

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA**

**TESI DI LAUREA**

**Farmaci biologici: dalla scoperta al loro impiego  
nelle patologie cardiovascolari**

**RELATORE: CHIAR.MA PROF.SSA Guglielmina Frolidi**

**LAUREANDO: Jessica Marcolongo**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



# INDICE

## Sommario

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introduzione .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Le patologie cardiovascolari .....   | 1         |
| 1.2 Fattori di rischio .....   | 2         |
| 1.3 Trattamento farmacologico .....  | 3         |
| 1.4 Strategie emergenti.....   | 4         |
| <br>   |           |
| <b>2. Anticorpi monoclonali .....</b>  | <b>5</b>  |
| 2.1 Aspetti generali .....   | 5         |
| 2.1.1 Tecnica dell'ibridoma.....   | 6         |
| 2.1.2 Tecnica odierna di produzione .....  | 9         |
| 2.1.3 Indicazioni approvate degli anticorpi monoclonali .....                        | 12        |
| 2.1.4 Differenze tra mAbs e piccole molecole .....                                   | 14        |
| 2.2 Sviluppi di mAbs nelle patologie cardiovascolari.....                            | 15        |
| 2.2.1 Patogenesi dell'aterosclerosi .....  | 20        |
| 2.2.2 Anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9.....                                  | 21        |
| 2.2.3 Infiammazione: ruolo dell'inflammasoma .....                                   | 23        |
| <br>   |           |
| <b>3. Terapia genica .....</b>   | <b>26</b> |
| 3.1 Aspetti generali .....   | 26        |
| 3.1.1 Scelta dei vettori per il trasferimento genico .....                           | 30        |
| 3.1.2 Virus adeno-associati.....   | 30        |
| 3.1.3 Adenovirus .....   | 31        |
| 3.1.4 Retrovirus.....  | 33        |
| 3.1.5 Lentivirus .....   | 34        |
| 3.1.6 Herpes Virus.....  | 34        |
| 3.1.7 Modalità di somministrazione del transgene.....                                | 36        |
| 3.2 Sviluppi della terapia genica nelle CVD.....                                     | 38        |
| 3.2.1 SERCA2A come bersaglio di <i>gene therapy</i> .....                            | 42        |
| 3.2.2 Ruolo di miRNA-1 e miRNA-21 nelle complicanze post infarto del miocardio ..... | 44        |
| 3.2.3 ELA <i>gene therapy</i> .....  | 48        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4. Terapia cellulare.....</b>                                     | <b>50</b> |
| 4.1 Definizioni .....  | 50        |
| 4.2 Terapia cellulare staminale.....                                 | 51        |
| 4.2.1 Origine delle cellule staminali.....                           | 52        |
| 4.3 Aspetti farmacologici nella terapia cellulare cardiaca.....      | 56        |
| 4.4 Sviluppi della terapia cellulare nelle patologie cardiache ..... | 57        |
| 4.5 L'ingegneria tissutale .....                                     | 62        |
| 4.5.1 Biomateriali e il loro impiego nelle CVD .....                 | 63        |
| <br>   |           |
| <b>5. Conclusioni .....</b>  | <b>65</b> |
| <br>   |           |
| <b>6. Bibliografia.....</b>  | <b>67</b> |



## **Sommario**

I farmaci biologici stanno emergendo come valida alternativa ai trattamenti standard in molteplici patologie che colpiscono l'organismo umano; tuttavia, la loro applicazione a livello cardiovascolare è ancora limitata. Questo lavoro di tesi analizza le peculiarità degli anticorpi monoclonali e dei medicinali per le terapie avanzate quali i prodotti di terapia genica e la terapia cellulare. Sono descritti sia aspetti generali relativi alla farmacologia sia gli ambiti di applicazione approfondendo anche i dati presenti nella letteratura scientifica. Più in dettaglio sono descritti gli anticorpi monoclonali nel trattamento delle iperlipoproteinemie e nella fibrosi post-infarto insieme alle attuali conoscenze per il possibile impiego della terapia genica nel miglioramento degli eventi cardiaci. Infine, sono state evidenziate le strategie nell'ambito della terapia cellulare per il trattamento dell'insufficienza cardiaca. Nel complesso vengono fornite le basi per la comprensione del possibile sviluppo di questi farmaci innovativi nella cura delle patologie cardiovascolari.



# 1. Introduzione

## 1.1 Le patologie cardiovascolari

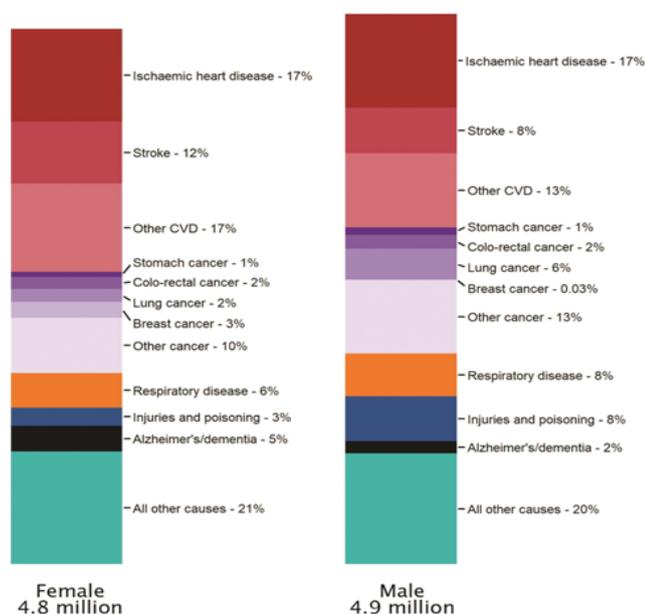
Le patologie cardiovascolari (CVD) rappresentano un gruppo di malattie che colpiscono il cuore e i vasi sanguigni<sup>1</sup>. Tra le principali si ricordano le patologie coronariche, le cerebrovascolari e l'arteriopatia periferica<sup>2</sup>.

La patologia coronarica ha inizio con la disfunzione dell'endotelio causata dalla progressiva formazione di placche aterosclerotiche che ostruiscono i vasi sanguigni responsabili della perfusione miocardica, provocando angina, infarto del miocardio o insufficienza cardiaca<sup>2,3</sup>. Il paziente avverte dolore con localizzazione substernale, compatibile con la diagnosi di angina, che può irradiarsi fino al collo o alla mascella. A questi sintomi se ne possono associare altri come nausea, vomito, palpitazioni fino ad arrivare alla morte improvvisa. Solitamente questi sintomi si aggravano con l'esercizio e si risolvono con il riposo o l'impiego del farmaco nitroglicerina<sup>2</sup>. Le malattie cerebrovascolari causate da una alterazione acuta della perfusione cerebrale comprendono l'attacco ischemico transitorio (TIA) e l'ictus che si differenziano per il tempo di risoluzione dei sintomi<sup>2,4</sup>. In particolare, mentre negli attacchi transitori in 24 ore si ha la remissione sintomatica, nell'ictus si manifesta una progressione sotto forma di disartria, debolezza delle estremità e paralisi facciale<sup>2</sup>. La malattia delle arterie periferiche, conosciuta comunemente come PAD (*Peripheral Arterial Disease*), è causata dall'occlusione parziale, spesso asintomatica, del flusso sanguigno nelle arterie degli arti<sup>5</sup>. Nei soggetti affetti da questa patologia, la richiesta di aumentare il flusso sanguigno durante l'esercizio fisico provoca nel paziente dolore muscolare simile a un crampo che tende ad attenuarsi a riposo. A tutto ciò si possono aggiungere modifiche nel colore della cute e della temperatura dell'arto interessato<sup>2</sup>.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), le patologie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte nel mondo e tre quarti dei casi si verificano nei Paesi con basso e medio reddito. I cittadini di queste nazioni sono i più colpiti in quanto non beneficiano di servizi sanitari efficaci ed equi. La diagnosi spesso è tardiva e le morti si verificano in giovane età. Infatti, l'OMS ha dichiarato che nel 2019, si sono verificate 17 milioni di morti premature (morti al di sotto dei 70 anni) dovute a malattie non trasmissibili; di queste, il 38% è associabile a patologie cardiovascolari<sup>6</sup>. Inoltre, l'OMS ha ribadito che, nello stesso anno, circa 17,9 milioni di persone sono morte a causa di patologie cardiovascolari corrispondenti al 32% delle morti a livello globale. Di queste, l'85% era dovuto a infarto e ictus<sup>6</sup>.

Un recente articolo pubblicato nel 2022 riguardante il *Progetto Atlas* della Società Europea di Cardiologia (ESC) ha ampliato il rapporto del 2019 riguardante le statistiche sulle malattie cardiovascolari dei 57 Paesi membri dell'ESC aggiungendo nuovi dati sociodemografici e ambientali riguardanti le malattie cardiovascolari<sup>7</sup>. L'articolo evidenzia che anche in Europa le malattie cardiovascolari rimangono la principale causa di morte attestando nel 2019 a poco meno di 2,2 milioni i decessi per le donne e poco più di 1,9 milioni i decessi per gli uomini. Questi dati corrispondono rispettivamente al 45% e al 39% di tutti i

decessi nei due sessi. Stratificando le morti per tipo di malattia, la cardiopatia ischemica rappresenta la morte più comune tra le patologie cardiovascolari costituendo il 38% di tutti i decessi per le femmine e il 44% di tutti i decessi per i maschi (**Figura 1**). L'ictus, invece, si attesta la seconda causa di morte più comune rappresentando il 26% di tutte le morti per patologie cardiovascolari nelle donne e il 21% negli uomini<sup>7</sup>.



**Figura 1** Cause di morte stratificate per genere nei Paesi membri europei nel 2019<sup>7</sup>.

## 1.2 Fattori di rischio

Sebbene esistano fattori di rischio sui quali non è possibile agire, come ad esempio età e sesso, è stato dimostrato che ne esistono altri su cui è possibile intervenire<sup>7,8</sup>. Tra questi, fattori ambientali, fattori clinici e stile di vita sono i principali determinanti del rischio per le patologie cardiovascolari<sup>7</sup>. Nello specifico, fanno parte dei fattori ambientali l'inquinamento atmosferico e il rumore che sono responsabili di circa il 75% delle malattie cardiache attribuibili a questa classe di rischio. Fumo, alcol, mancanza di esercizio fisico e dieta rappresentano invece fattori di rischio legati allo stile di vita. Fondamentali sono poi i fattori di rischio clinici tra i quali è importante ricordare ipertensione, ipercolesterolemia, obesità e diabete mellito<sup>7</sup>. L'ipertensione arteriosa, definita come principale fattore di rischio globale in questo contesto, ha una prevalenza di esposizione particolarmente elevata ed è associata a un rapporto di causalità per l'insorgenza di CVD tanto che è stata dimostrata l'esistenza di una correlazione lineare tra elevati livelli di pressione arteriosa e rischio di ictus o di infarto acuto del miocardio<sup>7,9</sup>.

