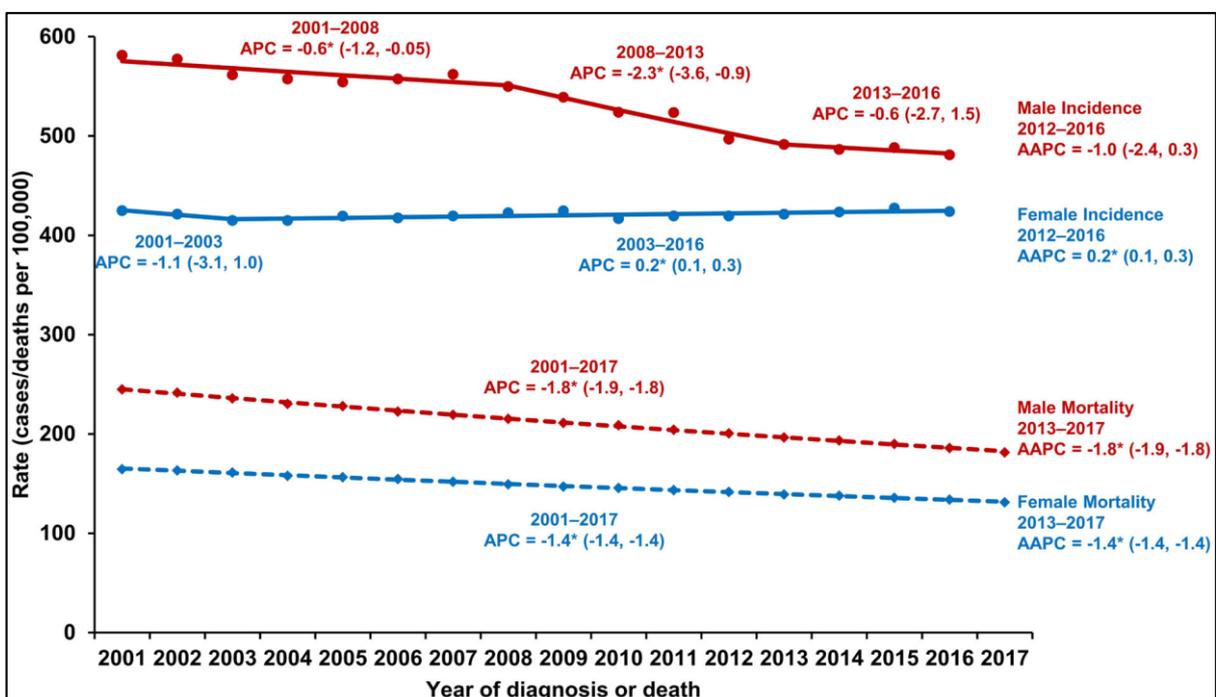


Figura 1: Tendenze dei tassi di incidenza standardizzati per età (2001-2016) e dei tassi di mortalità (2001-2017) per tutti i siti di cancro combinati, tutte le razze e le etnie combinate, per sesso. I tassi di incidenza coprono il 93% della popolazione degli Stati Uniti mentre i tassi di mortalità comprendono l'intera popolazione. I trend sono stati stimati utilizzando la regressione lineare e sono caratterizzati dalla variazione percentuale annuale (APC), la pendenza di un singolo segmento e l'APC medio (AAPC), con una misura riassuntiva degli APC su un intervallo fisso di 5 anni. Il periodo di 16 anni per l'incidenza ha consentito fino a 3 diverse APC e il periodo di 17 anni per la mortalità ha consentito fino a 4 diverse APC. Un asterisco (*) indica che l'APC o l'AAPC era statisticamente significativamente diverso da 0 ($p < 0.5$). I limiti di confidenza del 95% sono indicati tra parentesi. ²⁸

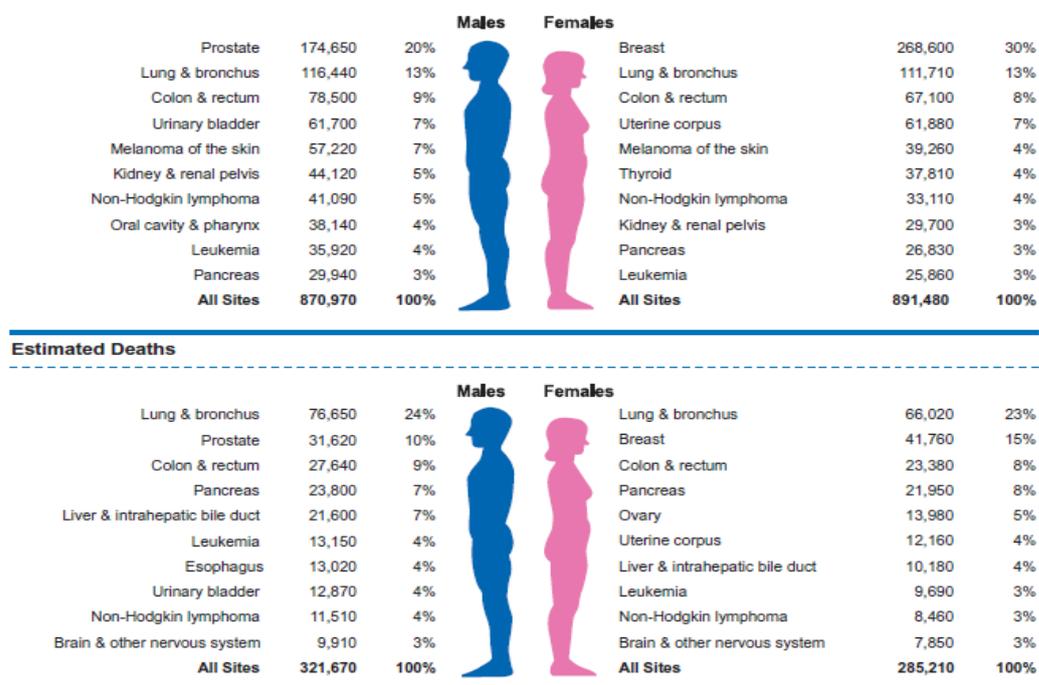


Figura 2: Dieci principali tipi di cancro considerati per stimare i nuovi casi di cancro e decessi differenziati per sesso negli Stati Uniti, nel 2019. ²⁹

Un ulteriore studio statistico ha selezionato come obiettivi i tassi di mortalità, lo screening del cancro e i principali fattori di rischio, relativi ai 4 tumori più comuni (polmone, colon-retto, seno e prostata). Durante l'analisi sono stati esaminati i valori di base, i valori recenti e la variazione percentuale dalla linea di base relativa ai valori recenti sia in generale che in base a determinate caratteristiche socio-demografiche.

I risultati mostrano come tra il 2007 e il 2017, i tassi di mortalità causati dal cancro siano diminuiti complessivamente del 15%, passando dal -4% (campo rurale) al -22% (metropolitana).

Gli obiettivi attesi dallo screening del cancro alla mammella e al colon-retto non sono stati ancora raggiunti né nel complesso né in alcun gruppo socio-demografico, ad eccezione di quelli con il livello di istruzione più elevato; mentre lo screening per il cancro del polmone ha mostrato risultati generalmente bassi (<10%).

I propositi non sono stati ancora raggiunti per fattori come il fumo di sigaretta, l'uso eccessivo di alcol o l'obesità, ma lo sono per l'esposizione al fumo passivo e l'attività fisica.

Una caratteristica importante che si evince è che alcuni gruppi socio-demografici non hanno raggiunto lo scopo o hanno avuto meno miglioramenti di altri.³⁰

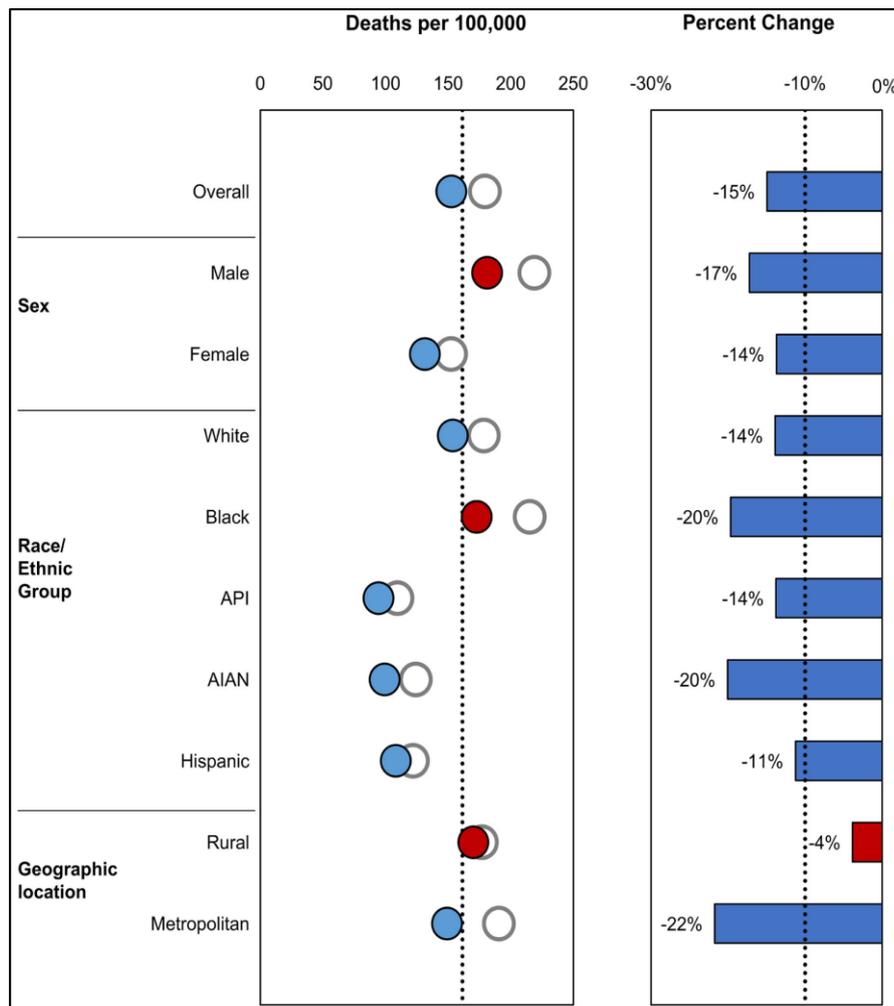


Figura 3: Vengono illustrati gli obiettivi di *Healthy People 2020* relativi ai tassi di mortalità per il cancro. I dati provengono dal National Vital Statistics System, i valori di riferimento risalgono al 2007 e le stime più recenti al 2017. Gli obiettivi per il 2020 di *Healthy People* sono indicati da linee tratteggiate nere. Il valore di base è indicato con un cerchio bianco mentre la stima è indicata con un cerchio blu se l'obiettivo è stato raggiunto e con uno rosso se non è stato ancora raggiunto. La variazione percentuale dal valore di base alla stima più recente è indicata da una barra blu se l'obiettivo di miglioramento percentuale è stato raggiunto e da una rossa se non è stato raggiunto. Il fine ultimo di *Healthy People 2020* è ridurre i decessi complessivi per cancro per 100.000 abitanti da 179,3 nel 2007 a 161,4 nel 2020 con, quindi, un miglioramento del 10%.³⁰

Le analisi statistiche sopra riportate permettono di comprendere l'effettiva ed improrogabile necessità di far fronte a questa malattia tramite il continuo impegno di studiosi nella ricerca di una cura.

1.2 Terapie attualmente note

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi in questo campo cercando così di superare quelli che sono i ben noti limiti delle terapie convenzionali. Nonostante questo, è ancora necessario approfondire

ulteriormente la materia con altri studi a causa della notevole complessità del cancro che, con le sue eterogeneità, non ha ancora permesso di giungere ad un' effettiva soluzione efficace per tutti i pazienti.

Ad oggi, i principali ospedali e cliniche nel mondo trattano i pazienti oncologici con terapie quali la chemioterapia, la radioterapia e le cure ormonali.

Il problema è che la chemioterapia antitumorale, pur essendo la più utilizzata, è ancora una terapia incompleta, poiché raramente permette di curare efficacemente i tumori avanzati. Inoltre, crea gravi effetti collaterali nei pazienti a causa dei farmaci antitumorali utilizzati che uccidono le cellule malate grazie alle loro proprietà citotossiche.³¹

La radioterapia attraverso l'utilizzo di radiazioni ionizzanti viene comunemente utilizzata per colpire distretti tumorali con confini ben definiti. Anche in questo caso sono numerose le controindicazioni in quanto, seppur questa metodologia permetta di ottenere l'apoptosi delle cellule tumorali, purtroppo ad essere colpite dalle radiazioni sono anche le cellule sane che vanno in necrosi, o si modificano.³²

Infine, le cure ormonali sono terapie convenzionali aventi come grande limite quello di essere applicabili solo in specifiche tipologie di cancro, tra cui quello al seno e alla prostata.³³

In aggiunta ai numerosi effetti collaterali e alla poca specificità dei trattamenti, queste cure convenzionali risultano non essere efficaci neanche nel proteggere il paziente da future ricadute o dallo sviluppo di metastasi. La mancanza di memoria immunologica, infatti, risulta essere una delle caratteristiche più importanti su cui basarsi per il miglioramento delle cure poiché purtroppo, sulla base di ulteriori statistiche, è stato dimostrato che gran parte dei decessi per cancro non risultano essere causati dai tumori primari ma principalmente da ricadute e metastasi più aggressive e, di conseguenza, più difficilmente trattabili.

Il motivo per cui, a differenza di altre malattie, l'organismo umano risulta non essere in grado di memorizzare l'avvenuta espulsione degli agenti patogeni tumorali tramite il sistema immunitario, è dovuto al fatto che uno dei segni distintivi del cancro è un profondo elemento di immunosoppressione e fuga dal sistema immunitario naturale.

È proprio quest'ultima caratteristica ad aver ispirato importanti ricerche e progressi nel campo dell'immunoterapia.

1.3 Immunoterapia: cenni storici e basi scientifiche

Le immunoterapie, intese al plurale in quanto ce ne sono di vari tipi avendo diversi meccanismi di azione, in generale, utilizzano il sistema immunitario dell'ospite per uccidere le cellule tumorali.

Queste hanno rivoluzionato il trattamento di vari tipi di cancro negli ultimi decenni, tanto che nel 2013 la rivista *Science* ha dichiarato l'immunoterapia come "la svolta dell'anno".³⁴

Infatti, con i primi studi clinici del 1990 si è arrivati nel 2010 all'approvazione, da parte della FDA, del primo importante farmaco immunoterapico, Sipuleucel-T, contro il cancro alla prostata.¹

Ad oggi, quindi, è ben chiaro che è presente un legame tra cancro e sistema immunitario ma non sono note tutte le sue sfaccettature.

Un primo aspetto fondamentale è la duplice natura del sistema immunitario, innato e adattivo, che permette di eseguire “l’immuno-sorveglianza” ovvero la distinzione tra cellule sane e cellule malate grazie alle differenze biochimiche.³⁵ Questa divisione, in realtà, è una semplificazione perché i due tipi di immunità hanno spesso ruoli sovrapposti e sono strettamente correlati.

Le caratteristiche di queste due tipologie di immunità sono descritte in **Figura 4**.

	Innate	Adaptive/Acquired
Specificity	<ul style="list-style-type: none"> • Nonspecific • Present at all times • Reacts to all foreign pathogens 	<ul style="list-style-type: none"> • Specific • Requires activation • Direct response to triggering pathogen
Response time	<ul style="list-style-type: none"> • Immediate reaction • General defense 	<ul style="list-style-type: none"> • Delayed reaction • Specific defense
Memory	<ul style="list-style-type: none"> • Absent 	<ul style="list-style-type: none"> • Present ◦ Antibody development ◦ Provides retained immunity to repeated exposure to same pathogens
Cell components	<ul style="list-style-type: none"> • Macrophages • Dendritic cells • Phagocytes • Neutrophils • Natural killer cells 	<ul style="list-style-type: none"> • T lymphocytes • B lymphocytes

Figura 4: immunità innata e adattiva

Tra tutti i fattori distintivi dei due sistemi immunitari, il più importante è relativo alla specificità della risposta.

Infatti, come è possibile notare, il sistema immunitario innato fornisce una risposta non specifica tramite cellule NK, macrofagi, cellule dendritiche e neutrofili, in grado di legarsi o incorporare ed eliminare le molecole potenzialmente nocive. Inoltre, queste cellule immunitarie inducono un’inflammatione che permette di reclutarne ulteriori per rendere più efficace l’azione.

Al contrario, il sistema immunitario adattivo consta di una risposta più lenta ma molto più forte e specifica che coinvolge i linfociti B e T. Questi ultimi, previa attivazione ottimale da parte delle cellule dendritiche, si differenziano rispettivamente in plasmacellule o cellule B di memoria, cellule T-helper CD4+ (TH) e cellule T effettrici CD8+ o cellule T di memoria che hanno tutte funzioni diverse nella lotta alle infezioni.

In generale, i linfociti B danno luogo a risposte umorali mentre i linfociti T inducono l’immunità cellulare. Questi ultimi, nello specifico, costituiscono il principale obiettivo delle immunoterapie, poiché il fine è quello di riattivarli così da ripotenziare l’immunità del paziente.

In aggiunta al processo di immuno-sorveglianza, è ormai noto che esiste un periodo dinamico in cui inizialmente le cellule immunitarie distruggono le cellule tumorali mentre, alla fine, c'è un momento in cui le cellule danneggiate, attraverso vari meccanismi, riescono ad eludere l'eliminazione da parte del sistema immunitario.