Da non sottovalutare sono gli elevati livelli di colesterolo i quali sono associati a un aumento nel rischio di patologie cardiovascolari e, in particolar modo, all'aterosclerosi coronarica<sup>10</sup>. Tra i fattori di rischio anche l'obesità incide sul rischio di incorrere nelle patologie cardiovascolari sia come fattore indipendente sia come determinante favorente lo sviluppo del diabete mellito (DM). In particolare, il diabete mellito di tipo

II (DM2) colpisce circa 422 milioni di persone nel mondo di cui oltre 60 milioni in Unione Europea. Diverse sono le cause che possono comportare la sua insorgenza ma ciò che è significativo è che questa malattia raddoppia il rischio di morte cardiovascolare rispetto alle persone non diabetiche<sup>7</sup>.

### 1.3 Trattamento farmacologico

Gli interventi farmacologici attualmente disponibili variano in base alla natura dell'evento cardiovascolare. Brevemente, ad esempio, i farmaci ACE inibitori (*Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors*, ACEI) rappresentano il trattamento di prima linea nei pazienti affetti da insufficienza cardiaca, disfunzione ventricolare sinistra, infarto del miocardio, malattia renale cronica e ipertensione. Il loro effetto è dovuto all'inibizione dell'enzima ACE, il quale permette la conversione dell'angiotensina I (ANG I) in angiotensina II (ANG II). Una minor quantità di ANG II si traduce in una diminuzione della resistenza arteriolare, in un incremento di bradichinina e dunque della capacità venosa con successiva riduzione della gittata cardiaca. Un altro gruppo farmacologico è dato dagli antagonisti dei recettori dell'angiotensina II che generano sia vasodilatazione sia riduzione nella secrezione di aldosterone<sup>11,12</sup>. I farmaci antagonisti ai recettori beta-adrenergici generano un effetto inotropo e cronotopo negativi riducendo la frequenza cardiaca, il lavoro cardiaco e il consumo di ossigeno. Non rappresentano il trattamento di prima linea nell'ipertensione ma possiedono un effetto cardioprotettivo nei confronti dei pazienti di giovane età<sup>11,12</sup>. I farmaci calcio-antagonisti possono essere utilizzati da soli o in associazione nei pazienti ipertesi e rappresentano una valida alternativa in coloro che non tollerano i diuretici tiazidici. Bloccano i canali del calcio limitando l'ingresso dello ione che normalmente agisce nella muscolatura vascolare e nei cardiomiociti aumentando la contrazione. I diuretici e, in particolare, i tiazidici e i tiazidici-simili sono ampiamente utilizzati nel trattamento dell'ipertensione<sup>11,12</sup>.

Come precedentemente anticipato, il colesterolo è un importante fattore di rischio cardiovascolare e in questo contesto sono stati sviluppati diversi farmaci ipocolesterolemizzanti.

Tra questi, le statine rappresentano l'intervento di prima linea nella prevenzione primaria e secondaria da adottare nei pazienti affetti da ipercolesterolemia. Riducono la sintesi endogena di colesterolo per mezzo dell'inibizione dell'enzima Idrossimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduttasi favorendo un aumento nell'esposizione dei recettori per le LDL consentendo così una maggiore internalizzazione delle LDL e, di conseguenza, una riduzione della concentrazione plasmatica di LDL, ApoB-100 e trigliceridi. Tra i farmaci più recenti, l'ezetimibe, invece, inibisce l'assorbimento di colesterolo nell'intestino tenue. Questo farmaco è considerato un trattamento di seconda linea nei pazienti intolleranti alle statine e trova impiego anche nella prevenzione degli eventi cardiovascolari ischemici. Altre classi di farmaci impiegati nel trattamento del colesterolo sono i fibrati, che riducono le concentrazioni plasmatiche di lipidi e le resine che sequestrano gli acidi<sup>13</sup>. Negli ultimi anni sono stati anche autorizzati alcuni farmaci innovativi, come ad esempio gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 che però hanno un uso meno diffuso.

## 1.4 Strategie emergenti

Il progresso scientifico è in continua evoluzione testimoniato dalla graduale produzione di nuovi farmaci. In questo contesto è emersa la categoria dei farmaci biologici.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce i farmaci biologici un gruppo eterogeneo di medicinali coltivati e purificati su larga scala per mezzo di colture cellulari di origine procariotica, eucariotica, animale o vegetale. Anticorpi monoclonali assieme a vaccini, fattori di crescita, immunomodulatori e derivati del sangue sono esempi di questa importante classe farmacologica che si contraddistingue dalle tipiche "piccole molecole"<sup>14</sup>. Infatti, mediante complessi metodi produttivi si ottengono farmaci generalmente di natura proteica, a elevato peso molecolare, con diversi profili di stabilità e di impurità che necessitano di adottare una regolamentazione diversa rispetto ai farmaci costituiti da piccole molecole<sup>14,15</sup>.

La *U.S Food and Drug Administration* (FDA) ribadisce l'origine biologica di questi farmaci e sottolinea la presenza di varie modalità di produzione, tra cui metodi biotecnologici e altre tecnologie all'avanguardia con cui si possono ottenere prodotti di terapia genica e cellulare<sup>16</sup>. Pertanto, i farmaci biologici comprendono anche i prodotti biotecnologici derivati da tecniche particolari come l'espressione di geni codificanti per molecole biologicamente attive<sup>15</sup>.

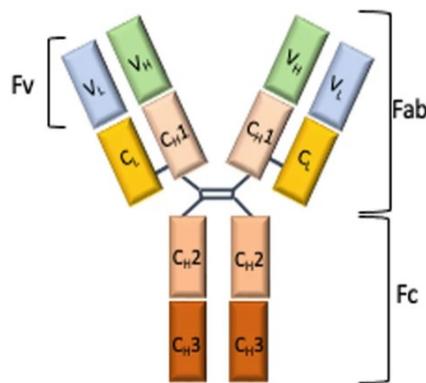
Diversamente dagli anticorpi monoclonali, i prodotti di terapia genica e cellulare appartengono alla categoria dei medicinali per le terapie avanzate (*Advanced Therapy Medicinal Products*, ATMPs) assieme ai prodotti di ingegneria tissutale e ai medicinali per terapie avanzate combinate<sup>17</sup>. Gli ATMPs rappresentano un gruppo eterogeneo di medicinali che ha il potenziale di trattare malattie un tempo ritenute incurabili. Nel 2007, l'Unione Europea (UE) ha approvato il Regolamento (CE) N. 1394/2007 che fornisce il quadro normativo alla base della valutazione e dell'autorizzazione dei medicinali per le terapie avanzate; tuttavia, le scelte finanziarie rimangono locali. Questa legislazione è fondamentale in quanto assicura che tutte le fasi del processo produttivo degli ATMPs avvengano nel modo corretto in ottemperanza ai potenziali rischi derivanti dalla somministrazione nei pazienti<sup>18</sup>.

Nonostante le difficoltà produttive e gli elevati costi, i farmaci biologici negli ultimi 12 anni hanno evidenziato un'importante ascesa testimoniata dalla loro costante approvazione da parte dell'FDA. In particolar modo, gli anticorpi monoclonali trovano impiego soprattutto in ambito oncologico mentre la terapia genica è stata riconosciuta come il primo trattamento nella cura delle malattie monogeniche tra cui cecità e atrofia muscolare spinale. L'ultimo decennio ha permesso alla terapia cellulare di progredire inserendosi nella medicina rigenerativa soprattutto di cute e cornea. Sebbene i farmaci biologici sono impiegati per trattare varie patologie, il loro impiego nelle malattie cardiache rimane limitato<sup>19</sup>.

## 2. Anticorpi monoclonali

### 2.1 Aspetti generali

Gli anticorpi sono proteine eterodimeriche di grandi dimensioni con un peso molecolare di circa 150 kDa che si contraddistinguono per la loro tipica forma a Y. Quest'ultima si caratterizza per la presenza di due catene leggere e due catene pesanti che vengono unite da ponti disolfuro. A seconda delle sequenze di ogni catena pesante, gli anticorpi possono essere suddivisi in cinque classi di immunoglobuline (Ig) ovvero IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Ogni classe può essere ulteriormente suddivisa in sottotipi, ad esempio IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 sono sottocategorie delle IgG<sup>20</sup>.



**Figura 2** Struttura degli anticorpi<sup>21</sup>.

Ogni catena leggera contiene regioni variabili VL (*Variable Light chain*) e regioni costanti CL (*Costant Light chain*) e lo stesso vale per le catene pesanti che quindi presentano regioni costanti CH (*Costant Heavy chain*) e regioni variabili VH (*Variable Heavy chain*)<sup>22</sup>. Mentre le regioni costanti degli anticorpi consentono il meccanismo alla base della distruzione dell'antigene, le regioni variabili sono costituite da sequenze amminoacidiche ipervariabili spesso indicate con l'acronimo CDR (*Complementarity Determining Regions*) e sono responsabili dell'interazione ma soprattutto della specificità nei confronti dei diversi antigeni. Ad esempio, IgG contiene tre diversi CDR ovvero CDR1, CDR2 e CDR3 aventi la massima variabilità<sup>22</sup>. Il cosiddetto Fab (*antigen binding fragment*) è costituito dall'unione di una regione variabile e una costante della catena leggera e di quella pesante. A questo livello, il CDR delle catene variabili costituisce il paratopo ovvero il sito di legame dell'anticorpo con l'epitopo dell'antigene. Fc (*crystallizable/constant fragment*), invece, è il frammento costante degli anticorpi monoclonali che si lega ai recettori gamma Fc (FcγR) espressi sulle cellule immunitarie permettendo a queste ultime di contrastare l'agente patogeno<sup>20</sup> (**Figura 2**).

A seguito di queste conoscenze, sono stati effettuati degli studi sul processo di lisi mediata da cellule ed è stato evidenziato come le IgG1 e le IgG3 svolgono più efficacemente la loro attività rispetto a IgM, IgG2, IgG4, IgA e IgE<sup>22</sup>. Infatti, nonostante la funzione della porzione Fc sia comune a tutti gli anticorpi, i sottotipi IgG1 e IgG3 sono più efficaci nell'attivazione della cascata del complemento. In particolar modo, IgG1 è

il sottotipo maggiormente utilizzato nelle terapie antitumorali in quanto è efficace nel promuovere l'ADCC (citotossicità cellulare anticorpo-dipendente)<sup>20</sup>.

In base a quanto riportato fino ad ora si può concludere che per la creazione di anticorpi monoclonali, l'immunoglobulina G è l'isotipo più comunemente utilizzato in ambito terapeutico<sup>22</sup>.

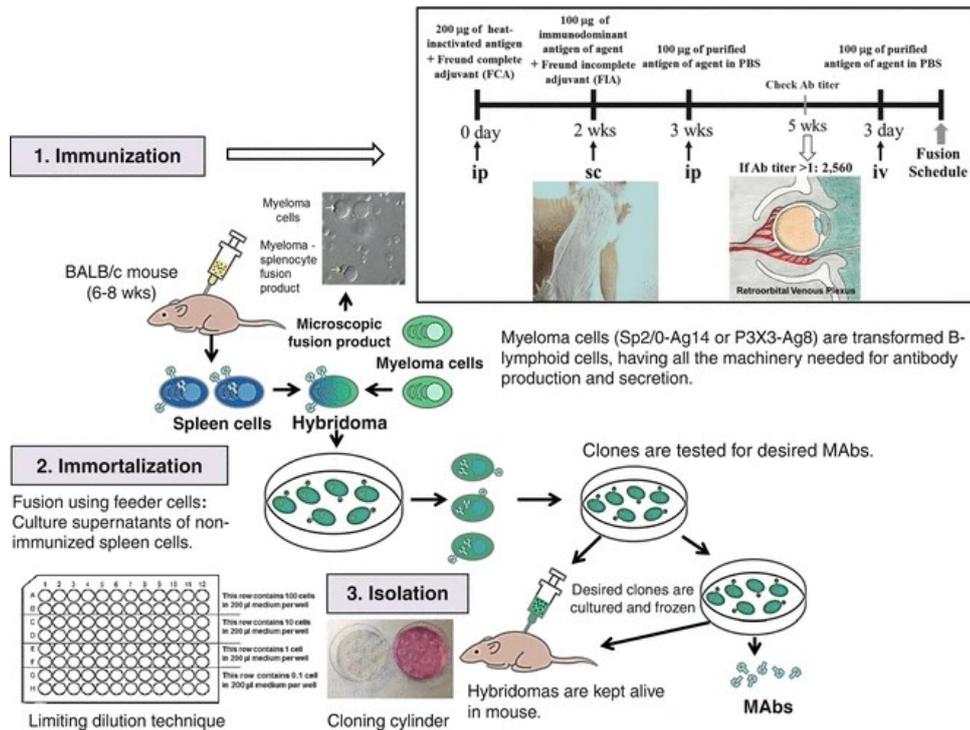
### 2.1.1 Tecnica dell'ibridoma

Lo scienziato tedesco Georges J. F. Köhler e l'immunologo argentino-britannico César Milstein diedero vita nel 1974 alla tecnica dell'ibridoma che permise la produzione di anticorpi monoclonali con specificità di legame nei confronti dell'antigene<sup>22</sup>.

La tecnica dell'ibridoma si sviluppa in diverse fasi e l'immunizzazione ovvero la stimolazione del sistema immunitario animale è la prima di queste (**Figura 3**). Essa consiste nella somministrazione, tramite una serie di iniezioni negli animali da laboratorio come conigli o topi, di uno specifico antigene nei confronti dei quali si vuole generare il corrispondente anticorpo. Questa fase si prolunga per diverse settimane fino a quando il sistema immunitario dell'animale non avrà differenziato i propri linfociti B in plasmacellule e cellule della memoria. A questo punto l'animale viene sacrificato<sup>23</sup>.

Nella pratica di laboratorio spesso vengono utilizzati topi BALB/c di cinque settimane ai quali si somministra al giorno 0, per via intraperitoneale, una soluzione contenente l'antigene prescelto in forma solubile o cellulare (in soluzione o in sospensione) in PBS e l'adiuvante completo di Freund (FCA) che aumenta la risposta immunitaria (**Figura 3**). Dopo due settimane dalla prima immunizzazione, segue una seconda iniezione per via sottocutanea in cui il topo è trattato con una miscela di antigene purificato in PBS e adiuvante incompleto di Freud (FIA). Successivamente, dopo sette giorni dalla seconda immunizzazione, al topo è iniettato l'antigene purificato in PBS per via intraperitoneale senza l'adiuvante. In questo modo l'antigene somministrato è bloccato nella milza che richiamerà tutti gli anticorpi antigene specifici<sup>24</sup>.

A cinque settimane dalla prima immunizzazione, i topi vengono anestetizzati (tramite una miscela diluita di soluzione salina di ketamina, acepromazina e xilazina somministrata alla dose di 0,1 mL/kg di peso corporeo) in modo da poter raccogliere dal plesso venoso retro-orbitario un campione di sangue (**Figura 3**). Dal campione ematico si separa il siero che è analizzato tramite ELISA allo scopo di individuare la presenza degli anticorpi specifici. Qualche giorno prima della fusione tra cellule di mieloma e cellule immunitarie di milza, ai topi viene somministrato per via endovenosa l'antigene purificato in PBS senza l'adiuvante. Se nelle successive cinque settimane gli anticorpi prodotti sono in numero adeguato (>1:2560), i topi saranno sacrificati<sup>24</sup>. A questo punto, in condizioni asettiche la milza viene rimossa al fine di isolare gli anticorpi tramite centrifugazione in gradiente di densità. L'analisi mediante ELISA sarà nuovamente utilizzata per identificare la presenza di anticorpi nel siero che verranno successivamente fusi con le cellule di mieloma<sup>23</sup>.



**Figura 3** Le tre fasi della tecnica dell'ibridoma<sup>24</sup>.

La seconda fase consiste nella cosiddetta “immortalizzazione” che si ottiene utilizzando cellule di mieloma appartenenti a una particolare linea cellulare (Sp2/0-Ag14 o P3X3-Ag8) che poi vengono fuse con le cellule B attive<sup>24</sup>. Nello specifico, alcune settimane prima della fusione cellulare, sono allestite le linee cellulari di mieloma incubandole in un terreno contenente 8-azaguanina. In questo modo, le cellule tumorali avranno dei geni non funzionali per l'enzima HGPRT (ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi). Le cellule di mieloma essendo deficitarie di questo enzima, non saranno in grado di promuovere l'assemblaggio di nucleotidi e saranno quindi sensibili ai terreni HAT (ipoxantina-amminopterina-timidina). La fusione cellulare è il passo successivo. In questa fase si ha la fusione dei linfociti B attivi con le cellule di mieloma HAT sensibili. Per favorire questo processo, può essere utilizzato il polietilenglicole che aiuta la fusione della membrana plasmatica della cellula tumorale con la membrana plasmatica del linfocita B attivato. Il prodotto ottenuto viene denominato eterocarionte. Un metodo più efficiente è l'elettrofusione che svolge la stessa attività servendosi però di un campo elettrico. Tuttavia, anche scegliendo il metodo di fusione migliore si otterranno solo l'1-2% di cellule di ibridoma fuse. Tenendo in considerazione che in generale solo 1 cellula su 100 sarà effettivamente una cellula ibrida vitale, si rende necessario la selezione delle cellule di interesse<sup>23</sup>.

Si avvia così la terza fase che consiste nell'isolamento di singole cellule produttrici di mAbs<sup>24</sup>. Per fare ciò la miscela di cellule fuse e non fuse viene incubata per circa 10-14 giorni in un terreno di cultura HAT che è un mezzo di selezione che contiene ipoxantina-amminopterina-timidina. L'ipoxantina e la deossitimidina consentono alle cellule in grado di produrre l'enzima HGPRT di sopravvivere mentre l'amminopterina blocca la sintesi di nucleotidi. I linfociti B presenti nella miscela moriranno in questo terreno di coltura in quanto

hanno un ciclo di vita limitato. La morte si verifica anche per le cellule tumorali non fuse in quanto sono deficitarie dell'enzima HGPRT. Solo le cellule ibride sopravviveranno poiché presentano il gene funzionale HGPRT dalle cellule B e questo consente loro di crescere e dividersi in maniera illimitata. A questo punto le cellule di ibridoma sopravvissute vengono trasferite su piastre ELISA e tramite il metodo di diluizione limitante viene inserita una cellula ibrida per pozzetto. Successivamente, si selezionano le cellule di ibridoma che contengono i geni dei linfociti B che codificano per l'epitopo specifico che poi verrà espresso nell'anticorpo. In questa fase, dunque, è fondamentale individuare l'anticorpo monoclonale di interesse ovvero quello che esprime uno specifico epitopo. Si procede poi con il trasferimento degli ibridomi per la coltivazione *in vivo* o *in vitro*. Quest'ultima è da preferire in quanto riduce i rischi di contaminazione rispetto alla coltivazione *in vivo*<sup>23</sup>.

Sebbene la scoperta degli anticorpi monoclonali risale al 1975, molto tempo è stato necessario per far apprezzare il loro potenziale come agenti terapeutici. Lo scetticismo è derivato da motivazioni riconducibili alla brevettabilità, alla funzione effettrice ma soprattutto al desiderio di limitare effetti collaterali dovuti all'immunogenicità e in questo contesto è stato fondamentale lo sviluppo della tecnologia che ha permesso di passare da anticorpi di origine murina a equivalenti umani. La tecnica dell'ibridoma ha portato all'approvazione nel 1986 del farmaco muromonab-CD3, il primo anticorpo monoclonale di origine murina efficace nella prevenzione del trapianto d'organo avente come target il recettore CD3 espresso sulle cellule T. Tuttavia, quest'ultimo è stato ritirato dal commercio nel 2010 per l'importante risposta anticorpale (HAMA) provocata dalla natura murina dell'anticorpo<sup>25</sup>.

Le notevoli differenze tra sistema immunitario umano e sistema immunitario dei roditori hanno portato a limitare l'uso nella pratica clinica degli anticorpi monoclonali murini. Questi anticorpi, infatti, generano nell'essere umano una risposta immunogenica importante chiamata risposta HAMA (*Human Anti-Mouse Antibody*). Si è cercato di superare il problema sostituendo le catene costanti murine con sequenze costanti umane il che ha dato vita ad anticorpi chimerici costituiti dal 65% di sequenza di origine umana. Il farmaco abciximab, approvato nel 1994 come antiaggregante piastrinico, è stato il primo anticorpo monoclonale appartenente a questa categoria. Successivamente, è stato approvato daclizumab (1997), il primo anticorpo monoclonale umanizzato approvato per prevenire il rigetto del trapianto di rene. L'umanizzazione degli mAbs ha permesso di utilizzare lo scheletro delle IgG umane al quale sono state innestate le regioni ipervariabili di origine murina. La creazione di piattaforme di visualizzazione dei fagi e l'utilizzo di topi transgenici ha determinato la nascita di anticorpi completamente umani. Il primo mAb appartenente a questa categoria è stato adalimumab, utilizzato per il trattamento dell'artrite reumatoide<sup>25</sup>.