Per questa ragione, è stato coniato un nuovo termine specifico, "immuno-editing", che include tutte le fasi di interazione tra il cancro e il sistema immunitario oltre l'immuno-sorveglianza.

Quindi, nell'immuno-editing sono presenti 3 fasi distinte: eliminazione, equilibrio e fuga.³⁴

La fase dell'eliminazione coincide con l'immuno-sorveglianza attiva in cui le cellule dannose o potenzialmente maligne vengono identificate e uccise dal sistema immunitario innato. L'azione di distruzione, infatti, viene compiuta di seguito al rilevamento degli antigeni tumorali da parte delle cellule dendritiche che una volta maturate portano allo sviluppo di cellule T CD4+ e CD8+ specifiche contro il tumore. Questa fase risulta coincidere con lo sviluppo precoce e non rilevabile del cancro.

La seconda fase, invece, viene denominata di equilibrio perché le cellule tumorali non ancora distrutte riescono a non essere rilevate e, quindi, a coesistere con il sistema immunitario.

Infine, nella terza fase si verifica il meccanismo di fuga delle cellule tumorali che riescono ad eludere ogni tipo di attacco del sistema immunitario creando un ambiente infiammato pro-tumorale a bassa immunogenicità in cui le stesse molecole immunitarie modificate favoriscono la crescita tumorale o risultano essere in uno stato inattivo, come nel caso delle cellule T.

Nello specifico, in questa fase vengono attuate tre strategie pro-tumorali essenziali: [1] un ambiente immunosoppressivo per le cellule immunitarie antitumorali; [2] una barriera fisica per limitare l'ingresso delle cellule immunitarie nel microambiente; e [3] l'apporto della necessaria quantità di nutrienti.

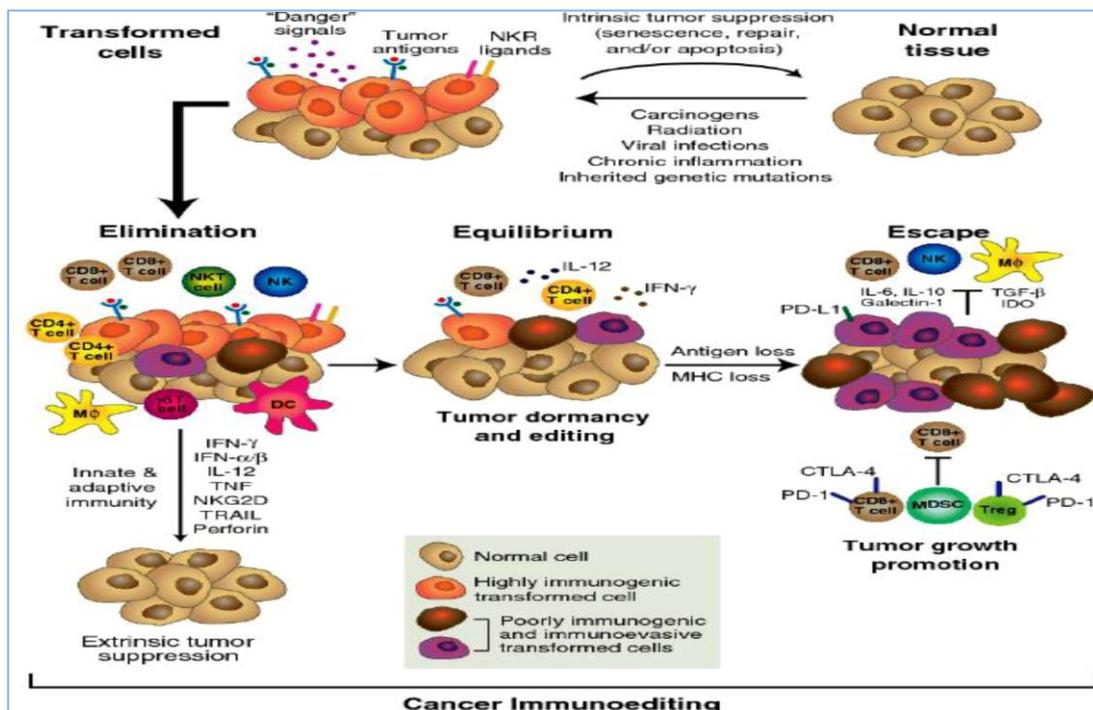


Figura 5: Immuno-editing

Risulta evidente, quindi, come la capacità di fuggire dall'eliminazione immunitaria sia una delle principali cause per cui il cancro è così difficile da curare.³⁷

Basandosi unicamente su queste conoscenze sembra a dir poco inutile l'approccio immunoterapico, dato che è lo stesso sistema immunitario a non riuscire a svolgere la sua funzione.

In realtà, l'immunoterapia ha come scopo ultimo quello di aumentare e/o ristabilire la capacità del sistema immunitario di prevenire e combattere le malattie.

Nello specifico, uno degli obiettivi da raggiungere è bilanciare il sistema immunitario per eliminare le cellule tumorali ma facendo particolare attenzione a non produrre risposte infiammatorie autoimmuni incontrollate, poiché queste costituiscono una forte limitazione terapeutica.

I metodi immunoterapici utilizzati per il raggiungimento di questi obiettivi sono molteplici, tra cui i vaccini, gli anticorpi monoclonali e gli inibitori dei checkpoint.

Le immunoterapie, infatti, vengono classificate, proprio in base ai meccanismi di azione, in attive e passive.³⁴

Le immunoterapie attive si basano sulla stimolazione diretta del sistema immunitario del paziente al fine di ottenere una risposta e memoria immunitaria durature nel tempo. I vaccini sono un esempio di immunoterapie attive.

Le immunoterapie passive, che includono gli anticorpi monoclonali o il trasferimento cellulare adottivo (ACT), richiedono la somministrazione regolare di cellule immunitarie prodotte già in forma attiva al di fuori del corpo del paziente. Esse, infatti, producono risposte specifiche ma spesso di breve durata. Inoltre, le continue somministrazioni risultano essere causa di numerosi effetti collaterali dato che causano una concentrazione non fisiologica di cellule immunitarie.

Chiaramente, in entrambi i casi, può esserci un ritardo nella risposta clinica all'immunoterapia. Ciò è dovuto al tempo necessario affinché si verifichi una risposta immunitaria, ovvero, il tempo materiale necessario alle cellule T per distruggere il tumore.

La memoria immunitaria che scaturisce dai trattamenti immunoterapici include un'azione immunitaria sostenuta anche dopo la cessazione della terapia che può portare ad effetti antitumorali continuati.

Tuttavia, ci sono alcune prove che i tumori che inizialmente rispondono alla terapia immunitaria possono diventare resistenti nel tempo, motivo per cui sono in corso studi per sviluppare soluzioni in grado di combattere la resistenza all'immunoterapia.

La resistenza ai trattamenti immunoterapici tradizionali si può manifestare sia che si tratti di pazienti che semplicemente non rispondono alle cure sia a causa di alcuni tipi di cancro che sono in grado di evitare meglio il sistema immunitario.

La soluzione, chiaramente, non consta di iniezioni ripetute o infusioni a dosi elevate perché questo porta a gravi effetti collaterali sistemici in molti i pazienti, con conseguente aumento dei costi di trattamento fisici, oltre che finanziari.

L'applicazione dell'immunoterapia tradizionale pertanto rimane limitata in portata ed efficacia, portando alla necessità di indagare su strategie di trattamento alternative.

È chiaro, quindi, che le immunoterapie hanno ancora molto spazio per migliorare, ma già attualmente questi trattamenti hanno mostrato un'impressionante eradicazione sistemica del tumore con conseguente memoria immunitaria durevole e resistente.³⁶

Concludendo, non si può far altro che affermare che le immunoterapie, ad oggi, sono un campo che sta rapidamente diventando un pilastro indispensabile per il trattamento del cancro.

1.4 Differenza principale tra vaccinazione e ACT

In questo elaborato verranno descritti prevalentemente i trattamenti immunoterapici attivi implementati tramite i vaccini ma, in ogni caso, è particolarmente importante conoscere la principale differenza tra vaccinazione e ACT.

Entrambi i trattamenti mirano a rafforzare il sistema immunitario aumentando il numero di cellule T effettrici ma, mentre l'obiettivo dei vaccini, in particolare quelli basati su neo-antigeni, è ampliare la risposta delle cellule T antigene-specifiche e aumentare l'entità delle risposte delle cellule T effettrici *in vivo*, l'ACT comporta la selezione di cellule T paziente-specifiche che, una volta rese nuovamente attive, vengono somministrate, in modo diretto, al paziente. La re-infusione di un gran numero di queste cellule effettrici sposta l'equilibrio dallo stato anergico, caratterizzato da esaurimento e tolleranza, alla presenza di una grande popolazione antitumorale attiva.

Dato che le cellule T specifiche attive vengono somministrate da un momento all'altro, nel paziente si manifestano gravi eventi avversi immuno-correlati.

Invece, i vaccini basati su neo-antigeni sono meno tossici ma presentano, comunque, delle problematiche nella somministrazione.

1.5 Immunoterapia attiva: sviluppo di vaccini contro il cancro

La sintetizzazione dei vaccini contro il cancro coinvolge le cellule dendritiche che risultano essere la classe più potente di cellule poiché riconoscono l'antigene e sono un fattore critico nell'interazione tra la risposta immunitaria innata e quella adottiva.

La vaccinazione contro il cancro mira a colpire e attivare le cellule dendritiche per indurre cellule CD8+ citotossiche e CD4+ TH1 (T helper) che eliminano specificamente le cellule maligne e inducono l'espansione delle cellule T della memoria.

Un fattore importante nella progettazione del vaccino è la scelta di un antigene immunogenico.

L'idea di "taglia unica" è una premessa errata a causa dell'eterogeneità inter-tumorale, della diversità tra tumori in pazienti diversi o dell'eterogeneità intra-tumorale indice della complessità dei singoli tumori.

Attualmente, sono implementati due approcci principali per la selezione dell'antigene comprendenti i vaccini contenenti antigeni sintetici specifici (neo-antigeni) o tessuto canceroso derivato dal paziente.

I vaccini basati sui neo-antigeni, costituiscono un approccio innovativo e comportano la formulazione di proteine che sono assenti dal normale genoma umano, riconosciute come "antigeni estranei", e sono create da mutazioni tumore-specifiche.

Questa tipologia di immunoterapia ha lo scopo di riattivare il sistema immunitario contro i neoantigeni espressi dalle cellule tumorali del paziente.

I vaccini derivanti dai tessuti cancerosi autologhi del paziente contengono un lisato di cellule cancerose o cellule tumorali intere, compresa la membrana cellulare e possibilmente lo stroma facendo scaturire una risposta immunitaria non solo contro le cellule tumorali ma anche contro lo stroma circostante immunosoppressivo. Un limite di questa tipologia di vaccini è che necessitano di una quantità sufficiente di tumore affinché possano essere realizzati e, quindi, sono applicabili solo per i tumori solidi che possono essere asportati chirurgicamente, aspetto che vale anche per i vaccini basati su neo-antigeni.

Al di là di questi approcci specifici, in generale, l'immunoterapia attiva deve far fronte a diverse sfide.

La prima è quella relativa all' "eterogeneità tumorale". Con questo termine si intende la capacità di ogni tumore di sviluppare il proprio profilo immunitario unico per eludere la risposta immunitaria antitumorale su più livelli.

Sono stati definiti tre "tipi immunitari" di tumore: immunitario infiammato, immunitario escluso e immuno-deserto.³⁸

I tumori immunitari deserti, o "freddi", sono tumori maligni invisibili al sistema immunitario, caratterizzati da un basso TMB (carico mutazionale del tumore). Il piccolo numero di mutazioni determina solo pochi neoantigeni espressi che possono essere riconosciuti dalle cellule T effettrici.

I tumori immunitari infiammati, o "caldi", crescono velocemente e in modo aggressivo. Il microambiente dei tumori "caldi" è infiammato e altamente infiltrato da cellule immunitarie come le cellule T effettrici CD8+. Tuttavia, molteplici meccanismi di fuga ostacolano la funzionalità di queste cellule che sono guidate in uno stato immunosoppressivo a causa dell'ambiente infiammatorio.

In questi tumori infiammati, l'evasione del sistema immunitario spinge i linfociti T all'esaurimento e alla perdita della loro funzione effettrice.

La presentazione dell'antigene sull' maggiore complesso di istocompatibilità (MHC) è necessaria per il riconoscimento delle cellule cancerose da parte delle cellule T attive. Dato che in questo caso manca la presentazione dell'antigene basato su MHC, le cellule tumorali possono rimanere al di sotto del radar immunitario e crescere indefinitamente.

Infine, i tumori immunitari esclusi sono caratterizzati da un TMB relativamente alto e da un sistema immunitario attivo. Le cellule immunitarie, però, non sono in grado di entrare nel tumore e raggiungono solo la sua periferia, così viene inibito lo svolgimento ottimale della loro funzione antitumorale.

Sulla base delle caratteristiche sopra descritte si può dedurre che trattare i tumori “caldi” o esclusi risulta essere relativamente più semplice rispetto ai tumori “freddi”, anche se per tutte le tipologie risulta essere necessario combinare diversi tipi di approcci terapeutici.

Ad esempio, un’innovativa soluzione per rafforzare l'immuno-oncoterapia combinata e trasformare il tumore "freddo" in "caldo" utilizza nanogel penetranti reattivi che riescono a migliorare la consegna a rilascio controllato e la penetrazione di fattori.³⁸

Un altro tipo di eterogeneità che rappresenta una sfida per le cure contro il cancro è quella “genetica”, ovvero quella intra-tumorale.

In questo caso, è indispensabile eseguire biopsie rappresentative per avere un'idea complessiva del profilo del tumore mutazionale e trascrizionale, seppur si verificano casistiche in cui il campionamento biotico multi-regione è impossibile, a causa delle dimensioni, dell'inaccessibilità del tumore o perché il campionamento di tutte le metastasi non è fattibile.

In questi casi, rilevare l’intero esoma (WES), ad esempio attraverso una biopsia tissutale, può rivelarsi un'alternativa promettente poiché è stato dimostrato che i tumori primari e le metastasi rilasciano il DNA nel loro ambiente.³⁹

Inoltre, dato che i campioni ricavati pre-trattamento immunoterapico hanno un potere prognostico minore di quelli ricavati nelle fasi cliniche successive, è sempre necessario monitorare frequentemente le risposte durante il trattamento attraverso prelievi di sangue e tessuti per svelare la potenziale resistenza terapeutica acquisita e provvedere con l’eventuale adattamento della terapia.

Nello specifico, in questa fase di monitoraggio vengono controllati i “markers” tumorali, ovvero, degli indicatori biologici i cui livelli nell’organismo facilitano la diagnosi. Tra questi è possibile identificare PDL-1 e TMB ma anche il livello di angiogenesi promossa dal tumore.

Con il termine “angiogenesi” si intende la sintesi dei vasi sanguigni controllata dalle cellule tumorali. Queste ultime, infatti, a causa della loro rapida proliferazione, esauriscono rapidamente i nutrienti e l'ossigeno, aspetto che normalmente limiterebbe la progressione del tumore, e, per questo motivo, innescano il rilascio di fattori pro-angiogenici.

Questo processo, però, avviene troppo velocemente per cui i vasi risultano essere immaturi con flusso sanguigno irregolare e architettura caotica, motivo per cui non riescono a fornire la quantità richiesta di ossigeno alle cellule tumorali.

Il microambiente tumorale (TME) rimane, quindi, sempre ipossico. Questo aspetto, inizialmente si pensava fosse un fattore limitante per la crescita del tumore, tuttavia è stato chiarito che il TME può adattarsi a stati ipossici prolungati.²⁴

L'ipossia, quindi, in realtà, promuove la progressione maligna (invasione, metastasi) e aumenta la resistenza alle terapie convenzionali ed è proprio per questo motivo che anche in fase di realizzazione delle immunoterapie bisogna tenerne conto.

A causa di tutti questi fattori, ancora oggi i vaccini contro il cancro risultano avere effetti fuori bersaglio e tossicità sistemica che, anche se risulta essere molto minore di quella provocata dalle terapie convenzionali, non può comunque essere tollerata. Inoltre, la loro efficacia non è ancora garantita, nonostante sia stato recentemente compiuto il grande passo nel riconoscere la necessità di terapie paziente-specifiche.