### 2.1.2 Tecnica odierna di produzione

Nel tempo si è reso necessario individuare nuovi metodi di produzione degli anticorpi monoclonali per far fronte alla crescente domanda di questi<sup>21</sup>. Nel 1985, George P. Smith dimostra che inserendo un frammento di DNA estraneo nel gene che codifica per una proteina di rivestimento di fagi filamentosi, questi sono in grado di esprimere sulla loro superficie il corrispondente peptide<sup>26</sup>. Questa scoperta ha permesso di sviluppare la cosiddetta tecnologia di visualizzazione dei fagi. Negli anni seguenti, McCafferty e Winter hanno utilizzato per primi questo metodo innovativo per la creazione di mAbs realizzando su fagi filamentosi librerie di anticorpi combinatori. La *phage display technology*, dunque, è un metodo alternativo alla comune tecnica dell'ibridoma che consente di ottenere anticorpi di origine umana. Per questa scoperta, nel 2018 George P. Smith e Gregory P. Winter sono stati insigniti del premio Nobel per la chimica<sup>26</sup>.

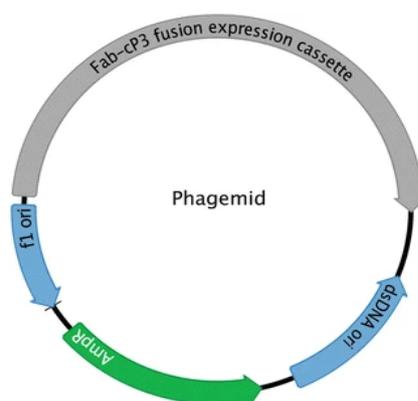
La tecnologia *phage display* permette di produrre con facilità anticorpi *in vitro* e per questo è ora utilizzabile per la scoperta di numerosi farmaci. Infatti, anche se sono stati proposti altri metodi di illustrazione molecolare come la tecnologia di visualizzazione dei ribosomi e la tecnologia di visualizzazione del lievito, la tecnologia di visualizzazione dei fagi rimane la prediletta per la facilità di riconoscimento delle molecole di interesse. Il principio di base consiste nella creazione di librerie in cui peptidi e proteine vengono espressi sui fagi a cui poi segue la selezione del clone più adatto tramite *panning in vitro*. Il risultato è la produzione di anticorpi fagici naïve, immunizzati e sintetici<sup>27</sup>.

È importante sottolineare che oggi la produzione di anticorpi monoclonali completamente umani non avviene solamente con la tecnica del *phage display* ma anche con la tecnica dell'ibridoma. In quest'ultimo caso, però, vengono sfruttati topi transgenici ovvero topi in cui all'interno del loro genoma i loci corrispondenti ai geni dell'immunoglobulina murina sono stati sostituiti con loci di origine umana<sup>26</sup>.

La tecnica del *phage display* si avvale del fago M13, il batteriofago più utilizzato per questo tipo di applicazione, caratterizzato da una forma cilindrica e flessibile contenente un singolo filamento di DNA. Si tratta di un fago filamentoso che infetta i ceppi di *Escherichia coli* attraverso l'interazione tra la proteina di rivestimento fagico e il pilo F<sup>26</sup>. Quest'ultimo è una struttura caratteristica non solo dei ceppi di *E. coli* ma anche di *Klebsiella pneumoniae*, consiste in un filamento formato da unità di fosfatidilglicerolo e la proteina pilina F che interagiscono in un rapporto 1:100<sup>28</sup>.

Il genoma di M13 è formato da nove geni che codificano per cinque proteine di rivestimento (tra cui pIII) e sei proteine che permettono l'assemblaggio e la replicazione. La pIII è una delle cinque proteine di rivestimento di M13 ed è quella più utilizzata in questo tipo di tecnica in quanto ha una struttura flessibile e consente di visualizzare proteine di elevate dimensioni. Il gene che codifica per questa proteina viene introdotto, assieme alla sequenza genica dell'anticorpo di interesse, in un plasmide chiamato anche vettore fagemidico<sup>26</sup>. Tramite questa tecnologia si inserisce la sequenza genica che codifica per una piccola parte dell'anticorpo in quanto i frammenti Fab o scFv vengono espressi nei batteri con più facilità rispetto all'intero anticorpo che necessita dell'assemblaggio delle quattro catene polipeptidiche e la formazione di ponti disolfuro<sup>26</sup>.

Il vettore plasmidico esprime più sequenze (**Figura 4**). Contiene la sequenza genica che codifica per l'anticorpo di interesse fusa con la sequenza genica che codifica per pIII (*Fab-cP3 fusion expression cassette*). Oltre a ciò, è presente una sequenza per la replicazione del DNA a singolo filamento (f1 ori), una sequenza per la replicazione del DNA a doppio filamento (dsDNA ori) e un gene per  $\beta$ -lattamasi che conferisce resistenza ad ampicillina e carbenicillina (AmpR)<sup>29</sup>.



**Figura 4** Sequenze geniche di un vettore fagemidico<sup>29</sup>.

Tuttavia, il plasmide non contiene tutti i geni necessari per produrre un batteriofago completo nel batterio. Questo spiega perché si avvale di M13KO7, un fago helper derivato di M13. *E. coli* subisce una co-infezione tale da permettere la sintesi di tutte le proteine di rivestimento dei fagi. Il gene pIII wild type del fago helper ha un grado di espressione maggiore rispetto al gene di fusione presente nel plasmide, dunque, di tutta la popolazione fagica solo una piccola parte avrà l'espressione del gene di fusione. A questo punto, mediante immobilizzazione su superfici solide (come membrane di nitrocellulosa), gli antigeni purificati vengono presentati a una libreria di anticorpi fagici dove subentra il biopanning<sup>26</sup>. Il biopanning è un metodo per l'identificazione di ligandi specifici. Sono previsti più cicli di biopanning e durante ognuno le cellule vengono incubate con una miscela di fagi che esprimono peptidi diversi. I fagi che non si legano sono lavati via mentre quelli che si legano alla cellula vengono internalizzati all'interno di essa. A questo punto vengono replicati nei batteri e utilizzati come input nel successivo ciclo di biopanning. In questo modo ad ogni ciclo si riduce la diversità del campione mentre aumenta la specificità tra cellula e fago<sup>30</sup>. Il biopanning si basa dunque sulla ripetizione di cicli di incubazione, lavaggio, amplificazione e rifelezione dei fagi. In questo processo, l'antigene bersaglio viene immobilizzato su vari supporti solidi come pozzetti di piastre per microtitolazione o microsferi magnetiche<sup>31</sup>. I cloni ottenuti dai vari cicli di biopanning verranno ulteriormente determinati tramite analisi ELISA per individuare quali di questi fagi clonati ha elevata specificità nei confronti dell'antigene di interesse<sup>26</sup>. È da sottolineare che il biopanning dell'antigene immobilizzato su superfici solide ha una funzionalità limitata ed è proprio per questo che sono stati sviluppati metodi alternati come il biopanning in soluzione a cui segue il legame per affinità di antigeni marcati con biotina o con il peptide legante la calmodulina<sup>26</sup>.

Le librerie di anticorpi che si ottengono presentano una vasta gamma di particelle fagiche ognuna delle quali esprime uno specifico gene anticorpale. Normalmente le librerie vengono progettate in base al formato

di anticorpo (Fab, scFv o sdAb) scelto e possono essere suddivise in tre tipologie ovvero librerie immunitarie, librerie naïve e librerie di anticorpi sintetici<sup>21</sup>.

Le librerie immunitarie sono utilizzate per isolare anticorpi con un'affinità elevata, dell'ordine nanomolare. Si sfruttano quando si devono creare anticorpi contro degli antigeni responsabili di un'infezione specifica. Queste librerie nascono da cellule B o plasmacellule originarie di animali immunizzati o individui infetti da uno specifico antigene e utilizzano le IgG come isotipo anticorpale<sup>21</sup>. L'elevata affinità di questi anticorpi per lo specifico antigene si spiega in quanto i frammenti dei geni VH e VL hanno subito il processo di maturazione dell'affinità *in vivo*<sup>26</sup>.

Le librerie di anticorpi naïve, a differenza delle precedenti, nascono da cellule B di individui senza infezioni note al momento della raccolta ed è proprio per questo che vengono utilizzate le IgM. L'estrazione del corrispondente gene anticorpale si ottiene prima prelevando l'mRNA dalle cellule mononucleate del sangue periferico e poi mediante la trascrizione in cDNA. Successivamente, i geni V specifici vengono amplificati tramite primer in modo da avere la massima copertura di tutte le famiglie di geni V conosciute. Il clonaggio consente di accoppiare in maniera del tutto casuale i geni VH con i geni VL creando molteplici combinazioni, alcune delle quali potrebbero anche non esistere in natura. La libreria che si crea ha un'ampiezza compresa tra 10<sup>9</sup> e 10<sup>11</sup> cloni tale da permettere la selezione di anticorpi diretti a una vasta gamma di antigeni come tossine o antigeni responsabili di malattie infettive o autoimmuni. I cloni ottenuti da queste librerie hanno una specificità minore ma tecniche come la maturazione dell'affinità *in vitro* possono sicuramente migliorarla<sup>21</sup>.

Le librerie sintetiche si basano su un corredo genetico che viene sintetizzato chimicamente e assemblato *in vitro*. Viene sfruttata l'analisi bioinformatica per predefinire la struttura delle CDR ottenute dalla randomizzazione sintetica necessaria per imitare i geni V riarrangiati o germinali. Da queste librerie derivano le librerie semisintetiche che consistono in una combinazione tra librerie naïve e librerie sintetiche. In questo caso il corredo genetico si ricava da cellule B naïve o da una sequenza anticorpale nota. Ciò che contraddistingue le librerie semisintetiche è la presenza di almeno una CDR randomizzata in posizioni tali da consentire il legame con l'antigene<sup>21</sup>.

La tecnica del *phage display* ha permesso di sviluppare negli ultimi anni più di 70 anticorpi monoclonali in fase di sviluppo clinico, di cui 14 già approvati in terapia a livello globale<sup>26</sup>.