Tuttavia, i recenti progressi nella progettazione e nell'implementazione dei biomateriali, descritti dettagliatamente nel **Capitolo 3**, stanno portando ad una maggiore efficacia e una ridotta tossicità dei vaccini contro il cancro tramite il controllo dell'inserimento e del rilascio nel microambiente tumorale dei suoi componenti.⁴

2. OBIETTIVI

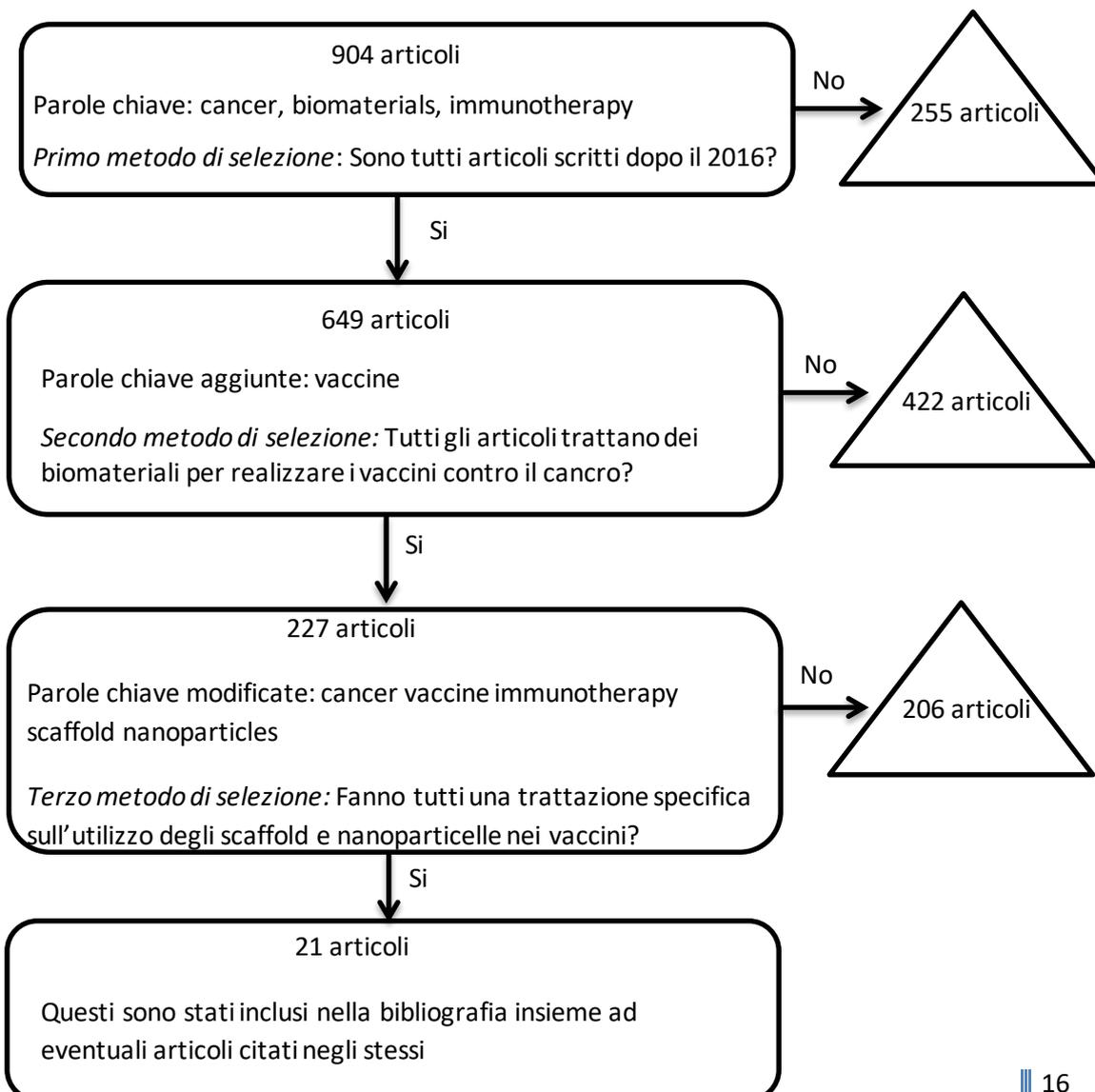
In questa trattazione viene descritto un metodo innovativo utilizzato per trovare una cura contro il cancro, implementato grazie all'unione delle conoscenze relative al campo medico ed ingegneristico.

Nello specifico, nel testo verranno fornite tutte le informazioni sul metodo di realizzazione e somministrazione dei vaccini che, di fatto, sono stati ottenuti grazie alle importanti scoperte nel campo immuno-oncologico e dei biomateriali.

La principale finalità di questa tipologia di cura innovativa è quella di far fronte alle notevoli aversità che si manifestano nei pazienti a seguito delle terapie convenzionali e soprattutto cercare di generare una reattività e memoria immunitaria contro i tumori per evitare che i pazienti, anche dopo le cure, possano essere soggetti a ricadute o metastasi.

Per raggiungere questo obiettivo i biomateriali risultano essere fondamentali, in quanto sono indispensabili per migliorare la somministrazione dei vaccini, garantendo una ridotta tossicità e controllando il rilascio dei componenti del vaccino, tra cui alcune cellule immunitarie modificate, nel microambiente tumorale.

La ricerca del materiale relativo a questi studi nel campo delle terapie immuno-oncologiche è stata condotta su Pubmed come descritto nel seguente prisma flow chart.



3. MATERIALI E METODI PER LA SOMMINISTRAZIONE DI IMMUNOTERAPIA E VACCINI CONTRO IL CANCRO

L'immuno-oncologia, associata allo sviluppo di vaccini contro il cancro, è una strategia emergente che produce durevoli risposte immunitarie in un gran numero di tumori maligni. Tuttavia, il principale limite per la sua ampia applicazione è che ha scarse proprietà di somministrazione e spesso richiede iniezioni ripetute ad alte dosi che provocano gravi effetti collaterali nei pazienti e/o efficacia limitata del trattamento.

Nello specifico, i vaccini terapeutici contro il cancro hanno ottenuto risultati clinici misti.⁵

Ciò è probabilmente dovuto a una serie di fattori tra cui le barriere biologiche, la bassa immunogenicità degli antigeni tumorali e il microambiente tumorale immunosoppressivo.

Affinchè un vaccino contro il cancro sia efficace devono essere soddisfatti numerosi requisiti al fine di indurre la risposta immunitaria desiderata.

Innanzitutto, analizzando il procedimento con cui i vaccini agiscono dal punto di vista medico-biologico, gli antigeni devono essere consegnati alle cellule che presentano l'antigene (APC), comprese le cellule dendritiche (DC) ma anche macrofagi, neutrofilo, e cellule endoteliali linfatiche.

Successivamente, le APC devono elaborare e presentare in modo incrociato gli antigeni tumorali di modo da far attivare e maturare le cellule T (cellule T CD4+ naïve e cellule T CD8+ citotossiche) che risiedono nei linfonodi (LN). Infine, attivate le cellule T helper (cellule Th) e i linfociti T citotossici (CTL), queste devono infiltrarsi nel sito del tumore per mutare il microambiente tumorale immunosoppressivo in un ambiente pro-infiammatorio. Questo microambiente alterato aiuta i CTL a uccidere le cellule tumorali ed è accompagnato da altri meccanismi per l'uccisione (ad esempio cellule natural killer e citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente).

A queste conoscenze vengono poi aggiunte quelle nel campo dei biomateriali, poiché questi ultimi risultano essere il mezzo attraverso cui il vaccino può arrivare ad agire correttamente.

Nello specifico, il biomateriale viene sintetizzato, al fine di realizzare il vaccino, con al suo interno cellule immunitarie modificate, antigeni specifici delle cellule tumorali, adiuvanti e altri fattori utili alla riattivazione del sistema immunitario contro il cancro.

Pertanto, negli ultimi anni, c'è stata una crescita esponenziale di studi nella ricerca della scienza dei biomateriali e della somministrazione di farmaci per fare in modo che la sintetizzazione dei vaccini contro il cancro fosse più sicura ed efficace possibile per i pazienti.⁴

3.1 Tipologie e proprietà dei biomateriali

Al fine di migliorarne sia l'efficacia che la sicurezza, i biomateriali sono stati applicati alle immunoterapie per la modulazione specifica nel momento del rilascio delle cellule immunitarie modificate nel microambiente tumorale immunosoppressivo.¹

Questi, infatti, offrono vantaggi di progettazione come: il controllo sulla cinetica di carico, il rilascio di più cellule immunitarie e la protezione dalla degradazione enzimatica e dal pH estremo.³

Tra le varie strategie, i sistemi di somministrazione di biomateriali su macroscale possono assumere forma di robusti scaffold impiantabili chirurgicamente in un sito di resezione del tumore o, in alternativa, possono essere sviluppati come materiali morbidi simili a gel che vengono iniettati in tumori solidi per stimolare una potente risposta immunitaria antitumorale.²

Biomateriali sintetizzati sotto forma di nanoparticelle (NP) e microparticelle (MP) di polimeri e peptidi possono essere combinati con qualsiasi immunoterapia, dagli inibitori del checkpoint e adiuvanti stimolatori, agli antigeni del cancro e cellule T adottive, con conseguente targeting molecolare specifico a cellule o tessuti immunitari; questa caratteristica può essere sfruttata per ridurre la tossicità sistemica e locale.³

Infine, si possono creare dispositivi come array di microaghi che prendono di mira le cellule immunitarie nella pelle.

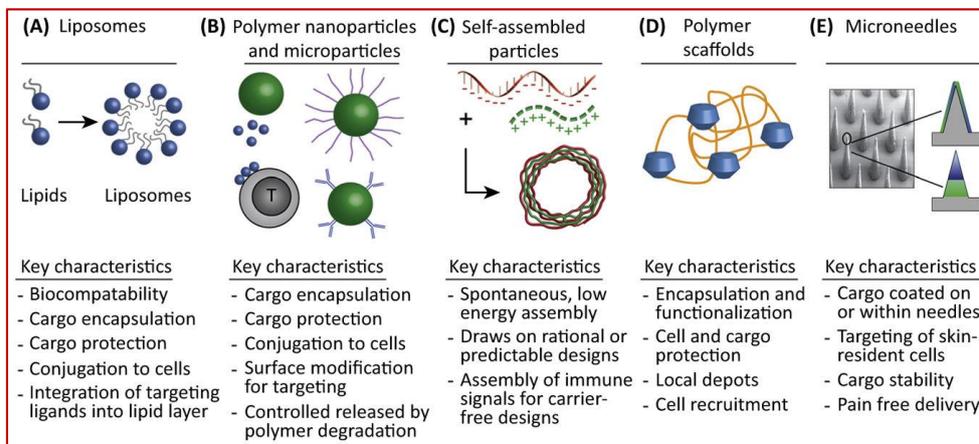


Figura 6: Classi di biomateriali utilizzati per studiare e controllare la funzione immunitaria

(A) liposomi, (B) nanoparticelle e microparticelle polimeriche, (C) materiali autoassemblati, (D) scaffold polimerici e (E) microaghi.³

Un aspetto particolarmente importante dei biomateriali riguarda la loro immunogenicità intrinseca in relazione alla loro forma, dimensione e chimica.

Innanzitutto, analizzando la forma dei biomateriali, diversi studi rivelano come particelle ellissoidali migliorano la farmacocinetica rispetto alle particelle sferiche, aumentando il tempo di circolazione per promuovere l'immunità.

Inoltre, per quanto riguarda le dimensioni, queste possono variare dall'ordine dei nanometri fino a raggiungere i micron. In particolare le NP con dimensioni ≥ 25 nm, transitano rapidamente verso i linfonodi drenanti (LN), mentre le particelle più grandi vengono trattenute nel sito di iniezione e trasportate ai LN dalle APC.⁸

Infine, è necessario considerare gli effetti chimici dei biomateriali. Ad esempio, la carica superficiale è uno dei fattori da tenere in considerazione in quanto le particelle caricate negativamente possono ridurre l'assorbimento da parte delle APC e, di conseguenza, limitare le risposte immunitarie adattative e possono, quindi, essere utili nella progettazione di piattaforme di trasporto non immunogeniche. O ancora, la stabilità della particella che risulta essere un parametro fondamentale in quanto esistono tanti nanomateriali che possono aggregarsi nel tempo modificando così le loro proprietà chimico-fisiche.

Questa interazione tra dimensioni, forma e caratteristiche chimiche mette in rilievo una domanda chiave rimasta ad oggi ancora in sospeso: come isolare al meglio il ruolo delle proprietà specifiche del materiale (ad es. forma rispetto alla superficie) per consentire una progettazione migliore di vaccini intelligenti e vettori immunoterapici.³

3.2 Scaffold per la somministrazione localizzata di vaccini

I vaccini contro il cancro spesso utilizzano scaffold che vengono impiantati o iniettati localmente, per reclutare e riprogrammare le cellule immunitarie e conseguentemente suscitare una risposta antitumorale.

Gli scaffold, infatti, incapsulano una varietà di molecole, come antigeni e immunomodulatori, che possono efficacemente programmare il tessuto periferico e facilitare l'infiltrazione delle cellule immunitarie.

In primo luogo, infatti, l'iniezione diretta di un gran numero di linfociti per il trattamento dei tumori solidi è comunemente non efficace a causa del basso accumulo ed espansione dei linfociti nei siti tumorali.

Gli scaffold possono regolare il microambiente tumorale immunosoppressivo e disperdere in maniera continuativa i linfociti.

In secondo luogo, la procedura di somministrazione può portare ad esaurimento funzionale delle cellule prima della reintroduzione.²

Nell'approccio biomateriale, i fattori che favoriscono la proliferazione e l'attivazione vengono caricati nello scaffold. I linfociti ingegnerizzati possono eliminare immediatamente le cellule tumorali adiacenti, causando minimi effetti collaterali e recupero facilitato dei pazienti. Inoltre, gli scaffold non solo possono fornire vari tipi di linfociti, ma forniscono anche cellule che sono difficili a proliferare, o che necessitano di un rigoroso microambiente, come le cellule T-helper di tipo 1 o le cellule T di memoria.¹

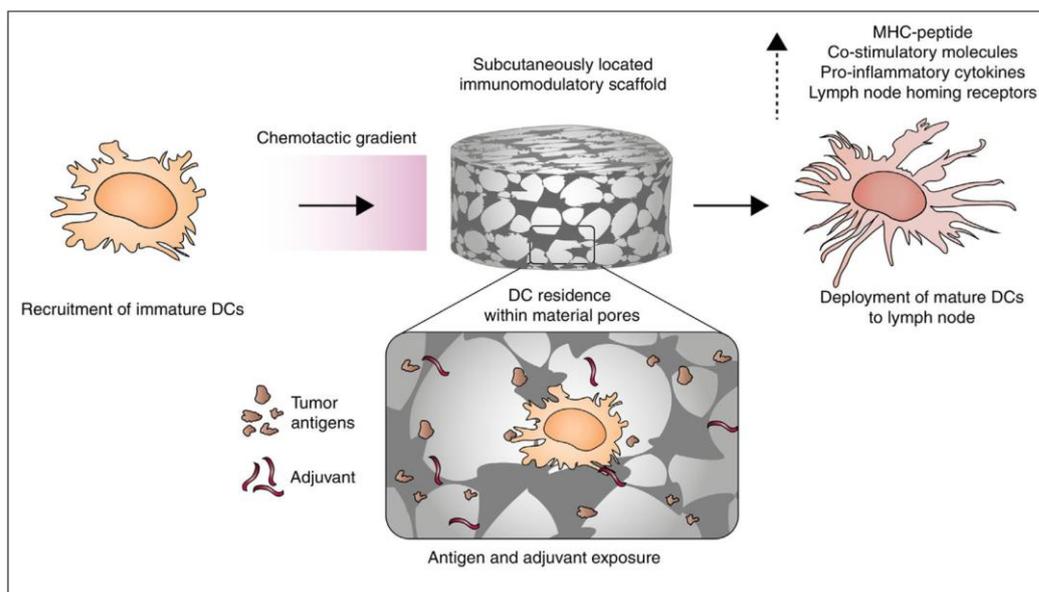


Figura 7: Gli scaffold possono essere impiantati per via sottocutanea e progettati per rilasciare agenti per reclutare cellule dendritiche (DC) immature. All'interno dello scaffold, le DC sono esposte agli antigeni tumorali e agli adiuvanti, con conseguente attivazione e maturazione, dopodiché le cellule immunitarie attivate possono uscire dallo scaffold e impegnarsi nell'attività antitumorale.³

Prima di analizzare nello specifico gli scaffold più comunemente utilizzati nella vaccinazione è utile considerare i vantaggi e gli svantaggi relativi ai sistemi iniettabili e impiantabili.

In generale, gli scaffold *impiantabili* sono utili come depositi durevoli per agenti caricati o cellule, rimanendo nella posizione di impiantato per lunghi periodi di tempo.

Tuttavia, presentano anche alcuni inconvenienti. Ad esempio, i vaccini basati su scaffold polimerici soffrono di rigidità e fragilità. Scaffold prefabbricati in alginato, pur essendo riassorbibili, richiedono un intervento chirurgico invasivo per l'impianto vicino ad un tumore solido.

Queste caratteristiche dei materiali limitano la capacità degli scaffold impiantabili di essere facilmente diretti verso la posizione desiderata. Tali scaffold, quindi, per definizione non possono essere collocati in luoghi chirurgicamente inaccessibili e la loro presenza può potenzialmente compromettere la normale funzione degli organi.²

Queste limitazioni hanno portato allo sviluppo di biomateriali immunoterapeutici *iniettabili*. Questi includono idrogel e criogel che possono essere derivati da vari componenti naturali o sintetici. Tali materiali sono stati ampiamente utilizzati poiché possiedono alcuni vantaggi distinti. In primo luogo, possono essere localizzati in qualunque punto accessibile con un ago. Richiedono quindi una procedura più semplice e meno invasiva rispetto all'impianto chirurgico. In questo modo si evitano danni ai tessuti non necessari e complicanze associate ad una risposta infiammatoria della ferita. In secondo luogo, con le loro proprietà viscoelastiche, i materiali iniettabili possono muoversi e fluire, adattandosi a qualsiasi spazio disponibile prima di trasformarsi in un impianto persistente. Tuttavia hanno anche degli svantaggi, ovvero, il

biomateriale prescelto deve, per definizione, formare o un liquido o un gel che gli permetterà di passare attraverso un ago, limitando pesantemente i tipi di materiali e componenti che possono essere inclusi. Molti materiali utili e desiderabili semplicemente non hanno le proprietà meccaniche necessarie per l'iniezione, limitando così il loro utilizzo.²

Fondamentalmente, uno degli obiettivi del progetto è scegliere il design del biomateriale, impiantabile o iniettabile, poiché ciascuno di essi ha punti di forza unici se utilizzato per le applicazioni appropriate.

3.2.1 Scaffold realizzati con materiali polimerici

Tenendo conto di queste differenze, possiamo affermare che gli scaffold più utilizzati per la vaccinazione sono costituiti da materiali polimerici, in quanto molto meno affetti da problemi di biocompatibilità e biodegradazione.

Una prima selezione importante, infatti, viene fatta partendo dalla sola categoria generale di appartenenza dei materiali; già solo questa differenza permette di capire a grandi linee il possibile campo di applicazione più idoneo.

Successivamente, si passa ad analizzare le caratteristiche più specifiche dei singoli materiali, in relazione anche alle strutture che questi ultimi possono andare a creare, in riferimento al campo immunologico.

Nello specifico, l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), l'acido ialuronico (HA) e l'alginato risultano essere i polimeri più utilizzati, rispettivamente di origine naturale i primi due e sintetica il terzo.⁴

PLGA è un materiale approvato dalla FDA ma non è iniettabile sotto forma di scaffold e deve essere impiantato.

Gli scaffold di PLGA vengono creati utilizzando un processo di schiumatura a gas.

All'interno della struttura sono incorporati GM-CSF, agonisti TLR (poli(I:C)) e antigene lisato tumorale. In particolare, con la sigla GM-CSF si intende il "fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi", ovvero, una citochina spesso usata che induce la differenziazione e la proliferazione delle cellule dendritiche (DC)², che viene rilasciata dallo scaffold di PLGA in un periodo di 30 giorni, creando un gradiente di citochine per reclutare DC; i DC reclutati poi maturano e successivamente migrano ai LN. Con poly:IC, "acido policitidilico", invece, si intende un agonista TLR3 che ha dimostrato di imitare efficacemente l'infezione virale per indurre un'inflammatione con, come conseguenza, una forte azione delle cellule del sistema immunitario.

Questa struttura, quindi, è in grado di indurre una risposta immunitaria antitumorale sinergica.

L'alginato, oltre alle normali caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità tipiche dei polimeri, può essere ideato in forma granulata, filamentosa o in polvere, quindi risulta essere un materiale che forma

strutture con una forte memoria riguardo le proprietà di forma che gli consente di essere iniettato nei pazienti, anziché impiantato, per poi recuperare la sua forma originale dopo l'iniezione con l'ago.

Anche per queste motivazioni, con questo materiale vengono realizzati degli idrogel che possono essere processati sotto condizioni criogeniche (polimerizzazione a -20°C) per formare criogel in grado di provvedere allo stoccaggio, proliferazione e dispersione delle cellule T ingegnerizzate. Per costruire queste strutture di alginato è stato utilizzato cloruro di calcio come agente per la reticolazione e stampo rotondo teflonato per formare lo scaffold di 2 mm di spessore. Dopodiché sono stati congelati e liofilizzati per ottenere matrici porose.¹⁴

Generalmente vengono utilizzati per incapsulare e rilasciare cellule tumorali intere irradiate e GM-CSF.⁹

Sia gli scaffold in PLGA che i criogel hanno mostrato un grande successo nell'incapsulare, presentare e rilasciare gli antigeni derivanti dalle cellule tumorali grazie alle loro strutture porose con pori che possono essere regolati in modo da essere adatti alle diverse dimensioni e tipi di carico.

Infine, per la somministrazione dei vaccini è molto utilizzato anche l'acido ialuronico (HA) che, essendo uno dei componenti fondamentali dei tessuti connettivi dell'uomo e degli altri mammiferi, e grazie alla sua eccellente capacità di idratazione, ha una biocompatibilità quasi assoluta.

Tramite l'utilizzo di questo materiale polimerico, è stato sintetizzato uno scaffold impiantabile costituito unicamente da acido ialuronico (HA) progettato in 3D, chiamato 3D-ENHANCE, per l'espansione delle cellule NK.¹

Infatti, come detto nel **Capitolo 1**, le cellule immunitarie NK sono normalmente in grado di separare le cellule tumorali maligne dalle cellule normali tramite un metodo antigene-indipendente.²² A causa della scarsa infiltrazione di cellule NK nel microambiente tumorale, i risultati clinici contro i tumori solidi rimangono insoddisfacenti.²¹

Questo polimero, però, può regolare la proliferazione e migrazione delle cellule NK essendo un componente chiave della matrice extracellulare (ECM) migliorando così i risultati.

Rispetto al caso bidimensionale (2D), 3D-ENHANCE promuove l'interazione intercellulare e l'aggregazione delle cellule immunitarie di modo da sopprimere la ricrescita tumorale a seguito della resezione chirurgica. Inoltre, i ricercatori hanno testato la citotossicità indotta da culture in 2D e 3D ed è stato dimostrato che gli scaffold 3D conferiscono una maggiore potenza alle cellule NK per l'uccisione del tumore.

L'acido ialuronico (HA) per le sue caratteristiche è stato utilizzato anche per la costruzione di un altro scaffold 3D impiantabile in unione, però, con il collagene.

È stato dimostrato, infatti, che la combinazione di collagene e HA promuove la migrazione e la divisione cellulare a causa della preminente biocompatibilità e biodegradabilità.

Nello specifico, lo scaffold è stato caricato con GEM e poli(I:C) che, una volta rilasciati nel tessuto, possono innescare un'intensa risposta immunitaria attraverso la stimolazione di TLR3 in DC e macrofagi.

Il motivo per cui si introducono nello scaffold questi fattori è dovuto, nello specifico, agli studi compiuti riguardo il microambiente tumorale immunosoppressivo (TME) che risulta essere il principale ostacolo all'eliminazione completa del tumore.

È stato dimostrato, infatti, che la GEMcitabina (GEM), con un rilascio prolungato nei primi 7 giorni dopo l'impianto, compie un'azione immunologica contro le popolazioni di cellule soppressorie derivate da mieloidi (MDSC), attori fondamentali che sopprimono la normale funzione immunitaria delle cellule T nel microambiente tumorale, con conseguente diminuzione dell'immunosoppressione nel TME.¹

3.2.2 Scaffold usati nella vaccinazione contro il cancro realizzati con materiali inorganici

In alternativa, le strutture possono essere realizzate utilizzando materiali inorganici cercando di sfruttare le loro caratteristiche fisico-chimiche per renderli comunque favorevoli all'interazione con l'ambiente biologico.

Un primo esempio sono gli scaffold composti unicamente da micro-balle di silice mesoporosa (MSR) che risultano essere, comunque, una soluzione ottimale poiché costituiscono un compromesso tra scaffold impiantabili e biomateriali iniettabili autoassemblandosi *in situ*, quando iniettati per via sottocutanea, e consentendo un esteso rilascio di fattori.

La MSR, infatti, è stata utilizzata in molte applicazioni nel settore biomedico grazie alla sua elevata biocompatibilità.

Negli scaffold per i vaccini contro il cancro, sono stati sintetizzate MSR esagonali con determinate proporzioni (88 μm \times 4,5 μm) caricate con GM-CSF di modo da generare una potente immunità antitumorale.

Infatti, gli agenti in MSR possono reclutare e programmare le cellule immunitarie dell'ospite e indurre queste ad interagire con altri tipi di cellule.²⁰

Tuttavia, gli MSR sono stati utilizzati per incapsulare relativamente piccoli carichi (ad esempio acidi nucleici, peptidi o proteine) quindi potrebbero non essere adatti nel caso di intere cellule tumorali come fonti di antigeni.

Una seconda generazione di scaffold MSR è stata ottenuta mescolando polietilenimina (PEI) e MSR. L'aggiunta della PEI ha permesso di migliorare la concentrazione e l'attivazione delle DC e la risposta immunitaria delle cellule T, con conseguente più efficace risposta umorale ed effetto di prevenzione del tumore rispetto alla formulazione tradizionale del vaccino.

Un altro tipo di implementazione con materiali inorganici è relativa ad uno scaffold costruito con poligliconato e gelatina suina. In questo caso, la biocompatibilità del materiale inorganico viene incrementata tramite l'aggiunta di un ulteriore componente di origine naturale, la gelatina suina, per evitare eventuali effetti collaterali.

Questo scaffold iniettabile risulta essere particolarmente innovativo in quanto viene ottenuto tramite la tecnica dell'elettrospinning. Nello specifico, l'elettrofilatura è stata realizzata con fibre distribuite casualmente di diametro da 1µm a 4µm; la soluzione di poligliconato/gelatina è stata caricata in una siringa chiusa con un ago di calibro 27 e distanziata di 30 cm dal collettore. Durante l'elettrofilatura, la siringa è stata montata su una pompa lineare motorizzata, che fornisce una velocità di alimentazione di 3 ml/h, in presenza di una tensione di 30 kV. Dopo l'elettrofilatura, l'impalcatura fibrosa è stata immediatamente essiccata sotto vuoto per 24 h.

Per fabbricare lo scaffold, inoltre, è stato aggiunto il farmaco CCL17 (5 g/ml) alla soluzione di poligliconato/gelatina sopra menzionata elettrofilandolo nelle stesse condizioni di cui sopra.

La morfologia delle fibre dello scaffold è stata caratterizzata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) dopo l'essiccazione sotto vuoto.⁵⁰

Il fine ultimo della struttura ottenuta con materiale inorganico combinato è quello di reclutare cellule T specifiche di modo da inibire in vivo la genesi tumorale.

In conclusione, quindi, gli scaffold possono essere sintetizzati da un gran numero di diversi materiali di partenza, dove ciascuno fornisce alla matrice complessiva proprietà uniche che possono, inoltre, essere modificate con gruppi funzionali alternativi o molecole segnale.

I materiali iniettabili forniscono un utile complemento agli scaffold impiantabili preformati, ed entrambe le strategie hanno portato a ottimi risultati in diversi contesti clinici.

Inoltre, gli studi sono in continua evoluzione tanto che il panorama ad oggi non è più limitato alla sola siringa o ai biomateriali impiantabili chirurgicamente (sebbene questi metodi siano di gran lunga i più comuni) ma una pubblicazione recente²⁵ ha utilizzato un sistema che non è stato né iniettato né impiantato, ma è stato spruzzato. Nello specifico l'idrogel di fibrina in situ è stato spruzzato da un dispositivo a doppia camera contenente uguali quantità di fibrinogeno e trombina polimerizzanti. Così l'idrogel risultante ha consentito la consegna controllata di anticorpi immunoterapeutici alle sedi tumorali trattate dopo l'operazione.²

3.3 Vettori per la somministrazione dei vaccini contro il cancro: nanoparticelle biomateriali

Gli antigeni e gli adiuvanti contenuti nei vaccini contro il cancro possono, in alternativa, essere somministrati mediante una vasta gamma di biomateriali vettori.

Nello specifico, gli agenti contenuti nella formulazione del vaccino vengono incapsulati in nanoparticelle tra cui quelle polimeriche, autoassemblate, lipidiche e i liposomi che tendono ad indurre risposte immunitarie più forti rispetto alla somministrazione di fattori solubili in assenza di un vettore.

Infatti, la scelta di utilizzare queste nanonoparticelle di varia natura è dettata dal fatto che usando queste come vettori si può migliorare la consegna degli agenti contenuti nel vaccino a determinati organi o tessuti come i linfonodi o i tumori solidi generalmente di difficile raggiungimento mediante altri meccanismi.

Analizziamone adesso ciascuna tipologia di modo da poter scegliere, in base alle caratteristiche specifiche dei biomateriali che le compongono, la loro migliore applicazione.

I liposomi sono una delle prime nanoparticelle studiate per la vaccinazione contro il cancro. Multiple formulazioni sono state approvate dalla FDA. Tuttavia, a seconda della formulazione e del carico di consegna, i liposomi possono avere alcuni svantaggi tra cui la bassa capacità di carico e l'elevata tossicità.

Un altro tipo di vaccino ampiamente studiato e approvato dalla FDA si basa su nanoparticelle polimeriche di acido polilattico-co-glicolico (PLGA). Un vantaggio di queste ultime è che possono essere generate in modo accurato e coerente utilizzando metodi ben definiti da protocolli che creano un'ampia gamma di particelle con varie dimensioni. Tuttavia, un loro svantaggio è il basso livello terapeutico.

Una notevole differenza tra liposomi e nanovettori di PLGA che ne influenza l'uso come sistema di consegna sono le caratteristiche del carico terapeutico che incapsulano. I liposomi contengono sia un nucleo idrofilo che un nucleo idrofobo creando così un doppio strato che li rende adatti a trasportare composti idrofobi e idrofili. Le nanoparticelle di PLGA, invece, sono state utilizzate per incapsulare una gamma di carichi terapeutici a velocità variabili e sono particolarmente adatte per l'incapsulamento e la consegna di carichi lipofili.⁴

Per superare gli ostacoli incontrati da questi sistemi di consegna, gli studiosi si sono concentrati sulla modificazione chimica dei liposomi o su formulazioni alternative di nanoparticelle di PLGA di modo da migliorare la stabilità e la quantità di carico incapsulata.

Da questi studi, sono state sviluppate numerose nuove classi.

Ad esempio, le nanoparticelle autoassemblate hanno elevate capacità di carico e hanno dimostrato di poter somministrare con successo vaccini a base di acido nucleico (DNA).¹⁰

Quelle lipidiche (LNP), invece, sono in grado di effettuare un'efficace somministrazione di vaccini ad mRNA. Tuttavia, sia le nanoparticelle autoassemblate che le LNP sono limitate a specifici tipi di antigene, poiché le loro formulazioni si basano in gran parte su carichi complessi.

Pertanto, queste ultime possono risultare più adatte per antigeni con sequenze facilmente modificabili (ad esempio peptidi) o cariche definite (ad esempio DNA o mRNA), mentre i liposomi e le particelle polimeriche risultano essere più specifiche per altre tipologie di antigeni (ad es. proteine, lisati tumorali o cellule tumorali).⁴

3.3.1 Caratteristiche fisiche delle nanoparticelle biomateriali

Utilizzando questo specifico sistema di somministrazione è fondamentale considerare la dimensione del vaccino, in aggiunta alle proprietà dei biomateriali già elencate in precedenza. Questo aspetto, infatti, è considerato un fattore chiave poichè influenza la biodistribuzione in caso di iniezione interstiziale, a causa delle differenze tra vasi sanguigni e linfatici.

Mentre le cellule endoteliali vascolari nello spazio interstiziale formano strette giunzioni (di dimensioni inferiori a 10 nm) attorno ai capillari sanguigni, le cellule endoteliali linfatiche formano giunzioni discontinue (centinaia di nanometri di dimensioni) che circondano i capillari linfatici. Inoltre, le portate di sangue attraverso i capillari vascolari sono dalle 100 alle 500 volte maggiori di quelle nei capillari linfatici.

Di conseguenza, quando un vaccino è inferiore a 2 nm di dimensioni, può attraversare giunzioni strette tra cellule endoteliali vascolari ed entrare nei vasi sanguigni. Però entrando in un vaso, i vaccini incontrano molti ostacoli alla consegna, incluso il sistema dei fagociti mononucleati che rapidamente li cancella.

Al contrario, i vaccini di dimensioni superiori a 200 nm sono esclusi dall'ingresso diretto nei vasi linfatici tramite diffusione passiva e devono perciò fare affidamento sulle APC residenti nei tessuti per il trasporto ai LN.

Pertanto, la dimensione ideale del vaccino varia da 2 a 200 nm, il che riduce l'ingresso nei vasi sanguigni e la conseguente disseminazione sistemica pur consentendo l'ingresso nei vasi linfatici.⁴

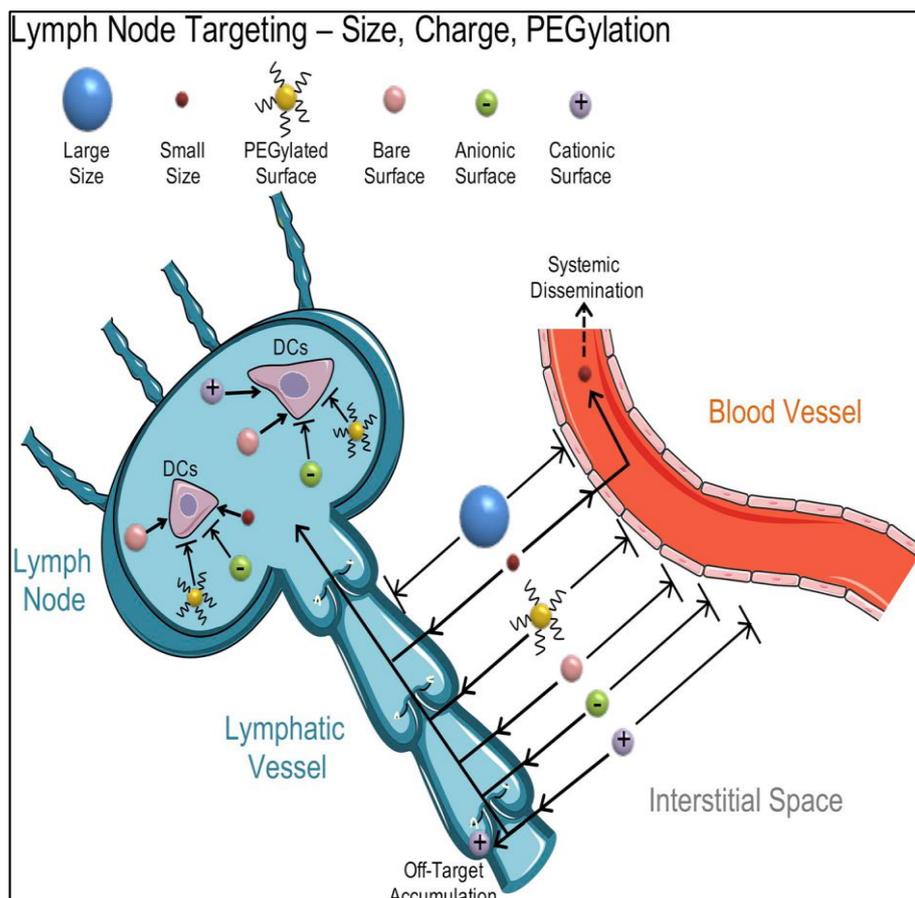


Figura 8: Il ruolo delle proprietà biofisiche dei biomateriali (come dimensione e carica) sul destino dei vaccini somministrati per via interstiziale mirati ai LN.