### 2.1.3 Indicazioni approvate degli anticorpi monoclonali

Secondo un recente articolo, nel 2021 i dati disponibili riguardanti gli anticorpi monoclonali approvati o in sede di revisione normativa in Europa o negli Stati Uniti d'America, ha evidenziato come il 45% è utilizzato in ambito oncologico, il 27% ha come target i disturbi del sistema immunitario, l'8% è destinato alle malattie infettive e il 7% ha come obiettivo i disturbi cardiovascolari e l'emostasi (Figura 5). È da sottolineare che il totale (131) comprende anche mAbs che sono stati approvati ma successivamente ritirati<sup>32</sup>.

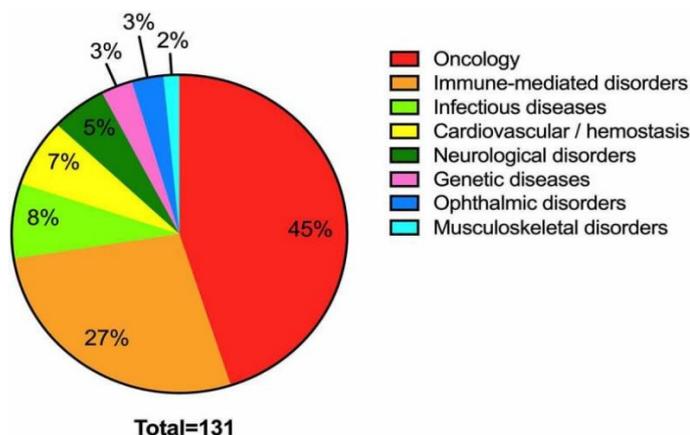


Figura 5 Maggiori ambiti di utilizzo degli anticorpi monoclonali<sup>32</sup>.

#### Oncologia

Recentemente, un articolo del *Journal of Hematology & Oncology* (2022) ha evidenziato che i tumori solidi rappresentano più del 90% dei tumori umani e che negli ultimi 30 anni la FDA ha approvato circa 120 nuovi farmaci antitumorali, tra cui anche alcuni anticorpi monoclonali<sup>33</sup>. Tra i bersagli di questi ci sono i recettori dei fattori di crescita che nelle cellule tumorali possono essere sovraespressi. Ne è un esempio il recettore del fattore di crescita epidermico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) che rappresenta il bersaglio di alcuni mAbs come trastuzumab (Herceptin®) e altri che sono destinati al trattamento del tumore al seno<sup>20</sup>. Infatti, tramite il blocco di questi recettori si inibisce il signaling intracellulare inducendo apoptosi cellulare. Sulla superficie di cellule sane e tumorali sono presenti delle glicoproteine che fungono da antigeni di differenziazione emopoietica, ne sono esempi CD20, CD30, CD33 e CD52. Alcuni anticorpi monoclonali, tra cui rituximab (Mabthera®), prendono di mira proprio questi antigeni provocando una cascata di mediatori dell'infiammazione che generano morte diretta o inducono fagocitosi delle cellule tumorali. Altri anticorpi monoclonali agiscono inibendo l'angiogenesi come ad esempio bevacizumab (Avastin®) che colpisce il microambiente tumorale inibendo il fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). Altri mAbs hanno come target d'azione le cellule immunitarie<sup>20</sup>.

## Malattie autoimmuni

Le malattie autoimmuni possono essere definite come un gruppo eterogeneo di condizioni che si caratterizzano per l'elevata reattività delle cellule B e T del sistema immunitario nei confronti dell'ospite. Clinicamente parlando, le manifestazioni possono essere tantissime e possono coinvolgere organi (si parla in questo caso di malattie autoimmuni organo-specifiche) oppure possono essere generalizzate (dette anche sistemiche o non organo specifiche). Individui di qualsiasi età ne possono essere affetti, il sesso femminile è quello più colpito. Proprio a causa della molteplicità con cui queste patologie possono manifestarsi, per il medico la diagnosi può diventare piuttosto complicata<sup>34</sup>.

Per far fronte a queste malattie, sono stati sviluppati nel corso degli anni diversi anticorpi monoclonali capaci di sopprimere le risposte eccessive del sistema immunitario andando ad agire su molteplici target. Nello specifico, possono agire tramite il blocco e la deplezione di cellule B e cellule T, tramite l'inibizione dell'interazione tra cellule presentanti l'antigene e cellule T, tramite il blocco dell'attivazione o della differenziazione delle cellule T, tramite il blocco del reclutamento di cellule T e B e, infine, tramite il blocco delle citochine pro-infiammatorie<sup>20</sup>. Il TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), una citochina che induce vasodilatazione e infiammazione, è tra i bersagli più frequenti degli anticorpi monoclonali<sup>20</sup>. Adalimumab è un esempio di anticorpo monoclonale che ha come bersaglio proprio il TNF- $\alpha$  la cui inibizione determina il blocco dell'infiammazione sistemica. È conosciuto con i nomi commerciali Humira® e Imraldi® ed è utilizzato in diversi ambiti, tra cui l'artrite reumatoide, il morbo di Crohn sia in adulti che in soggetti pediatrici, l'artrite psoriasica, l'artrite idiopatica giovanile, la spondilite anchilosante, la colite ulcerosa, la psoriasi a placche, l'idradenitis suppurativa e l'uveite<sup>35</sup>.

## Patologie infettive

L'immunizzazione passiva è utilizzata per il trattamento di infezioni o sospette esposizioni a malattie infettive gravi come rabbia, difterite ed epatite B. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, gli anticorpi monoclonali sono diventati una valida alternativa ai farmaci che inducono l'immunizzazione passiva in quanto sono in grado di ovviare alle normali difficoltà che possono insorgere a seguito della somministrazione di immunoglobuline derivate dal sangue. Queste, infatti, possono causare problematiche relative alla sicurezza (molte di queste provengono da cavalli immunizzati, da esseri umani immunizzati e pazienti convalescenti) e alla standardizzazione della produzione. Gli mAbs possono essere sfruttati per il trattamento di malattie infettive multi-resistenti e malattie per le quali non esistono ancora vaccini o terapie efficaci. Oltre al veloce processo di produzione, gli anticorpi monoclonali forniscono una protezione immediata seppur breve nel tempo. Sono attualmente in studio tecnologie che permettono di estendere l'emivita degli anticorpi e metodi che consentono la somministrazione di mRNA codificante per un determinato anticorpo<sup>36</sup>. Palivizumab (Synagis®) è stato il primo anticorpo monoclonale a essere approvato per le patologie infettive. Esso inibisce la replicazione del virus respiratorio sinciziale riducendo così la frequenza di malattia nei neonati prematuri. Nel 2018 è stato approvato ibalizumab (Trogarzo®) per il trattamento dell'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1). Attualmente si stanno sviluppando mAbs per il trattamento di altre patologie infettive<sup>20</sup>.

## **Altre indicazioni**

Sebbene la maggior parte degli anticorpi monoclonali trovi impiego negli ambiti precedentemente citati, vari studi si sono indirizzati anche nel trattamento di altri tipi di patologie. Sono state condotte ricerche sull'utilizzo di mAbs per lo sviluppo di vaccini a base di immunocomplessi. Gli immunocomplessi (IC) sono complessi antigene-anticorpo di cui si sta valutando il potenziale utilizzo come vaccini sia terapeutici che preventivi. I primi studi hanno riguardato l'utilizzo di questi vaccini nella prevenzione di patologie che si sviluppano negli allevamenti di pollame e di maiali. Successivamente anche sulla specie umana. Di base, quando gli IC non vengono eliminati per fagocitosi rimangono nella circolazione sanguigna e possono depositarsi sulla parete vasale di vari organi provocando reazioni infiammatorie e lesioni tissutali. Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato che gli immunocomplessi possono interagire con i recettori del sistema immunitario generando regolazioni immunologiche. Dunque, sebbene il loro potenziale sia stato dimostrato, la loro applicazione in vaccinologia è appena iniziata e necessità di ulteriori studi<sup>37</sup>.

### **2.1.4 Differenze tra mAbs e piccole molecole**

Gli anticorpi monoclonali si contraddistinguono nettamente dai farmaci appartenenti al gruppo delle piccole molecole non solo per la loro natura ma anche per le loro caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche. Innanzitutto, gli mAbs sono di origine proteica diversamente dalle piccole molecole che sono composti sintetici organici o di origine naturale; questo spiega la diversità nel peso molecolare, infatti, mentre gli mAbs hanno un peso che si aggira attorno ai 150 kDa, le piccole molecole hanno un minore peso molecolare (<700 Da). L'impossibilità nell'attraversare la barriera ematoencefalica, la loro lenta distribuzione nei tessuti e la loro utilità terapeutica limitata ai bersagli extracellulari sono caratteristiche tipiche degli mAbs per i motivi appena citati. Diversamente, le piccole molecole possono legare bersagli extracellulari, bersagli intracellulari e nucleari. Esse vengono prodotte per sintesi chimica, il che rende il processo veloce e comporta la produzione di tante copie uguali di elevata purezza. Gli anticorpi monoclonali, invece, vengono ottenuti a partire da lotti di cellule appartenenti a più linee cellulari di mammifero che rendono il prodotto caratterizzato da un'ampia variabilità. Nonostante ci sia a monte un rigoroso controllo qualità, l'eterogeneità fa sì che gli anticorpi biosimilari, prodotti utilizzando la stessa sequenza ricombinante, possano essere solo sufficientemente simili rispetto al prodotto di riferimento approvato da FDA<sup>20</sup>.

Si deve osservare che gli mAbs hanno una notevole affinità e selettività nei confronti del proprio bersaglio e questo riduce gli effetti off-target. Hanno come bersaglio proteine e recettori espressi sulle cellule a livello extracellulare bloccandoli in modo permanente. Le piccole molecole possono agire da agonisti o antagonisti recettoriali, sia a livello extracellulare che intracellulare o a livello del nucleo, e possono promuovere l'attivazione o l'inibizione di enzimi<sup>20</sup>.