I vaccini di grandi dimensioni (oltre 200 nm) mostrano un assorbimento ridotto nei vasi linfatici. Tuttavia, piccoli vaccini (meno di 200 nm) possono facilmente entrare nei vasi sanguigni e determinare una diffusione sistemica. Materiali con superfici anioniche possono aumentare l'accumulo di vaccino nei LN, ma, allo stesso tempo, ostacolare il loro assorbimento da parte delle DC. I vaccini cationici possono mostrare un assorbimento più forte da parte dei DC, ma anche causare una consegna inefficiente ai LN.⁴

3.3.2 Applicazione delle nanoparticelle per la somministrazione dei vaccini a mRNA

I vaccini a mRNA sono un'altra promettente alternativa ai convenzionali approcci vaccinali, poiché sono una piattaforma non infettiva e non integrativa con alto potenziale, a basso costo e con rapida produzione.

L'mRNA, infatti, rispetto ai vaccini a DNA, non ha bisogno di attraversare la barriera nucleare per indurre l'espressione della proteina e, inoltre, può essere trasfettato, più efficientemente del DNA plasmidico, specialmente per lenta divisione cellulare.

I primi lavori su questi vaccini contro il cancro sono stati riportati nel 1990, poco dopo la scoperta dei vaccini contro il cancro a base di DNA⁶.

Attualmente, due tipi di mRNA sono comunemente utilizzati nei vaccini: non replicanti e autoamplificanti.¹¹

La maggior parte dei vaccini contro il cancro utilizza quello non replicante.¹²

Per quanto riguarda la consegna di questo tipo di vaccini, oltre agli approcci vaccinali convenzionali, ad oggi, questa si basa su sistemi biomateriali come liposomi e nanoparticelle polimeriche che forniscono esiti preclinici a dir poco promettenti.

Il successo della consegna dei vaccini contro il cancro tramite nanoparticelle è probabilmente dovuto alla loro capacità di aumentare il tempo di ritenzione del carico di mRNA in vivo e, benchè questi siano alle prime fasi di sviluppo, hanno mostrato grandi promesse per il trattamento di più tipi di cancro.

Più recentemente, le nanoparticelle lipidiche (LNP) sono emerse come promettenti piattaforme di consegna per i vaccini a mRNA, in seguito anche al recente successo nella consegna siRNA in vivo con l'approvazione della FDA.¹³

Gli svantaggi degli LNP, invece, includono il loro accumulo in organi fuori bersaglio come il fegato e alcuni casi di reazioni allergiche in pazienti umani.

Uno dei principali sviluppi in ambito clinico è RNAactive: un vaccino a mRNA autoadiuvato che include sia mRNA libero che filamenti di mRNA complessati con protamina cationica.

Le sue applicazioni sono principalmente in relazione al carcinoma polmonare e al tumore alla prostata; come verrà descritto nel **Capitolo 4**.

3.4 Principali differenze tra vaccini somministrati tramite scaffold o nanoparticelle

Sono identificabili due grandi differenze tra i vaccini contro il cancro basati su nanoparticelle e quelli basati su scaffold.

La prima è relativa al periodo di tempo in cui il vaccino risiede in un dato tessuto. Mentre, la seconda si riferisce al tipo di interazioni consentite con le cellule immunitarie.¹⁴

Le nanoparticelle, a causa delle loro piccole dimensioni, possono essere internalizzate facilmente dalle APC nei tessuti o nei LN poco dopo l'immunizzazione interstiziale.

Gli scaffold, a causa delle loro grandi dimensioni, interagiscono con le cellule immunitarie tramite il carico terapeutico incapsulato che può essere rilasciato nel corso di un prolungato periodo di tempo.¹⁵

Pertanto, le nanoparticelle spesso richiedono ripetute dosi di vaccino per ottenere un'efficace immunità antitumorale, mentre gli scaffold possono ottenere le risposte antitumorali desiderate con poche, o addirittura singole, dosi di vaccino.

Sulla base di questo, per gli antigeni difficili da raccogliere e processare (cioè antigeni di cellule tumorali autologhe) gli scaffold possono essere più auspicabili, poiché il loro programma di vaccinazione richiede generalmente dosi meno frequenti rispetto alla vaccinazione a base di nanoparticelle.¹⁶

Tuttavia, rimangono alcune problematiche in relazione ai vaccini basati su scaffold tra cui il fatto che gli antigeni o gli adiuvanti contenuti debbano rimanere stabili all'interno della struttura anche dopo la somministrazione in vivo.

4. STUDI SULL'UTILIZZO DI BIOMATERIALI PER LA SOMMINISTRAZIONE DI VACCINI PER LA TERAPIA IMMUNO-ONCOLOGICA

I biomateriali finora descritti, utilizzabili nel campo dell'immuno-oncologia, sono in grado di fornire risultati molto promettenti.

Come affermato già in precedenza, il passaggio dai laboratori alla clinica non è stato ancora ben collaudato; motivo per cui, in questo capitolo, verrà fatta una rassegna dei dati ottenuti dai test sui modelli murini e successivamente verranno trattati, laddove disponibili, i risultati delle più recenti applicazioni cliniche.

Essendo a conoscenza delle eterogeneità che caratterizzano i tumori, i risultati verranno analizzati sulla base della tipologia di cancro che caratterizza il modello e, di conseguenza, poi, il paziente.

4.1 Melanoma

Il melanoma è una delle tipologie di cancro rilevate più comunemente sia in soggetti di sesso maschile che femminile ma non risulta, comunque, tra quelle tipologie che causano la morte.

Essendo alquanto conosciuto rimane il modello di cancro più comune in cui vengono testati i biomateriali per vaccini e immunoterapie.⁴⁰

In questo caso, gli scaffold risultano essere la scelta migliore, in quanto possono creare depositi *locali* per reclutare cellule immunitarie o modulare la loro funzione.

Una prima applicazione risale al 2015, anno in cui Li et al. hanno sviluppato una terapia combinata con idrogel di alginato al fine di somministrare localmente sia celecoxib che l'inibitore del checkpoint PD-1 per via intratumorale.⁴²

Secondo gli studiosi l'utilizzo del celecoxib, con le sue proprietà antinfiammatorie e attività antitumorali intrinseche, avrebbe potuto migliorare l'efficacia dell'immunoterapia compensando l'infiammazione cronica deleteria indotta da PD-1.

Infatti, con questa strategia si è dimostrato, per la prima volta in un modello di melanoma B16-F10, che la consegna di celecoxib o PD-1, tramite un idrogel di alginato iniettato per via sottocutanea, porta ad una maggiore inibizione della crescita del tumore rispetto alle sole iniezioni di farmaci; dimostrando che l'idrogel è in grado di mantenere un'elevata quantità di farmaco locale al suo interno per poi effettuare un rilascio controllato nel tempo.

Inoltre, la somministrazione di entrambi i fattori, celecoxib e PD-1, contemporaneamente ha portato ad un'efficacia del trattamento del tumore significativamente migliorata, riducendo le dimensioni del tumore rispetto al solo trattamento con celecoxib o con PD-1 senza idrogel.

Infatti, tramite l'analisi in vitro di tessuti tumorali murini ricavati tramite biopsia, si è osservato come 5 topi su 9 mostrano una regressione completa del tumore rispetto ad un solo topo su 9 che sopravvive se si effettuano trattamenti con solo celecoxib e PD-1 senza idrogel.

Nel concreto, quindi, grazie all'utilizzo degli idrogel di alginato il 56% dei topi trattati ha raggiunto la completa regressione del tumore dopo tre mesi di follow-up.

Inoltre, è stato dimostrato che la terapia combinata con idrogel, oltre ad aumentare efficacemente l'immunità antitumorale, ha anche portato alla soppressione del microambiente pro-tumorale angiogenico e infiammatorio causato dal blocco PD-1 quando celecoxib è stato co-somministrato, supportando l'ipotesi iniziale degli autori.

Nel modello di melanoma murino, le formulazioni di idrogel iniettate per via sottocutanea hanno anche aumentato la percentuale di DC migratorie nei linfonodi drenanti, evocando così una potente risposta immunitaria dei linfociti T citotossici.

Un altro tipo di soluzione utilizzata per questa tipologia di tumore sono gli scaffold in PLGA per il rilascio continuo di GM-CSF.

In questo caso, le DC sono reclutate e intrappolate nelle impalcature, per cui riescono ad attivarsi e disperdersi solo quando i livelli di GM-CSF diminuiscono, indicando che la concentrazione e durata specifiche di GM-CSF possono profondamente influenzare gli effetti del trattamento.⁴³ Questo metodo ha creato un ambiente in grado di fornire segnali stimolatori alle DC per oltre due settimane.

Ottimisticamente, nel modello preclinico di topi con melanoma, con questo approccio i tumori sono completamente scomparsi nel 47% dei topi grazie al potenziamento delle DC attivate e all'aumento della percentuale di quelle migrate ai linfonodi, indicando che gli aspetti mimetici dell'infezione possono avere un impatto efficace sul reclutamento, l'attivazione e l'homing ai linfonodi delle cellule dendritiche.

Il vaccino contro il cancro basato su uno scaffold di PLGA è stato valutato anche in uno studio clinico di Fase I per il trattamento di un melanoma al IV stadio.⁴¹

In realtà, esistono anche i criogel carichi con GM-CSF iniettati per via sottocutanea nei modelli murini di melanoma. I risultati hanno indicato che il criogel ha indotto un maggiore tasso di sopravvivenza nei topi rispetto agli scaffold PLGA precedentemente studiati, pur essendo stato applicato lo stesso programma di immunizzazione.⁴⁴

Passando, invece, alle applicazioni nanometriche per questa specifica tipologia di tumore è possibile usare le membrane delle cellule tumorali rivestite sulla superficie con nanoparticelle caricate con adiuvanti. Tramite questo tipo di impostazione, tre dosi del vaccino a base di nanoparticelle hanno protetto l'80% dei topi portatori di melanoma dalla sfida contro le cellule malate.⁴⁵

Oltre a rivestire le superfici delle membrane delle cellulari tumorali di nanoparticelle, un altro studio recente ha studiato la strategia inversa.⁴⁶

In questo studio, le cellule tumorali isolate sono state prima trattate con un chemioterapico per innescare la morte cellulare immunogenica e, successivamente, sono state purificate e arricchite con nanoparticelle caricate con adiuvante per formare un vaccino.

In questo caso, una singola dose del vaccino ha protetto tutti i topi dalle cellule di melanoma.

In generale, quindi, un grande vantaggio di queste due tipologie di vaccino a base di nanoparticelle, chiamate biomimetiche, è che limitano strettamente molte proprietà naturali delle cellule tumorali. Tuttavia, diverse sfide attualmente esistenti, come la produzione su larga scala e la variabilità da lotto a lotto, possono ostacolare la loro futura commercializzazione.

Recentemente, in merito a queste strategie terapeutiche è stato sviluppato un metodo di miscelazione e autoassemblaggio chiamato flash nanocomplexation (FNC) per la produzione di nanovaccini rivestiti con membrana cellulare in modo scalabile.

Questa tecnica FNC riesce ad avere ampia applicabilità grazie all'utilizzo di dieci diversi materiali di base e più tipi di membrane cellulari.

Nello specifico, questi nanovaccini, quando composti dalla membrana di cellule cancerose B16-F10 che decora nanoparticelle di silice mesoporosa caricate con l'adiuvante CpG, risultano essere molto potenti nell'attivazione immunitaria delle cellule T, mostrando fin da subito una grande efficacia terapeutica nei modelli murini di melanoma.⁵⁵

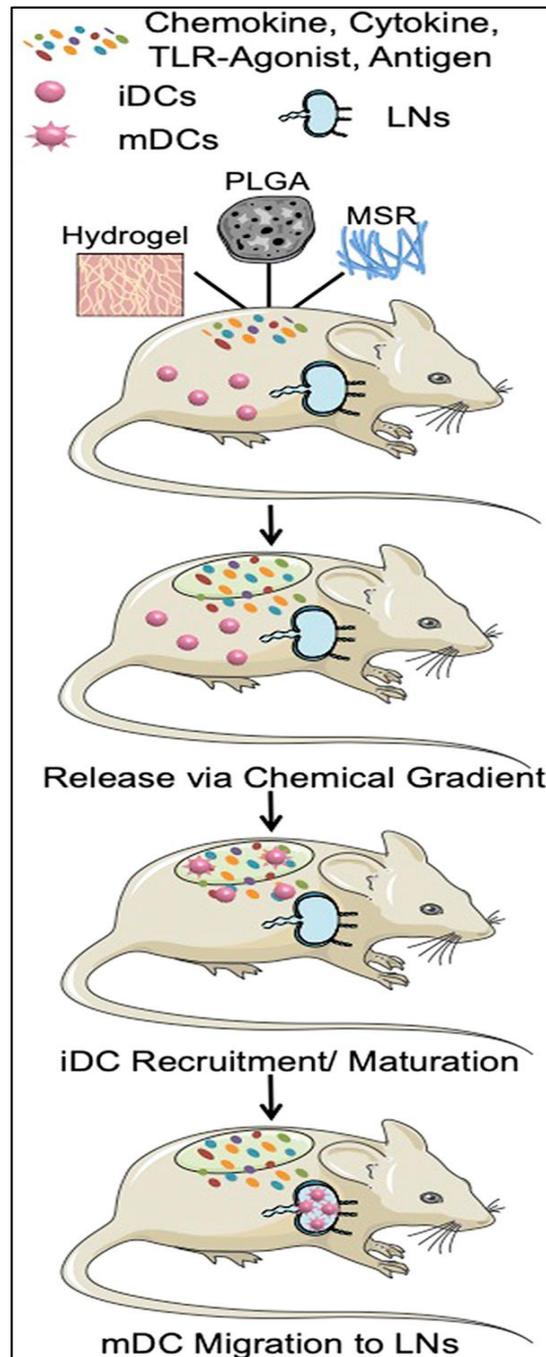


Figura 9: Schema sui vaccini basati su scaffold nei modelli murini. Sono presenti varie classi di scaffold, come idrogel, acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), e micro-barre di silice mesoporosa (MSR), antigeni incapsulanti e immunomodulatori (ad es. chemochine, citochine e agonisti dei TLR). Queste tipologie possono essere impiantate o iniettate nel tessuto periferico per la vaccinazione. DC immaturi (iDC) vengono quindi reclutati nello scaffold, diventano DC maturi (mDC) e migrano a linfonodi (LN) per avviare l'immunità antitumorale.⁴

4.2 Cancro al seno

Il cancro al seno costituisce ben il 30% di tutti i casi di tumore che interessano i soggetti di sesso femminile.

(Fig.2, Capitolo 1)

Fortunatamente, di questa alta percentuale, ad oggi, il numero di pazienti che risultano poi morire a causa della malattia decresce di anno in anno grazie anche alle terapie applicate, o in fase di sperimentazione, che risultano essere in numero sempre crescente.

Concentrandoci, nello specifico, sulle terapie basate sui biomateriali, un primo approccio curativo utilizza, come nel caso del melanoma, scaffold impiantabili per aumentare l'efficacia della terapia con cellule T adottive nel cancro al seno.

In un progetto, gli impianti polimerici porosi integrano peptidi sintetici e ligandi legati alla membrana che accoppiano anticorpi anti-CD3 e anti-CD28.

Quando impiantati in un modello di resezione del cancro al seno di topo, questi impianti hanno portato ad un aumento della proliferazione delle cellule T, orientato verso i fenotipi della memoria.³

Allo stesso tempo, uno scaffold formato da collagene e HA caricato con GEM, come detto in precedenza, ha la capacità di esaurire le popolazioni di cellule soppressorie derivate da mieloidi (MDSC).

In un modello murino di resezione del cancro al seno, in cui circa il 90% del volume del tumore è stato rimosso prima del trattamento, l'impianto dello scaffold caricato ha portato il 25% dei topi a mostrare una remissione completa e il 100% a mostrare uno stato di sopravvivenza notevolmente migliorato rispetto a quanto previsto, con metastasi tumorali significativamente ridotte.¹

In realtà i topi trattati con scaffold caricati con solo GEM o con soli antigeni/adiuvanti non hanno mostrato casi di piena remissione del tumore e sopravvivenza solo marginalmente migliorata, dimostrando l'efficacia delle strategie di immunoterapia basate su materiali multicomponenti.

Tali approcci potrebbero supportare il trattamento di tumori inoperabili e non completamente rimossi perché gli scaffold possono essere posizionati direttamente nel sito di resezione per fungere da deposito.

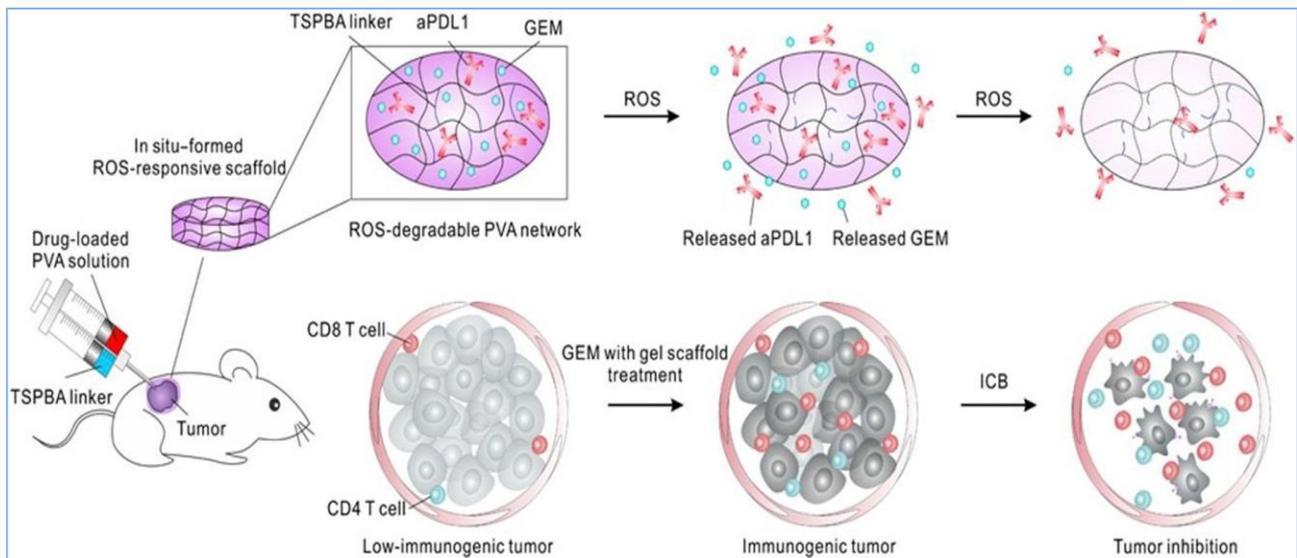


Figura 10: Schema di un'iniezione intratumorale di un vaccino utilizzando un idrogel. GEM e anti-PD-L1 sono incapsulati all'interno dell' idrogel, sensibile alle specie reattive dell'ossigeno, che degrada dopo l'iniezione. Il GEM di peso molecolare più piccolo viene rilasciato più velocemente dell'anti-PD-L1, di peso molecolare maggiore; questa è una differenza cinetica desiderabile. Infine, insieme inducono una potente immunità antitumorale.⁴

Un'altra soluzione sviluppata recentemente, ha utilizzato biomateriali e terapia fototermica per l'ablazione dei tumori nei topi, fornendo agli APC l'accesso agli antigeni associati al tumore.

La terapia fototermica funziona attraverso l'assorbimento locale di energia di un laser da parte di nanoparticelle che la reindirizzano verso il sito tumorale per generare riscaldamento locale⁴⁷ migliorando la risposta immunitaria specifica del tumore e generando una memoria funzionale che serve ad evitare eventuali ricadute.

Nella pratica, è stato realizzato un vaccino iniettabile contro il cancro a cellule vive (InLCCV) utilizzando cellule tumorali vive come fonti immunogeniche per l'immunoterapia del cancro.

InLCCV è stato fabbricato caricando cellule di cancro al seno di topo vivo (cellule 4T1), nanotubi d'oro (GNR) e lipo-polisaccaride a bassissima dose (LPS) in una matrice di idrogel in situ Pluronic F127 biocompatibile. Dopo l'inattivazione in situ per effetto fototermico dei GNR per irradiazione laser nel vicino infrarosso (NIR), viene indotta la morte cellulare immunogenica (ICD) delle cellule 4T1 e, successivamente, vengono rilasciati antigeni associati al tumore (TAA) insieme a LPS caricati.

Pertanto, le cellule dendritiche e i macrofagi vengono attivati di conseguenza, stimolando ulteriormente la risposta immunitaria antitumorale sistemica.

Dopo la vaccinazione con InLCCV, la percentuale di topi senza tumore è del 60% e il tasso di sopravvivenza durante il periodo di osservazione arriva fino all'80%.⁵⁴

4.3 Leucemie e linfomi

Queste due tipologie di cancro si manifestano solo nel 4% dei casi totali di pazienti malati di tumore ma questa percentuale, seppur bassa, coincide anche, più o meno, con quella dei pazienti che annualmente decedono proprio a causa di questa malattia.

I trattamenti, infatti, sono altamente specifici e molto complicati tanto che l'uso dei biomateriali come semplificazione non sembra essere ancora giunto ad un livello sufficientemente elevato da poter generare una svolta significativa nelle cure.

Un approccio spesso utilizzato per queste due tipologie di tumori si basa sull'uso degli scaffold di MSR e MSR-PEI.

MSR caricato con GM-CSF ha protetto il 90% dei topi dalla sfida contro le cellule del linfoma EG7.OVA. In particolare, è interessante notare che anche una singola dose di vaccino basato su scaffold di MSR ha indotto risposte anticorpali durevoli.⁴

Lo scaffold MSR-PEI, invece, quando caricato con GM-CSF, tramite una vaccinazione a dose singola è riuscito a sradicare grandi tumori nell'80% dei topi.

Recentemente, nei modelli murini di leucemia mieloide acuta (AML) è stato testato un vaccino macroporoso-biomateriale che fornisce il fattore stimolante le colonie di GM-CSF e uno o più antigeni leucemici (sotto forma di lisati cellulari o antigeni provenienti da cellule AML reclutate in vivo) al fine di provocare l'infiltrazione di cellule immunitarie locali e cellule dendritiche attivate, evocando una potente risposta anti-AML.⁵⁶

Il vaccino a base di biomateriali ha impedito l'attecchimento delle cellule AML, quando somministrato come profilattico e in combinazione con la chemioterapia, e ha sradicato l'AML stabilito anche in assenza di un antigene vaccinale definito. Risulta, quindi, essere una buona alternativa alla chemioterapia cito-riduttiva standard che esaurisce le cellule AML per indurre la remissione, ma raramente è curativa.

Un'altra strategia entusiasmante, derivante dall'uso dei biomateriali nel cancro, è la coniugazione di cellule T con nanoparticelle (NP) che incorporano segnali immunitari per migliorare la risposta antitumorale.

In un esempio, le NP caricate con chemioterapici sono state coniugate a cellule T autologhe ex vivo, quindi trasferite adottivamente in un topo con linfoma disseminato.⁴⁸ Questa strategia ha ridotto il carico tumorale indirizzando la chemioterapia ai siti linfoidi in cui si trovano le cellule T e i linfomi; quindi, l'NP fungeva da deposito di farmaci per il rilascio controllato e prolungato alla cellula T.

Altri approcci cercano di eliminare completamente il trasferimento adottivo per ridurre le problematiche e gli effetti collaterali già descritti in precedenza.

Ad esempio, in un modello murino di leucemia, sono stati utilizzati polimeri cationici per condensare il DNA che codifica per il recettore dell'antigene chimerico specifico per la leucemia (CAR).⁴⁹

Le NP sono state quindi funzionalizzate con frammenti anti-CD3 per colpire le cellule T, inducendo l'espressione del gene CAR in situ e fornendo la remissione della malattia a lungo termine.

Tali approcci potrebbero portare a percorsi efficienti ed efficaci per risultati analoghi in clinica.

4.4 Tumori pancreatici

Il tumore pancreatico pur essendo poco frequente, secondo le statistiche, rientra tra le prime tre tipologie di tumori che causano la morte dei pazienti. (Fig.2, Capitolo 1)

Una delle motivazioni per cui questo accade è che i trattamenti risultano essere alquanto complicati.

Infatti, partendo dal caso di terapie basate su scaffold impiantabili, per definizione, è noto che questi non possono essere collocati in luoghi chirurgicamente inaccessibili o aree sensibili al volume e la loro presenza persistente può potenzialmente compromettere la normale funzione degli organi.

Ad esempio, i dati sugli impianti di alginato per il trattamento dei tumori pancreatici hanno mostrato una certa compromissione dell'attività pancreatico.

Tuttavia, una delle soluzioni meno compromettenti e più efficaci è quella utilizzando gli scaffold iniettabili per il rilascio di farmaci.

Nello specifico, quello, descritto nel **Capitolo 3**, fabbricato mediante elettrofilatura di poligliconato e gelatina suina, ha mostrato risultati a dir poco promettenti sui modelli murini.⁵⁰

Infatti, mentre dallo studio in vitro scaturiva che i materiali utilizzati per realizzare lo scaffold non erano citotossici per le cellule tumorali del pancreas, in vivo si è osservata una maggiore presenza di cellule T murine CCR4+ e CD8+ nella massa tumorale trattata con strutture a rilascio di farmaco rispetto a quelle non contenenti gruppi di controllo.

Le immagini al microscopio elettronico a scansione hanno mostrato che gli scaffold elettrofilati erano composti da fibre distribuite casualmente, come descritto in precedenza, ma è emerso anche che il carico utile CCL17 aveva modificato la morfologia della fibra. Nella struttura non eluente, le fibre hanno mostrato una morfologia ampiamente uniforme con un diametro compreso tra 2 µm e 3 µm. Al contrario, i diametri delle fibre nello scaffold a rilascio di farmaco sono scesi tra 2 µm e 4 µm.

Lo studio farmacocinetico in vitro ha mostrato come quello a rilascio di farmaco presentava un rilascio prolungato del suo carico utile durante i primi 7 giorni mentre non veniva rilevato nessun aumento della quantità cumulativa oltre il giorno 7.⁵⁰

La proliferazione di cellule tumorali pancreatiche sia su scaffold a rilascio di farmaco che su quelli non ad eluizione era ugualmente forte come quelli coltivati su piastre di coltura tissutale entro un periodo di 7

giorni. Questo risultato ha suggerito che né i materiali dell'impalcatura né CCL17 hanno causato effetti citotossici sulle cellule del cancro del pancreas. Di conseguenza, il test di apoptosi ha confermato che non è stato osservato alcun livello significativo di apoptosi nelle popolazioni di cellule di cancro del pancreas su scaffold a rilascio di farmaco o quello non ad eluizione durante un periodo di 7 giorni.

Si prevede che questa mancanza di citotossicità causi effetti collaterali minimi, se non nulli, nei pazienti quando la struttura a rilascio di farmaco viene utilizzata come trattamento post-operatorio.

È chiaro, quindi, come questo studio ha gettato una nuova luce sul trattamento post-operatorio del cancro del pancreas per prevenire le recidive.

In generale, però, come visto per il cancro al seno ed i linfomi, utilizzare le immunoterapie basate su biomateriali in concomitanza con agenti chemioterapici, come GEM, anche nel caso dei tumori pancreatici non solo migliora l'efficienza della terapia, ma non provoca gravi reazioni avverse. Questa strategia combinata di trattamento, quindi, come mostrano i dati statistici illustrati in seguito, dovrebbe essere ampiamente utilizzata clinicamente.

Per dimostrare l'efficacia di questa strategia combinata sono stati fatti vari set di sperimentazione.

Il primo set conteneva 6 studi con 2223 pazienti affetti da tumore al pancreas. Poiché non vi era alcuna eterogeneità significativa, è stata condotta una meta-analisi utilizzando un modello a effetti fissi. Il tasso di risposta obiettiva è risultato pari a 1,10, indicando che non vi è alcuna differenza significativa tra il tasso di risposta della terapia di combinazione e della sola chemioterapia.

Il secondo set più significativo conteneva 4 studi e 1022 pazienti. Essendo caratterizzato da un'eterogeneità non significativa, svolgendo la meta-analisi si è calcolato un tasso di sopravvivenza libera da progressione del tumore pari a 0,87, indicando che la sopravvivenza a seguito del trattamento combinato è più lunga di quella della sola chemioterapia.⁵¹

Per quanto riguarda, invece, l'analisi degli effetti collaterali tra tutti gli studi, solo 7 sono stati inclusi nell'analisi degli eventi avversi di grado ≥ 3 , mentre gli studi con dati insufficienti sono stati esclusi dall'analisi.

Il tasso cumulato di diarrea, nausea, vomito tra il gruppo di trattamento combinato e il gruppo di chemioterapia era rispettivamente di 1,09, 1,31, 1,54, 1,36 e 1,52.

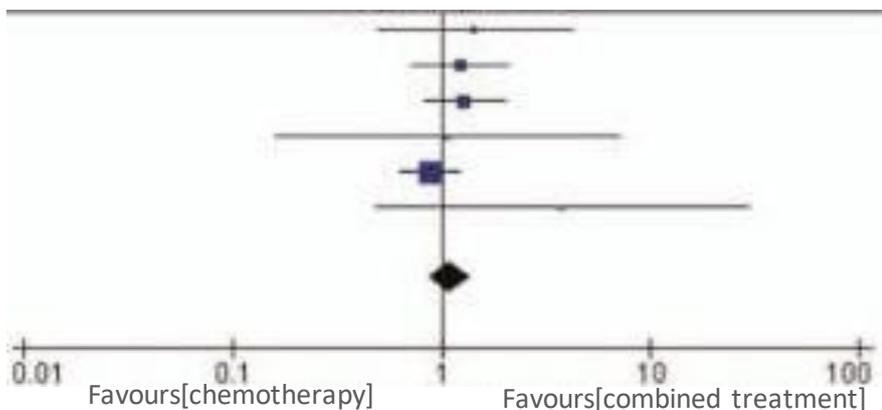


Figura 11: Rappresentazione grafica dei risultati

I risultati, quindi, hanno mostrato che l'incidenza del vomito nella terapia di combinazione era superiore a quella della sola chemioterapia.⁵¹

4.5 Tumore alla prostata

Il tumore alla prostata costituisce il 20% di tutti i casi di cancro riscontrati nei soggetti di sesso maschile. (Fig.2, Capitolo 1)

Una prima cura è stata trovata con il vaccino RNAActive di CureVac, descritto nel **Capitolo 3**.

In particolare, sono stati condotti studi di fase I/II, in cui l'RNAActive ha suscitato risposte immunitarie favorevoli e prolungata sopravvivenza del paziente.

Durante la sperimentazione clinica, 44 pazienti hanno ricevuto fino a 5 vaccinazioni intradermiche.

Nella fase I, tre livelli di dose di mRNA sono stati testati su gruppi di pazienti, formati da minimo 3 o al massimo 6 persone, per determinare la dose raccomandata.

Nella fase II, 32 pazienti aggiuntivi sono stati trattati somministrandogli solo la dose raccomandata. L'obiettivo primario era la sicurezza e la tollerabilità, il secondario era l'induzione di risposte immunitarie antigene-specifiche monitorate al basale e alle settimane 5, 9 e 17.

Gli eventi avversi registrati più frequentemente sono stati eritemi di grado 1/2 al sito di iniezione, reazioni al sito di iniezione, affaticamento, piressia, brividi e malattie simil-influenzali. In 3 pazienti si è verificata ritenzione urinaria possibilmente correlata al trattamento.

La dose raccomandata era di 1280 µg. Un totale di 26/33 pazienti valutabili trattati a 1280 µg ha sviluppato una risposta immunitaria; in 15 su 33 pazienti la risposta è risultata essere diretta contro più antigeni.

Nel sottogruppo di 36 pazienti metastatici, la stima Kaplan-Meier della sopravvivenza globale mediana era di 31,4 mesi.⁵²

Quanto esposto finora risulta essere molto promettente per cui attualmente è in corso una fase di sperimentazione IIb in uno studio randomizzato per valutare il beneficio clinico indotto da questo nuovo approccio vaccinale.

4.6 Carcinoma polmonare

Il cancro ai polmoni risulta essere la principale causa di morte nei soggetti sia di sesso maschile che femminile, con una percentuale pari al 24% e 23% rispettivamente sul totale di casi annui registrati.

(Fig.2, Capitolo 1)

Nello specifico, il carcinoma polmonare avanzato non a piccole cellule (NSCLC) rappresenta una significativa esigenza medica non soddisfatta.

Nonostante i progressi con le terapie mirate in un piccolo sottogruppo di pazienti, meno del 20% dei pazienti sopravvive per più di due anni dopo la diagnosi.

CV9202 è un vaccino mRNA autoadiuvante (RNAactive, **Capitolo 3**) che prende di mira sei antigeni comunemente espressi nel NSCLC (NY-ESO-1, MAGEC1, MAGEC2, 5 T4, survivin, and MUC1).

Lo studio condotto ha valutato la sicurezza e la tollerabilità della vaccinazione CV9202 combinata con radioterapia locale progettata per migliorare le risposte immunitarie; ha incluso pazienti con carcinoma al IV stadio e con una risposta o malattia stabile dopo un trattamento di chemioterapia di prima linea.