Da un punto di vista farmacocinetico, gli anticorpi monoclonali a causa delle loro grandi dimensioni non si prestano alla somministrazione orale e per questo ci si avvale della somministrazione per vie parenterali,

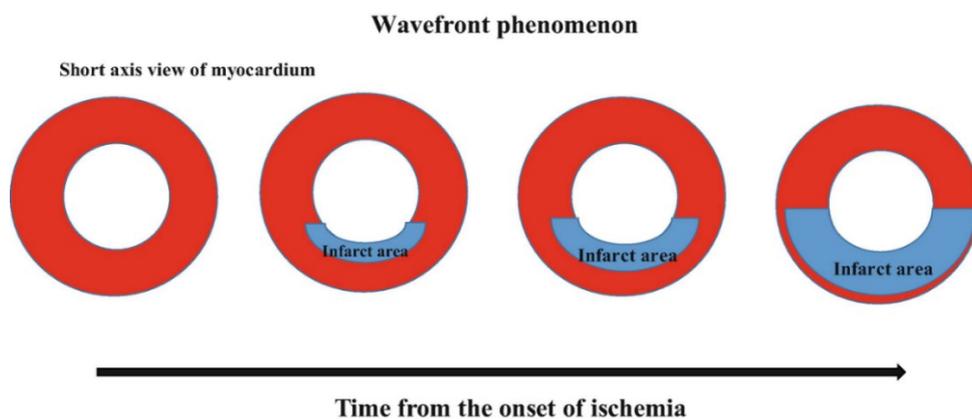
quali l'endovenosa (IV), la sottocutanea (SC) e l'intramuscolare (IM). La somministrazione SC (la più utilizzata dai pazienti perché di facile autosomministrazione) e IM riducono la biodisponibilità in quanto nel liquido interstiziale e nel sistema linfatico avviene la degradazione proteolitica. Dopo l'iniezione, il picco di concentrazione plasmatica si raggiunge dai 3 ai 7 giorni dopo la prima somministrazione. L'emivita degli mAbs varia da 11 a 30 giorni. Questo spiega la minore frequenza di somministrazione rispetto alle piccole molecole che hanno un'emivita decisamente più breve (in generale, dalle 4 alle 24 ore)<sup>20</sup>.

Normalmente le piccole molecole vengono prima metabolizzate dal citocromo P450 e dagli altri enzimi epatici e poi escrete attraverso la bile e/o i reni. Gli mAbs, invece, subiscono assorbimento cellulare mediante processi di pinocitosi formando endosomi che poi subiscono metabolismo intracellulare tramite degradazione lisosomiale. I prodotti catabolici ottenuti vengono escreti dal rene o utilizzati per la sintesi proteica. Questo loro destino limita la tossicità e le interazioni farmacologiche<sup>20</sup>.

Nel corso degli anni sono stati fatti numerosi passi avanti per limitare l'immunogenicità degli anticorpi monoclonali dovuta sia a fattori correlati al farmaco sia a fattori direttamente attribuibili al paziente, ma questa rimane ancora una possibilità. Altri effetti collaterali non sono attribuibili al sistema immunitario e vengono rappresentati da una serie di reazioni avverse quali mal di testa, problemi gastrointestinali, eruzioni cutanee e tossicità ai vari organi<sup>20</sup>.

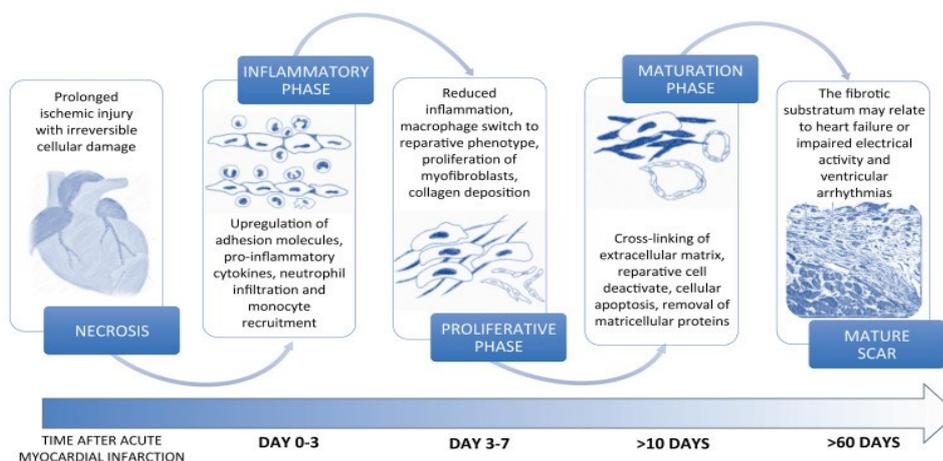
## 2.2 Sviluppi di mAbs nelle patologie cardiovascolari

L'infarto acuto del miocardio è il risultato dell'occlusione totale dell'arteria coronaria. Diverse possono essere le cause anche se la rottura di una placca aterosclerotica è tra le più frequenti. Il fenomeno del fronte d'onda (*wavefront phenomenon*) è il processo di morte tissutale che non si sviluppa immediatamente ma nel tempo in quanto la necrosi si propaga dall'endocardio all'epicardio (**Figura 6**)<sup>38</sup>.



**Figura 6** Progressione della morte tissutale a seguito dell'occlusione totale dell'arteria coronaria<sup>38</sup>.

La riperfusione dell'arteria coronaria occlusa è il miglior trattamento che può essere eseguito a seguito dell'infarto in quanto può migliorare notevolmente l'esito clinico. Tuttavia, se la riperfusione non avviene velocemente o se comunque il vaso interessato è importante in termini di dimensioni, si verifica un infarto miocardico transmurale che quindi si estende dall'endocardio all'epicardio con grave compromissione della funzione cardiaca e possibile deterioramento della funzione ventricolare sinistra. Nel tempo, i cardiomiociti necrotici vengono sostituiti da cicatrici provocando il rimodellamento del ventricolo sinistro con conseguente assottigliamento e allargamento della dimensione telediastolica che progressivamente può provocare l'insorgenza dell'insufficienza cardiaca<sup>38</sup>. A seguito dell'infarto acuto del miocardio, si instaura un processo di guarigione che termina con una cicatrice fibrotica che sostituisce le cellule necrotiche in quanto i cardiomiociti dei mammiferi hanno una ridotta capacità proliferativa. La fibrosi è uno dei principali fenomeni che subentrano a seguito dell'infarto e può essere sostitutiva e/o reattiva. Nello specifico, una fibrosi sostitutiva rimpiazza i cardiomiociti necrotici con formazione di una cicatrice che proibisce la rottura della parete ventricolare e il rimodellamento avverso. La fibrosi reattiva, invece, è il risultato di un eccessivo processo riparativo o di un processo infiammatorio che non si è concluso. Sfortunatamente, entrambi i processi fibrotici portano all'insorgenza di problematiche cardiache<sup>39</sup>.



**Figura 7** Fasi del processo di fibrosi miocardica<sup>39</sup>.

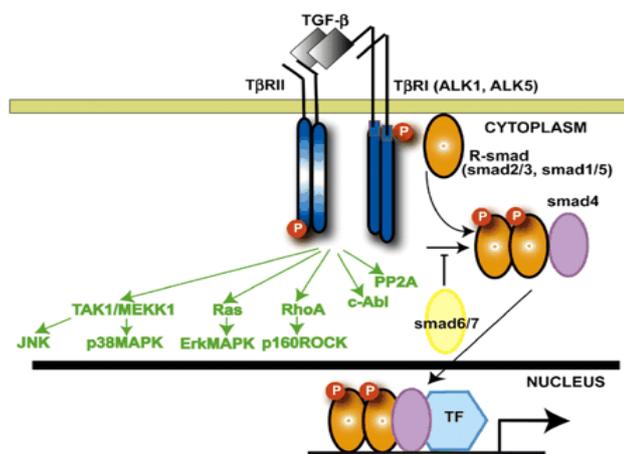
Il processo di guarigione (**Figura 7**) inizia fin da subito quando le cellule necrotiche e la matrice extracellulare rilasciano dei segnali di danno denominati DAMPs (*Danger Associated Molecular Patterns*) che vengono riconosciuti dall'immunità innata attraverso i cosiddetti PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). La fase infiammatoria è il risultato non solo dell'attivazione della risposta infiammatoria, ma anche della sua amplificazione a causa di una upregulation di molecole di adesione, citochine proinfiammatorie e interleuchine che contribuiscono all'attivazione dei leucociti arruolati nel processo infiammatorio. In questo processo concorrono anche i monociti e, in particolare, i macrofagi che si presentano con il fenotipo M1 che ha caratteristiche pro-infiammatorie e fagocitano i cardiomiociti necrotici, reclutano leucociti e secernono proteasi che eliminano i detriti cellulari. Durante il processo riparativo, i macrofagi convertono il loro fenotipo da M1 a M2 e stimolano l'attivazione di interleuchine e TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* )<sup>39</sup>. I frammenti della matrice extracellulare prodotti durante il

processo di necrosi vengono rimossi e sostituiti con una matrice di transizione costituita da fibrina e fibronectina che crea un'impalcatura che consente la migrazione e la proliferazione di altre cellule coinvolte nel processo riparativo. In particolare modo, TGF- $\beta$  e le proteine della matrice cellulare stimolano la differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti. Alla fase di proliferazione segue la maturazione della cicatrice. Le cellule riparatrici si disattivano andando incontro ad apoptosi, le proteine della matrice extracellulare vengono rimosse e le strutture della matrice extracellulare si reticolano generando tessuto cicatriziale. In questo contesto è importante che le varie fasi siano ben proporzionate per evitare che il processo possa innescare complicanze<sup>39</sup>.

Il TGF- $\beta$  è un fattore di crescita nonché un mediatore pleiotropico importante nel processo di fibrosi cardiaca. Nei mammiferi esiste in tre isoforme: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 ma la forma TGF- $\beta$ 1 è quella predominante<sup>40</sup>. La famiglia TGF- $\beta$  ha 33 membri corrispondenti a citochine multifunzionali implicate nei processi della fisiopatologia cardiaca, tra cui l'ipertrofia, la riparazione cardiaca, il rimodellamento fibrotico, l'attivazione dei fibroblasti e il deposito di matrice extracellulare. Il TGF- $\beta$  è secreto in forma di complesso latente inattivo la cui attivazione avviene mediante scissione proteolitica<sup>41</sup>. Il TGF- $\beta$  nella forma attiva interagisce con il suo recettore avviando l'attivazione di processi che possono essere Smad-dipendenti (risposta canonica) o Smad-indipendenti (risposta non canonica)<sup>41</sup>. Il TGF- $\beta$  è in grado di differenziare i fibroblasti in miofibroblasti, di stimolare il rilascio di collagene di tipo I e del fattore di crescita del tessuto connettivo (*Connective Tissue Growth Factor*, CTGF). Per questo motivo è importante che l'attivazione di TGF- $\beta$  avvenga in maniera bilanciata<sup>39</sup>.