Tutti i pazienti hanno ricevuto due vaccinazioni iniziali con CV9202 prima della radioterapia locale seguite da ulteriori vaccinazioni fino alla progressione della malattia.⁵³

Analizzando i singoli passaggi condotti nello studio, i 36 pazienti, scelti in questa quantità sulla base di precedenti osservazioni con vaccini predecessori di CV9202, hanno iniziato lo screening due settimane dopo il giorno 1 dell'ultimo ciclo della chemioterapia di prima linea.

Successivamente, sono stati vaccinati due volte con CV9202, al giorno 1 e al giorno 8, prima di iniziare la radioterapia il giorno successivo (giorno 9).

Ciascuno dei sei componenti di CV9202 è stato somministrato singolarmente con due iniezioni intradermiche (rispettivamente nella parte interna della parte superiore delle braccia o delle cosce) per un totale di 12 iniezioni distribuite sui quattro arti; per una dose totale di 1920 µg mRNA (sei composti × 320 µg mRNA per composto) per punto temporale della vaccinazione.

La radioterapia è stata somministrata in quattro frazioni giornaliere di 5 GY dal giorno 9 al giorno 12. Le lesioni eleggibili per le radiazioni sono quelle che misurano ≥ 2 cm nel diametro più lungo per le lesioni linfonodali o ≥ 1 cm per le lesioni non linfonodali.

Chiaramente, una scansione TC di pianificazione del trattamento è stata utilizzata per definire il volume macroscopico della lesione selezionata (GTV), il volume target clinico (CTV), e il volume target di pianificazione (PTV).⁵³

In conclusione, è chiaro come lo studio sia stato ricco di passaggi non piacevoli per il paziente, motivo per cui si stanno conducendo ulteriori studi per far sì che, in futuro, la combinazione di più tecniche permetterà di migliorare la preparazione e la consegna della vaccinazione contro il cancro a mRNA, rendendola così una scelta sicura ed efficace per tutti i pazienti.

L'obiettivo primario dello studio era stabilire il numero di pazienti che manifestavano eventi avversi, correlati al trattamento, di Grado >3. Di seguito, sono state effettuate le analisi farmacodinamiche che comprendevano la valutazione delle risposte immunitarie agli antigeni codificati da CV9202 e altri non inclusi nel pannello (diffusione dell'antigene) e valutazioni di efficacia standard. Tutto questo è stato fatto durante il periodo di follow-up che per tutti i pazienti terminava 18 mesi dopo l'inizio del trattamento dell'ultimo paziente arruolato.

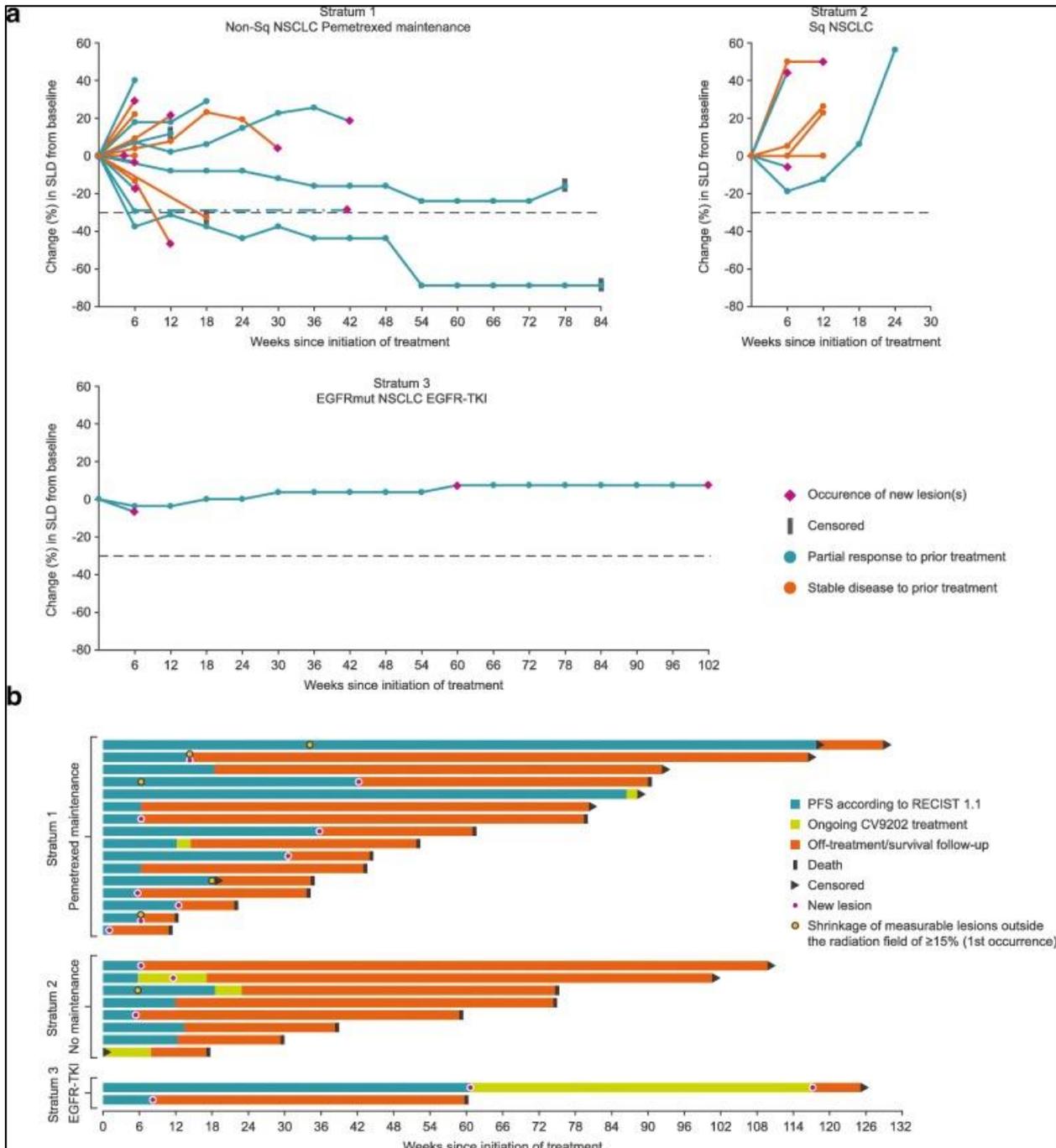


Figura 12: Risultati di efficacia dopo immunoterapia combinata con radioterapia locale. A) Modifica della lesione target con la somma dei diametri più lunghi (SLD) rispetto ai valori basali. B) Sopravvivenza, sopravvivenza libera da progressione e cinetica di risposta dei singoli pazienti. ⁵⁷

Analizzando i risultati ottenuti, non sono state osservate tossicità dose-limitanti o eventi avversi gravi; solo tre (7%) pazienti hanno manifestato un evento avverso di grado ≥ 3 che è stato considerato potenzialmente correlato al trattamento.

Risposte immunitarie antigene-specifiche sono state osservate in oltre i due terzi dei pazienti.

È importante sottolineare che la conta delle cellule Treg non è aumentata durante il trattamento.

Tuttavia l'esperienza clinica con le combinazioni radioterapia-vaccino, ad oggi, rimane estremamente limitata.

5. CONCLUSIONI

Nella trattazione sovraesposta emerge chiaramente l'importanza che, nell'ultimo decennio, hanno assunto i biomateriali nella lotta contro il cancro.

Le eterogeneità che caratterizzano questa malattia, da secoli fonte di innumerevoli problematiche, di fatto sono risultate essere commisurate con la quantità a dir poco sorprendente di biomateriali che si possono ottenere in laboratorio. Questa possibilità ha permesso di avanzare nel campo della ricerca e di sviluppare cure più efficienti ed efficaci.

Inoltre, l'utilizzo combinato dei biomateriali con fattori caratterizzanti il sistema immunitario, al fine di ottenere dei vaccini somministrabili in maniera sicura, è stata un'ulteriore svolta che ha permesso di riattivare l'immunità dell'organismo facendola nuovamente funzionare in maniera corretta e non più dettata dall'ambiente tumorale.

In **figura 13** sono raffigurate le principali strategie di applicazioni biomateriali nell'immuno-oncologia.

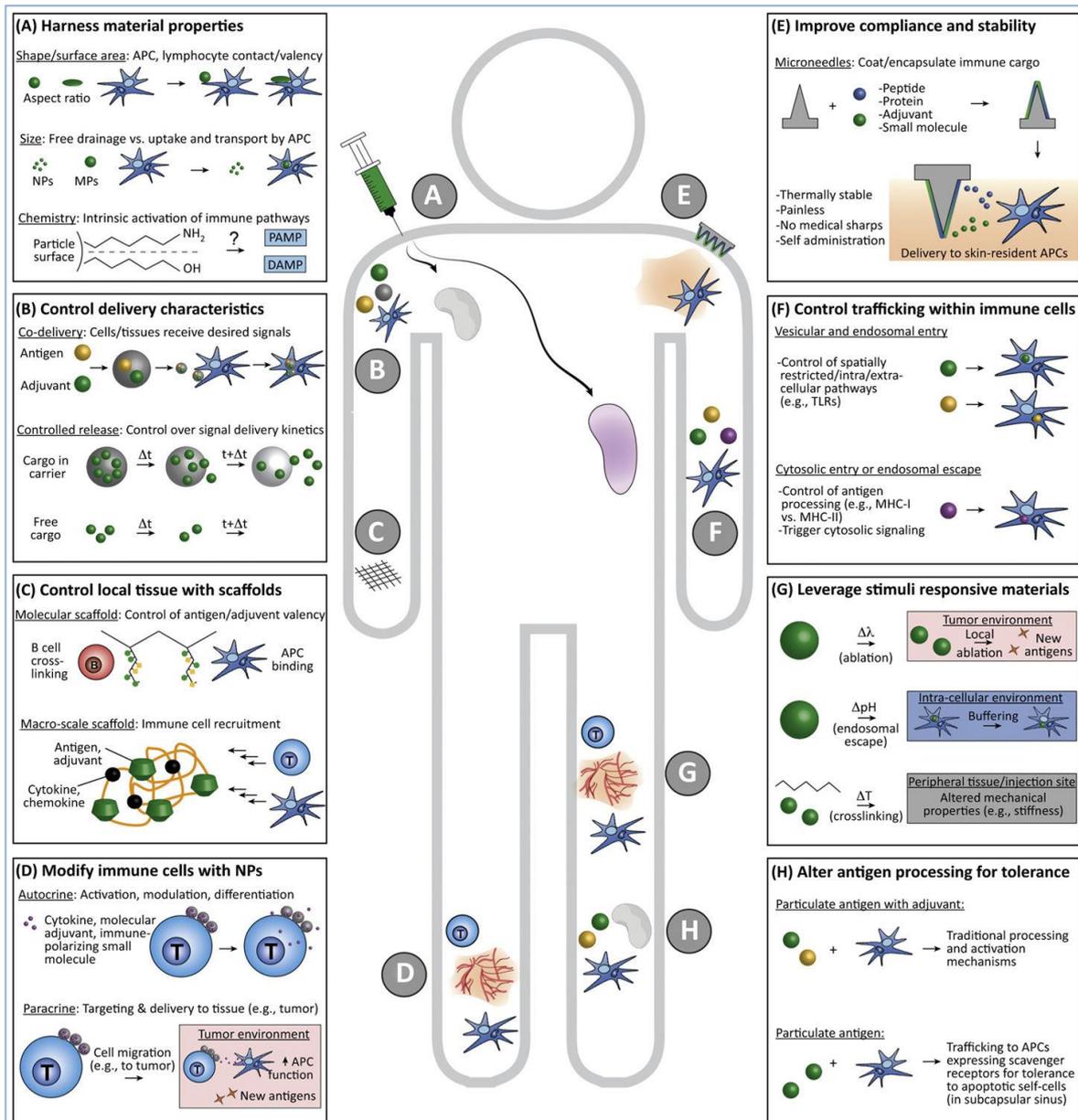


Figura 13: Strategie che coinvolgono i biomateriali per l'ingegneria della funzione immunitaria

(A) La forma, le dimensioni, la chimica e altre proprietà fisico-chimiche del materiale influenzano il drenaggio attraverso i vasi linfatici, le interazioni con gli APC e l'immunogenicità intrinseca di molti polimeri comuni. (B) I biomateriali possono essere utilizzati per controllare le combinazioni e le relative concentrazioni di carichi immunitari che raggiungono APC e linfociti o, progettando polimeri con un tasso di degradazione desiderato, la cinetica di consegna del carico. (C) Gli scaffold possono essere utilizzati per controllare il contesto o la densità in cui vengono visualizzati antigeni e adiuvanti e come ambienti locali per reclutare APC e linfociti. (D) Le cellule T, APC e altre cellule immunitarie possono essere modificate con nanoparticelle che incorporano segnali immunitari per esercitare effetti autocrini sulle cellule modificate o per esercitare effetti paracrini sulle cellule bersaglio e sui tessuti verso i quali la cellula modificata migrerà (ad es. tumore). (E) I microaghi rivestiti o incorporanti segnali immunitari aumentano la sicurezza e la compliance del paziente mirando in modo efficiente alle cellule immunitarie residenti sulla pelle senza dolore, generazione di taglianti medici o necessità di refrigerazione. (F) I vettori di biomateriali possono essere progettati con frazioni specifiche per controllare l'ingresso cellulare e il traffico intracellulare per dirigere processi immunitari spazialmente ristretti (ad es. Segnalazione TLR ed elaborazione dell'antigene). (G) I materiali sensibili agli stimoli possono sfruttare segnali fisiologici (ad esempio, variazioni di pH o temperatura) o esterni (ad esempio, luce UV) per fornire un controllo specifico dell'ambiente all'interno delle cellule, bersaglio tessuti o tumori (ad esempio, accesso a neoantigeni durante l'ablazione locale abilitata da NP tramite esposizione fototermica). (H) NP e MP possono alterare il modo in cui gli antigeni vengono elaborati per modulare le risposte lontano da proimmune e verso la regolazione.

Abbreviazioni: APC, cellula presentante l'antigene; MP, microparticelle; NP, nanoparticelle; TLR, recettore Toll-like.³

Seppur queste applicazioni siano ben più promettenti delle terapie convenzionali, tuttavia i reali risultati ottenuti in clinica risultano essere ancora migliorabili, in quanto, la quasi totale assenza di effetti collaterali è una diretta conseguenza della bassa efficacia dei vaccini stessi.

È chiaro, quindi, che i risultati ottenuti in laboratorio vanno perfezionati affinché nelle applicazioni cliniche si possano sfruttare le massime potenzialità dei biomateriali e dei vaccini stessi.

Innanzitutto, per far questo, sono da prendere in considerazione le differenze tra i sistemi immunitari dei piccoli animali rispetto ad animali più grandi fino ad arrivare agli umani.

Non di minore importanza sono i fattori legati alla capacità di produzione dei vaccini su larga scala e al controllo di qualità che chiaramente devono essere affrontati prima che i vaccini a base di biomateriali possano essere ampiamente commercializzati.⁴

Una strategia per migliorare il potenziale di traduzione clinica è quello di sviluppare tecnologie di consegna comprendenti materiali già approvati dalla FDA, di modo da ridurre la lunghezza del processo di approvazione.²⁶

Un esempio è il vaccino contro il melanoma (WDVAX) basato su scaffold di PLGA, descritto nel **Capitolo 4**, dove è importante notare come l'utilizzo di un materiale, in questo specifico caso il PLGA, già precedentemente approvato dall'FDA per altre applicazioni biomediche, abbia portato all'approvazione di un vaccino in tempi molto minori del previsto.¹⁷

Inoltre, utilizzare dati degli studi clinici esistenti e futuri, per confrontare l'efficacia del vaccino tra sottogruppi di pazienti, può consentire un'ottimizzazione dei vaccini più rapida, in base anche al confronto

di determinati fattori come l'espressione dei biomarcatori sia nei vari tipi di cancro che in pazienti accomunati dalla stessa tipologia.

Come prova di ciò, recentemente, è stato scoperto come l'identificazione di sequenze di antigeni tumorali specifiche per ogni paziente sia un passaggio cruciale per migliorare l'efficacia del vaccino contro il cancro.

Infatti, proprio grazie al confronto tra dati di diversi studi clinici è stato possibile scoprire come questa malattia sia caratterizzata non solo da un'eterogeneità inter-tumorale ma anche da una intra-tumorale.

Per essere più chiari, purtroppo, sviluppare vaccini specifici per ogni tipologia di tumore (melanoma, cancro al seno, ai polmoni, al cervello...) non è sufficiente per sradicare la malattia.

Il motivo per cui molti vaccini già testati sui pazienti non mostrano i risultati aspettati non è dovuto solo a problematiche fisico-chimiche del vaccino, che come abbiamo visto, ad oggi, sono risolvibili tramite l'utilizzo dei biomateriali, che possono essere sfruttati per addestrare il sistema immunitario ad attaccare selettivamente le cellule tumorali, evitando possibilmente gli effetti fuori bersaglio e la potenziale tossicità caratterizzante i vaccini tradizionali, ma sono anche il risultato dell'eterogeneità intra-tumorale, ovvero la capacità della stessa tipologia di cancro di assumere caratteristiche e comportamenti diversi tra i vari pazienti nonostante questi risultino avere, teoricamente, la stessa malattia.

Negli attuali approcci testati per formulare vaccini antitumorali personalizzati, vengono estratti DNA e RNA da cellule normali e da cellule tumorali.⁷

Successivamente, viene condotto il sequenziamento dell'intero esosoma (WES) e il sequenziamento dell'RNA (RNA-seq) per identificare i geni mutati e i loro corrispondenti antigeni mutati. Poi, viene eseguita la tipizzazione dell'antigene leucocitario umano (HLA) per determinare quali geni mutati hanno una forte affinità di legame nel paziente e per prevedere e personalizzare i neoantigeni del vaccino contro il cancro.¹⁸

Infine, i neoantigeni selezionati sono sintetizzati e combinati con altri immunomodulatori (es. adiuvanti) e insieme ai veicoli biomateriali di consegna contribuiscono a creare la formulazione finale del vaccino.²³

Un recente studio ha dimostrato che l'uso dei nanodischi, un nuovo biomateriale per la somministrazione del vaccino, per fornire i neoantigeni previsti nel vaccino ha un potenziale significativo come terapia del cancro.¹⁹

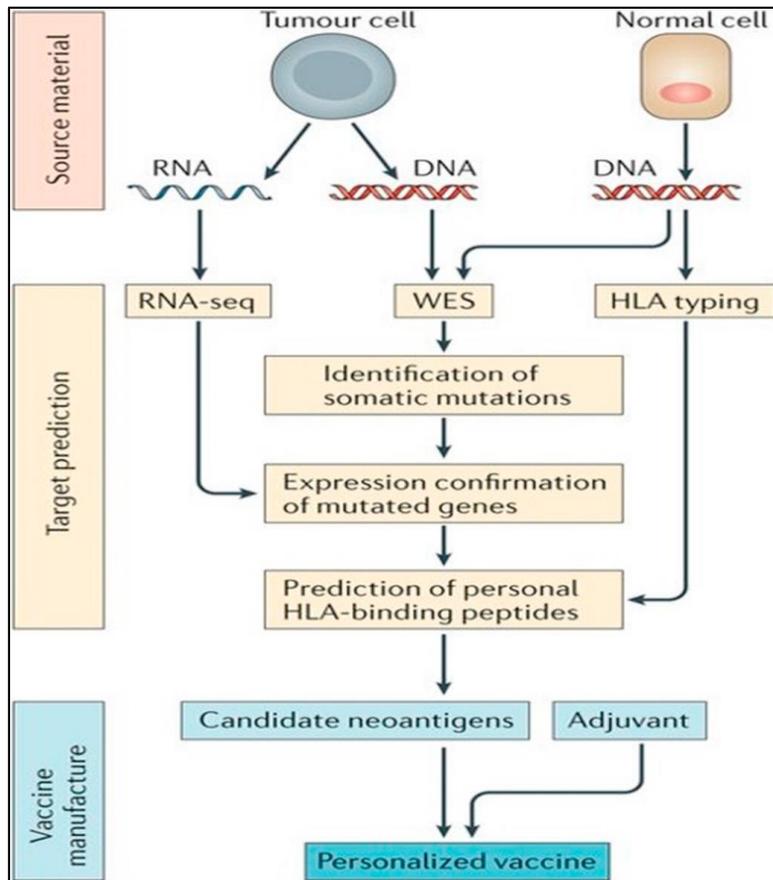


Figura 14: Schema della selezione del neoantigene e formulazione del vaccino antitumorale personalizzato.⁷

Gli antigeni mutati sono selezionati mediante sequenziamento dell'intero esoma, sequenziamento dell'RNA e tipizzazione HLA. Gli epitopi selezionati vengono sintetizzati e formulati con altri immunomodulatori, producendo vaccini contro il cancro personalizzati.

È chiaro, quindi, come lo studio immuno-oncologico sia a dir poco complesso per cui necessita di continue collaborazioni tra i vari campi della scienza per progettare vaccini contro il cancro più sicuri, efficaci e traducibili per i singoli pazienti.⁴

Tenendo conto di ciò, infatti, di seguito, sono illustrate alcune domande che rimangono in sospeso nell'ambito dei biomateriali in relazione ai vaccini e alle immunoterapie.

I biomateriali possono eliminare la necessità di vaccinazioni multiple attraverso il rilascio controllato del carico?

Quali sono gli effetti a lungo termine dei biomateriali sullo sviluppo e la progressione della malattia poiché questi materiali persistono e si degradano a sottoprodotti specifici e ci sono considerazioni in merito alle esposizioni multiple nel corso della vita?

Inoltre, non è chiaro con quanta facilità i vaccini e le immunoterapie biomateriali possano essere estesi all'uomo, dai modelli murini utilizzati nella maggior parte degli studi.

Deve essere sviluppato anche l'impatto delle proprietà fisico-chimiche dei materiali su specifiche vie immunitarie.³

Tuttavia, i biomateriali consentono ad antigeni, adiuvanti o immunomodulatori un migliore controllo sulle risposte e possono essere utilizzati per indirizzare questi segnali a particolari tessuti o per modificare cellule immunitarie o agenti patogeni.

Ognuna di queste idee viene esplorata evidenziando un'ultima caratteristica dei biomateriali: sono piattaforme tecnologiche che possono essere estese ad una grande varietà di malattie.

Per cui, un obiettivo fondamentale da raggiungere è sviluppare una comprensione fondamentale e generale, necessaria per creare regole di progettazione al fine di selezionare dei materiali che consentano strategie efficienti ed efficaci che accelerino la traduzione in clinica.

6. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Jie Li, Yiqian Luo, Baoqin Li, Yuanliang Xia, Hengyi Wang and Changfeng Fu, “Implantable and Injectable Biomaterial Scaffolds for Cancer Immunotherapy”, *Front. Bioeng. Biotechnol* (2020)
- ² David G. Leach, Simon Young, and Jeffrey D. Hartgerink, “Advances in immunotherapy delivery from implantable and injectable biomaterials”, *Acta Biomater.* (2019)
- ³ Michelle L. Bookstaver, Shannon J. Tsai, Jonathan S. Bromberg, and Christopher M. Jewell, “Improving Vaccine and Immunotherapy Design Using Biomaterials”, *Trends Immunol.* (2018)
- ⁴ Rui Zhang, Margaret M. Billingsley, Michael J. Mitchell, “Biomaterials for vaccine-based cancer immunotherapy”, *Journal of Controlled Release* (2018)
- ⁵ D.S. Chen, I. Mellman, “Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle”, *Immunity* 39 (2013)
- ⁶ Piotr S. Kowalski, Arnab Rudra, Lei Miao, and Daniel G. Anderson, “Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery”, *Molecular Therapy* (2019)
- ⁷ ZHU, P.A. Ott, C.J. Wu, “Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer”, *Nat. Rev. Immunol.* 18 (2018)
- ⁸ Chen X, et al. “Shape-dependent activation of cytokine secretion by polymer capsules in human monocyte-derived macrophages”. *Biomacromolecules.* (2016)
- ⁹ Hixon KR, Lu T, Sell SA, “A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications”, *Acta Biomater* 62 (2017)
- ¹⁰ Sun L, Zheng C, Webster TJ, “Self-assembled peptide nanomaterials for biomedical applications: promises and pitfalls”, *Int. J. Nanomed* 12 (2017).
- ¹¹ N. Pardi, M.J. Hogan, F.W. Porter, D. Weissman, “mRNA vaccines—a new era in vaccinology”, *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (2018)
- ¹² D. Fritz, F. Vascotto, H. Hefesha, “Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy”, *Nature* 534 (2016)

- ¹³ J.E. Dahlman, K.J. Kauffman, Y. Xing, T.E. Shaw, F.F. Mir, C.C. Dlott, R. Langer, D.G. Anderson, E.T. Wang, "Barcoded nanoparticles for high throughput in vivo discovery of targeted therapeutics", *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2017)
- ¹⁴ H. Wang, D.J. Mooney, "Biomaterial-assisted targeted modulation of immune cells in cancer treatment", *Nat. Mater.* 1 (2018)
- ¹⁵ L. Gu, D.J. Mooney, "Biomaterials and emerging anticancer therapeutics: engineering the microenvironment", *Nat. Rev. Cancer* 16 (2016)
- ¹⁶ A.W. Li, M.C. Sobral, S. Badrinath, Y. Choi, A. Graveline, A.G. Stafford, J.C. Weaver, M.O. Dellacherie, T.-Y. Shih, O.A. Ali, "A facile approach to enhance antigen response for personalized cancer vaccination", *Nat. Mater.* 17 (2018)
- ¹⁷ ClinicalTrials.Gov, "Dendritic Cell Activating Scaffold in Melanoma", NIH U.S. National Library of Medicine (2018)
- ¹⁸ Y. Guo, K. Lei, L. Tang, "Neoantigen vaccine delivery for personalized anticancer immunotherapy", *Front. Immunol.* 9 (2018)
- ¹⁹ R. Kuai, L.J. Ochyl, K.S. Bahjat, A. Schwendeman, J.J. Moon, "Designer vaccine nanodiscs for personalized cancer immunotherapy", *Nat. Mater.* 16 (2017)
- ²⁰ C. Bharti, U. Nagaich, A.K. Pal, N. Gulati, "Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: a review", *Int. J. Pharmaceut. Invest.* 5 (2015)
- ²¹ Shimasaki et al., "NK cells for cancer immunotherapy", *Nat Rev Drug Discov.* (2020)
- ²² Raquel Tarazona et al., "Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy", *Cancer Immunol. Immunother.* (2020)
- ²³ Ying Zhang et al., "Cancer vaccines: Targeting KRAS-driven cancers", *Expert Rev Vaccines* (2020)
- ²⁴ Changping Ruan et al., "Nanomaterials for tumor hypoxia relief to improve the efficacy of ROS-generated cancer therapy", *Front Chem.* (2021)
- ²⁵ Qian Chen et al., "In situ sprayed bioresponsive immunotherapeutic gel for post-surgical cancer treatment", *Nat Nanotechnol.* (2019)
- ²⁶ D. Bobo, K.J. Robinson, J. Islam, K.J. Thurecht, S.R. Corrie, "Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date", *Pharm. Res.* 33 (2016).

- ²⁷ Siegel RL, Miller KD, Jemal A, "Cancer statistics", *CA: A Cancer J. Clin* 68 (2018)
- ²⁸ S. Jane Henley, Elizabeth Ward et al., "Annual report to the nation on the status of cancer, Part 1: National cancer statistics", *Cancer* (2020)
- ²⁹ Rebecca L. Siegel et al., "Cancer Statistics, 2019", *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (2019)
- ³⁰ S. Jane Henley, Cheryl C. Thomas et al., "Annual report to the nation on the status of cancer, Part 2: Progress toward Healthy People 2020 objectives for 4 common cancers", *Cancer* (2020)
- ³¹ Yu Liu, Wei Wu et al., "Recent development of gene therapy for pancreatic cancer using non-viral nanovectors", *Biomaterials science* (2021)
- ³² Laura Padilla et al., "Interprofessional Image Verification Workshop for Physician and Physics Residents: A Multi-Institutional Experience", *International journal of radiation oncology, biology, physics* (2021)
- ³³ Louiza S Velentzis et al., "Menopausal hormone therapy: Characterising users in an Australian national cross-sectional study", *PLoS One* (2021)
- ³⁴ Maura Abbott et al., "Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy", *Seminars in Oncology Nursing* 35 (2019)
- ³⁵ Sharma P., Ribas A. et al., "Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunity", *Cell* (2017)
- ³⁶ Oiseth SJ, Aziz MS., "Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead", *Cancer Metastasis Treatment* (2017)
- ³⁷ Gasparri ML, Ruscito L, Taghavi K, et al., "The immunobiology of cancer: from tumor escape to cancer immunoediting towards immunotherapy in gynecologic oncology", *Molecular oncology: underlying mechanisms and translational advancements* (2017)
- ³⁸ Qingle Song et al., "Reinforcing the Combinational Immuno-Oncotherapy of Switching "Cold" Tumor to "Hot" by Responsive Penetrating Nanogels", *ACS materials & interfaces* (2021)
- ³⁹ Abhishek Mohanty et al., "Liquid Biopsy, the hype vs. hope in molecular and clinical oncology", *Seminars in Oncology* (2021)
- ⁴⁰ Zeng Q, et al., "In vivo expansion of melanoma-specific T cells using microneedle arrays coated with immune-polyelectrolyte multilayers", *ACS Biomaterial Science Engineering* (2017)
- ⁴¹ D.-F.C. Institute, NCT01753089, "Dendritic Cell Activating Scaffold in Melanoma, National Institute of Health", *ClinicalTrials.gov* (2012)

- ⁴² Li Y, Fang M, Zhang J, Wang J, Song Y et al., "Hydrogel dual delivered celecoxib and anti-PD-1 synergistically improve antitumor immunity", *Oncol Immunology* 5 (2015)
- ⁴³ Rosalie M. Sterner et al., "GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts", *Blood* (2019)
- ⁴⁴ S.A. Bencherif, R.W. Sands et al., "Injectable cryogel-based whole-cell cancer vaccines", *Nat. Commun.* 6 (2015)
- ⁴⁵ A.V. Kroll, R.H. Fang, Y. Jiang, et al., "Nanoparticulate delivery of cancer cell membrane elicits multi-antigenic antitumor immunity", *Adv. Mater.* (2017)
- ⁴⁶ Y. Fan, R. Kuai, Y. Xu et al., "Immunogenic cell death amplified by co-localized adjuvant delivery for cancer immunotherapy", *Nano Lett.* (2017)
- ⁴⁷ Chen Q, et al., "Photothermal therapy with immune-adjuvant nanoparticles together with checkpoint blockade for effective cancer immunotherapy", *Nat Commun.* (2016)
- ⁴⁸ Huang B, et al., "Active targeting of chemotherapy to disseminated tumors using nanoparticle-carrying T cells." *Sci Transl Med.* (2015)
- ⁴⁹ Smith TT, et al., "In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers" *Nat Nanotechnol.* (2017)
- ⁵⁰ Zhan Q, Shen B et al., "Drug-eluting scaffold inhibited in vivo pancreatic tumorigenesis by engaging murine CCR4+CD8+ T cells", *Colloids Surf.* (2017)
- ⁵¹ Yang Huang, Xu Yan et al., "The safety and efficacy of chemotherapy combined with immunotherapy for pancreatic cancer: A meta-analysis", *Medicine (Baltimore)* (2021)
- ⁵² H. Kubler, B. Scheel, U. Gnad-Vogt et al., "Self-adjuvanted mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: a first-in-man phase I/IIa study", *J. Immunother. Cancer* 3 (2015)
- ⁵³ M. Sebastian, A. Papachristofilou, C. Weiss et al., "Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive®) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer", *BMC Cancer* 14 (2014)

- ⁵⁴ Fei Wang, Junbin Gao et al., “Near infrared light activation of an injectable whole-cell cancer vaccine for cancer immunoprophylaxis and immunotherapy”, *Biomaterial Science* (2021)
- ⁵⁵ Hanze Hu, Chao Yang et al., “A Versatile and Robust Platform for the Scalable Manufacture of Biomimetic Nanovaccines”, *Advanced Science*(Weinheim) (2021)
- ⁵⁶ Nisarg J Shah, Alexander J Najibi et al., “A biomaterial-based vaccine eliciting durable tumour-specific responses against acute myeloid leukaemia”, *Nature Biomedical Engineering* (2020)
- ⁵⁷ Alexandros Papachristofilou, Madeleine M Hipp et al., “Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer”, *Journal for immunotherapy of cancer* (2019)

RINGRAZIAMENTI

Sono giunta al traguardo.

Ammetto di esserne ancora incredula.

Oggi voglio solo dirvi grazie.

In primo luogo, vorrei ringraziare il professor Joseph Lovecchio per avermi guidato e supportato in questa fase finale del mio percorso accademico permettendomi di approfondire un argomento a me particolarmente caro e che è sempre stato fonte di grande interesse e studio.

Ringrazio tutti i miei compagni di viaggio per avermi reso il tragitto molto meno faticoso, per essermi stati vicini, anche quando non era fisicamente possibile, e per avermi fatto vivere 3 anni incredibilmente belli.

In particolare voglio ringraziare Vittoria, che è rimasta la mia compagna di avventure dall'inizio alla fine.

Eugenio, uno dei miei primi amici qui a Cesena nonché compagno di tramonti e tisane a gusti improbabili.

I gruppi "out-fit" e "sbregiz" che tra risate e lacrime hanno rallegrato per mesi interi le mie giornate.

Giulietta, che seppur a chilometri di distanza mi è sempre stata accanto con i suoi "in bocca al lupo" prima di ogni esame, e le mie Federiche con cui avrei voluto poter condividere più tempo e tramonti ma che rimarranno comunque sempre le mie coinquiline speciali.

Tutte queste persone mi hanno aiutato tanto e so che, in modi diversi, faranno sempre parte della mia vita.

Allo stesso tempo, però, se sono qui oggi è soprattutto grazie ai miei genitori che mi hanno sempre supportato e sopportato. Mi hanno sempre aiutato nei momenti di difficoltà e non hanno mai smesso di avere fiducia in me, persino quando io stessa non ne avevo, per cui sono consapevole che è grazie a loro se sono giunta a questo traguardo.

Infine, ringrazio la mia sorellina che mi ha sempre fatto compagnia e rallegrato nonostante i chilometri di distanza.

Probabilmente tutte queste parole non rendono l'affetto, la gratitudine e l'immensa gioia che realmente provo in questo momento ma le infinite emozioni che sto provando non mi permettono di fare di meglio.

Ad ogni modo, ringrazio ancora tutti per essere qui con me oggi a condividere questo giorno speciale.