Per poter svolgere la sua funzione durante il processo di fibrosi cardiaca, sulla superficie cellulare TGF- $\beta$  si lega al recettore TGF $\beta$ RII (costitutivamente espresso). Il risultato è un complesso che fosforila il dominio citoplasmatico del recettore TGF $\beta$ RI (chiamato anche ALK5). Viene così attivato il dominio chinasi del recettore che propaga i segnali intracellulari a valle tramite le proteine Smad ovvero una famiglia di proteine che si occupano di regolare la trascrizione genica (**Figura 8**)<sup>39,42</sup>. Il recettore di tipo I, rilascia Smad2 e Smad3 che a seguito dell'attivazione di Smad4 formano un complesso che si sposta nel nucleo dove reclutano altri fattori trascrizionali che regolano l'espressione del gene bersaglio. Smad6 e Smad7 hanno un'attività inibitoria nei confronti del recettore di tipo I e quindi interferiscono con la trascrizione di Smad2 e Smad3<sup>39</sup>.

La risposta non canonica, invece, può avvenire attraverso tre vie: PI3K/Akt, RhoA-ROCK e MAPK. Alcuni studi hanno dimostrato l'importanza di ROCK nella regolazione della fibrosi cardiaca. In particolare, l'inibizione di ROCK previene la fibrosi cardiaca sia a seguito dell'infarto del miocardio sia a seguito della costrizione dell'aorta trasversa<sup>41</sup>.



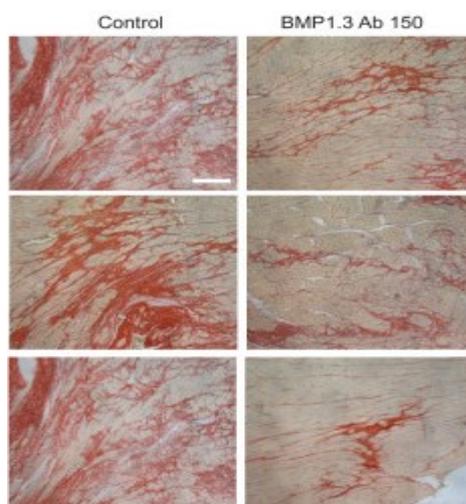
**Figura 8** Cascata di signaling intracellulare Smad-dipendente e Smad-indipendente attivati da TGF- $\beta^{42}$ .

I recettori dell'angiotensina II sono sovraespressi durante la fibrosi cardiaca sottolineando il loro ruolo in questo processo. Mentre il recettore AT1 dell'angiotensina II stimola la cascata profibrotica, il recettore AT2 la inibisce. È da sottolineare che gli effetti profibrotici dell'angiotensina II sono comunque mediati da TGF- $\beta^{39}$ .

La proteina morfogenica ossea (*Bone Morphogenetic Protein*, BMP) è una citochina di segnalazione multifunzionale extracellulare scoperta nel 1965 che appartiene alla famiglia TGF- $\beta^{43}$ . Svolge importanti ruoli nei processi dello sviluppo embrionale e nell'omeostasi dell'adulto, ne sono state individuate circa una dozzina di BMP<sup>44</sup>. Secondo recenti evidenze oltre a TGF- $\beta$ 1 anche le BMP sono coinvolte nella cardioprotezione e nel rimodellamento post-infarto<sup>45</sup>. Diversamente da tutte le BMP, BMP1 è una C-proteasi procollagene nonché una metalloproteasi dello zinco che non appartiene alla famiglia TGF- $\beta$  ma ricopre un ruolo fondamentale nell'assemblaggio del collagene insolubile nella matrice extracellulare per la formazione della cicatrice. Individuata nel sangue degli individui sani, BMP1 ha diverse varianti tra cui BMP1.1 e BMP1.3 che convertono precursori della matrice extracellulare in proteine funzionali<sup>44</sup>.

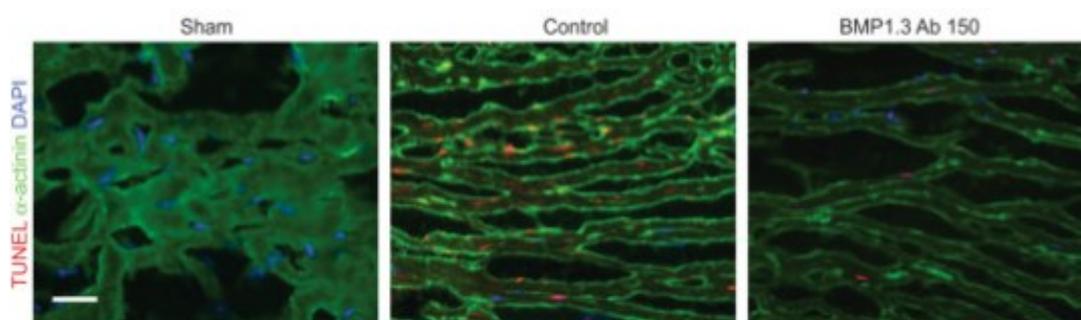
Nel gennaio del 2022 è stato pubblicato un interessante studio che ha dimostrato come l'anticorpo monoclonale anti-BMP1.3 è in grado di mantenere l'attività cardiaca dopo un evento ischemico. Il razionale consiste nell'evidenza che BMP1.3 è presente sia in persone sane sia in persone colpite da infarto miocardico nelle quali però vi è un aumento significativo del valore. È stato così prodotto un anticorpo monoclonale anti-BMP1.3 murino con la tecnica dell'ibridoma. L'analisi farmacocinetica condotta nei ratti ha evidenziato che quando si somministra questo anticorpo per via endovenosa, il picco di concentrazione plasmatica si evidenzia in 3-6 ore persistendo a minori concentrazioni per i successivi tre giorni. La **Figura 9** dimostra come la quantità di collagene (marcato con colorante rosso Sirius) e il processo di fibrosi cardiaca è minore nei ratti trattati con l'anticorpo anti-BMP1.3 rispetto al gruppo di controllo. L'attività dell'anticorpo monoclonale è stata confermata tramite la somministrazione di dosi ripetute di anti-BMP1.3 a topi che avevano subito un infarto. A due mesi dal trattamento è stato riscontrato che nel gruppo trattato con l'anticorpo monoclonale la cicatrice era minore e i principali parametri di funzione cardiaca erano più

elevati rispetto ai non trattati (controlli). Da sottolineare che l'azione di anti-BMP1.3 ha ridotto la fibrosi non solo a livello cardiaco ma anche in altri organi come fegato e reni<sup>45</sup>.



**Figura 9** Studio condotto in modello animale (ratto): quantificazione della fibrosi cardiaca nel gruppo controllo e nei ratti a cui è stato somministrato l'anticorpo anti-BMP1.3<sup>45</sup>.

Lo studio ha inoltre valutato la possibile interferenza dell'anticorpo anti-BMP1.3 con il TGF- $\beta$ . Effettivamente, l'anticorpo monoclonale ha ridotto i livelli di espressione del TGF- $\beta$  dimostrato dalla diminuzione dei geni bersaglio di questo fattore di crescita. Lisil ossidasi (*lysyl oxidase*, *Lox*) è uno dei geni bersaglio di TGF- $\beta$  ed è responsabile della reticolazione del collagene nella cicatrice. Lo studio ha dimostrato che l'anti-BMP1.3 riduce i livelli di *Lox* e genera una cicatrice più elastica e meno matura. La **Figura 10** conferma che anti-BMP1.3 ha un effetto di protezione diretto sui cardiomiociti indipendentemente dalla riduzione della fibrosi. Infatti, nel gruppo controllo si può osservare un maggior numero di cardiomiociti morti rispetto al gruppo trattato con anti-BMP1.3 a due giorni dall'infarto<sup>45</sup>.



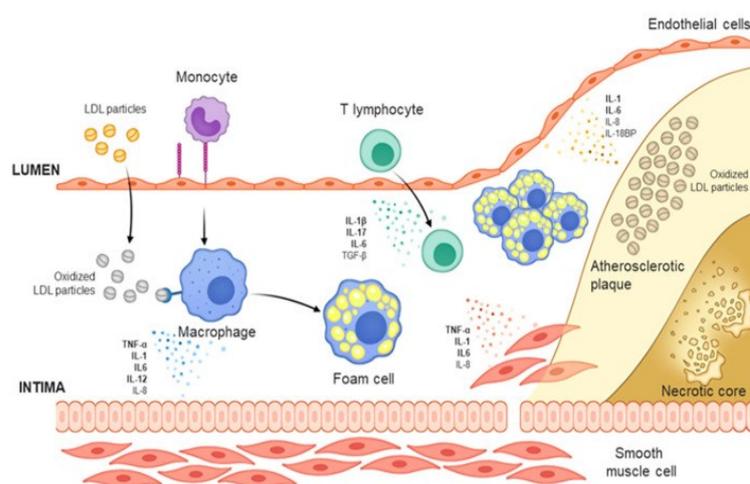
**Figura 10** Studio controllo in modello animale (ratto): colorazione di sezioni cardiache effettuate con analisi TUNEL e marcatore cardiomiocitario  $\alpha$ -actinina che mostrano l'entità di morte cellulare nei vari gruppi<sup>45</sup>.

Dato che la proteina morfogenica dell'osso (BMP) presenta più isoforme si è anche valutato il loro eventuale ruolo nell'effetto cardioprotettivo evidenziando che BMP5 è un possibile mediatore della cardioprotezione. Tutti i dati raccolti mostrano che l'anticorpo monoclonale anti-BMP1.3 esercita un effetto antifibrotico, di

protezione dei cardiomiociti e regola la formazione di cicatrici a seguito di infarto del miocardio<sup>45</sup>. Tuttavia, saranno necessari altri studi sia in modelli animali sia in pazienti per potere passare all'uso clinico di questo anticorpo.

### 2.2.1 Patogenesi dell'aterosclerosi

L'aterosclerosi è una patologia progressiva che consiste nell'accumulo di lipidi ed elementi fibrosi nelle arterie di grandi dimensioni<sup>46</sup>. Le cellule endoteliali sono soggette a diversi stress di taglio a seconda del flusso sanguigno e questo viene regolato da meccano-sensori che, posti nell'endotelio, rilevano i cambiamenti del flusso inducendo un segnale alle cellule endoteliali. Alla base dell'aterosclerosi c'è la disfunzione delle cellule endoteliali causata dall'alterazione dei sensori di flusso e/o della risposta immunitaria conseguente all'accumulo di colesterolo nell'intima arteriosa, modifica favorita dagli elevati livelli di LDL nel sangue. L'apolipoproteina B (apoB), costituente delle LDL, favorisce l'aggregazione dei lipidi circolanti nello spazio subendoteliale dove subiscono delle modifiche come l'ossidazione da parte dei ROS con formazione di LDL ossidate (oxLDL). Queste ultime stimolano l'attivazione delle cellule endoteliali, l'infiltrazione delle cellule immunitarie e l'infiammazione dei tessuti circostanti (fenomeno conosciuto anche come necroptosi)<sup>47</sup>. Nello specifico, i monociti aderiscono all'endotelio per poi migrare nell'intima dove proliferano e si differenziano in macrofagi che, fagocitando le lipoproteine, si trasformano in cellule schiumose. L'accumulo iniziale delle cellule schiumose porta a una lesione chiamata "stria di grasso". Nel tempo queste vanno incontro a morte conferendo il carico di lipidi nel nucleo necrotico della lesione formato dall'accumulo nella parete arteriosa di colesterolo extracellulare, detriti cellulari e cellule necrotiche<sup>46,47</sup>.



**Figura 11** Meccanismo di formazione della placca aterosclerotica<sup>48</sup>.

I leucociti una volta entrati nell'endotelio subiscono il cosiddetto "rotolamento" ovvero aderiscono a questo per mezzo di molecole di adesione e fattori chemiotattici quali le selectine P ed E, l'integrina  $\alpha 4\beta 1$  (*Very Late Antigen-4*, VLA-4) e la molecola di adesione intercellulare ICAM (*Intercellular Cell Adhesion*

*Molecole*)<sup>46</sup>. La risposta immunitaria e quella infiammatoria sono quindi meccanismi chiave nello sviluppo dell'aterosclerosi in quanto la secrezione di varie citochine come il TNF- $\alpha$  e le interleuchine IL-6 e IL-1 $\beta$  causano la crescita della placca<sup>48</sup>. Al fenomeno concorre anche l'aumento della permeabilità endoteliale che contribuisce a questo processo. A seguito del rotolamento e dell'aderenza, le cellule immunitarie subiscono diapedesi transendoteliale<sup>47</sup>. Le cellule muscolari lisce endoteliali penetrano nell'intima dove tramite una conversione fenotipica diventano cellule proliferative producendo proteine quali collagene, elastina e proteoglicani che divengono la base del cappuccio fibrotico che si forma a seguito della progressione della placca. Nel tempo, il cappuccio si assottiglia aumentando l'instabilità della placca. Si forma quindi una placca con un nucleo necrotico ricco di lipidi associato a un cappuccio fibrotico sottile e instabile. A seguito della rottura di questa, che normalmente avviene ai margini della lesione per la ricca presenza di cellule schiumose, si verifica il fenomeno di trombosi a cui seguiranno vari eventi clinici<sup>46,47</sup> (**Figura 11**).

### **2.2.2 Anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9**

L'ipercolesterolemia è il fattore di rischio principale nello sviluppo di patologie cardiovascolari aterosclerotiche le cui cause possono essere genetiche oppure secondarie ad altre patologie. Nel primo caso l'ipercolesterolemia è primitiva e tra le varie forme l'ipercolesterolemia familiare è la malattia genetica più frequente. La scoperta delle statine ha permesso la riduzione delle lipoproteine a bassa densità (LDL-C) anche se meno della metà degli eventi cardiovascolari possono essere prevenuti anche con l'associazione di altri farmaci ipolipemizzanti<sup>49</sup>.

L'interesse di PCSK9 è derivato dalla conduzione di diversi studi<sup>49</sup>. In particolare si è dimostrato che PCSK9 circola nel plasma e che le mutazioni che colpiscono questa proteina possono interferire con la sua sintesi o secrezione determinando una riduzione nei livelli plasmatici di LDL<sup>50</sup>. PCSK9 (proproteina convertasi subtilisina/kexina 9) è una proteina scoperta nel 2003 che ha dimostrato fin da subito un ruolo importante nella regolazione del colesterolo e quindi nei meccanismi alla base dello sviluppo della placca aterosclerotica<sup>51</sup>. Il gene umano PCSK9 è localizzato sul cromosoma 1p32 e codifica per uno zimogeno sintetizzato nel reticolo endoplasmatico come glicoproteina che non è ancora in grado di legarsi al recettore delle LDL (preproPCSK9, di 72 kDa). Successive modifiche post-traduzionali rendono PCSK9 maturo e secreto come eterodimero al di fuori delle cellule epatiche. Esso agisce in modo non enzimatico inducendo la degradazione endosomiale e lisosomiale dei recettori delle LDL. Nello specifico, PCSK9 ha un ruolo fondamentale nell'omeostasi del colesterolo in quanto si lega ai recettori delle LDL indirizzandoli verso la degradazione nel lisosoma degli epatociti regolando i livelli di LDL nel plasma<sup>49</sup>. PCSK9 viene prodotta anche dalle cellule endoteliali, dalle cellule muscolari lisce vascolari e, in misura minore, dai macrofagi. PCSK9 quindi genera downregulation dei recettori per le LDL sulla superficie dei macrofagi riducendo il numero di cellule schiumose. Questo potrebbe far pensare ad un effetto ateroprotettivo, sebbene le LDL native non sono l'unica fonte di accumulo di lipidi nei macrofagi<sup>49</sup>.

PCSK9 ha effetti sulla placca aterosclerotica anche indipendentemente dal ruolo che riveste sul metabolismo lipidico. I macrofagi fagocitano le oxLDL e questo porta alla formazione di cellule schiumose. Le ox-LDL entrano nei macrofagi attraverso i recettori scavenger (SR) di cui *lectin like ox-LDL receptor-1* (LOX-1) è il recettore principale che fagocita le oxLDL aumentando la loro concentrazione nelle arterie<sup>49,52</sup>. In questo contesto, PCSK9 sovraesprime tutti i recettori scavenger tra cui LOX-1 determinando un aumento nell'assorbimento di oxLDL. Per i macrofagi un eccesso nell'assorbimento di colesterolo è tossico; per questo si proteggono mediante l'efflusso di colesterolo, tramite vari carriers tra cui gli ABCA1. In questo contesto si è osservato che PCSK9 inibisce l'efflusso di colesterolo sottoregolando il gene ABCA1 e la corrispondente proteina. PCSK9, inoltre, promuove l'infiammazione riducendo i livelli di ApoER2, un altro tipo di recettore per le LDL che lega l'apolipoproteina E nonché proteina di trasporto del colesterolo che si occupa di ridurre l'accumulo di lipidi nei macrofagi e la conversione di questi nel fenotipo infiammatorio<sup>52</sup>.

Gli inibitori di PCSK9 sono valide alternative per ottenere una riduzione dei lipidi quando la terapia con statine ed ezetimibe non produce i risultati attesi<sup>49</sup>.

In particolare, nel 2015 evolocumab e alirocumab sono stati i primi anticorpi monoclonali aventi come bersaglio PCSK9 approvati per l'impiego in terapia da FDA ed EMA. *Nissen et al.* hanno condotto uno studio di fase III multicentrico, randomizzato, in doppio cieco controllato con ezetimibe a gruppi paralleli che ha confrontato l'efficacia in 24 settimane di 420 mg al mese di evolocumab con 10 mg al giorno di ezetimibe in pazienti non trattabili con statine. Lo studio ha arruolato 511 pazienti di entrambi i sessi, intolleranti ad un numero di statine  $\geq$  a 3 o a 2 statine qualora una di questa fosse stata atorvastatina  $\leq$ 10 mg. Il trial ha evidenziato la maggiore efficacia di evolocumab rispetto al trattamento con ezetimibe. Il trial è stato suddiviso in tre steps; il primo, della durata di 24 settimane, è stato ulteriormente ripartito in due periodi. Nel primo periodo ai pazienti è stato assegnato in maniera casuale atorvastatina 20 mg/die o un placebo; ha seguito un washout di due settimane e crossover alla terapia alternativa per le successive 10 settimane. Sono stati ammessi al successivo step i pazienti che avevano manifestato problematiche muscolari durante l'assunzione di atorvastatina ma non del placebo o pazienti con creatin chinasi superiore di 10 volte il limite fisiologico durante la terapia con statine. In questa fase della durata di 24 settimane, i pazienti randomizzati sono stati trattati con evolocumab 420 mg per via sottocutanea o ezetimibe 10 mg/die per os. Successivamente, terzo step della durata di 2 anni, si è proseguito lo studio in aperto durante il quale i pazienti hanno continuato la somministrazione dell'anticorpo monoclonale al fine di valutarne la sicurezza e l'efficacia<sup>53</sup>.

Successivamente, è stato condotto un ulteriore studio clinico randomizzato, in doppio cieco con evolocumab controllato con placebo, della durata di circa due anni. Sono stati arruolati 27564 pazienti affetti da aterosclerosi e con livelli di LDL maggiori o uguali a 70 mg/dL in trattamento con statine. Tramite randomizzazione, ad alcuni pazienti è stato assegnato evolocumab mentre ad altri è stato somministrato il placebo, entrambi per via sottocutanea. Dopo 48 settimane, è stata documentata una riduzione dei livelli di colesterolo da 92 mg/dL a 30 mg/dL per coloro che avevano ricevuto l'anticorpo monoclonale. Lo studio

ha evidenziato che evolocumab in pazienti con aterosclerosi è in grado di ridurre i livelli LDL e, anche, di diminuire gli eventi cardiovascolari<sup>54</sup>.

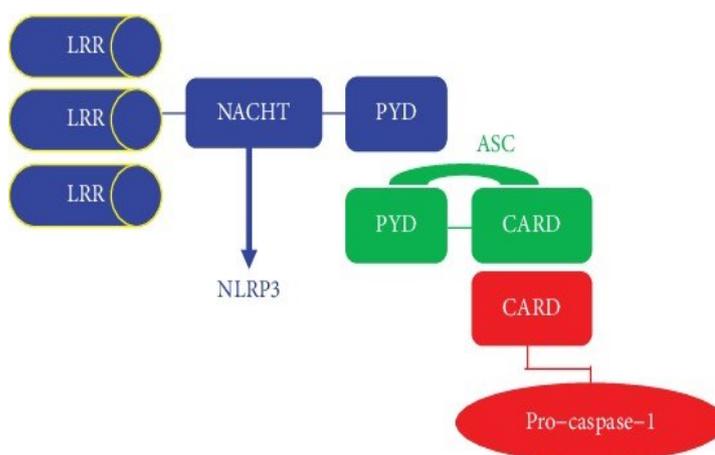
Un ulteriore studio clinico multicentrico, randomizzato in doppio cieco, è stato condotto in quattro Paesi europei. I pazienti che sono stati arruolati avevano un'età pari o superiore a 18 anni ed erano stati sottoposti ad intervento coronarico percutaneo per infarto acuto del miocardio con evidenza angiografica di aterosclerosi coronarica senza ostruzione importante. Inoltre, l'idoneità veniva garantita se i livelli plasmatici di LDL prima dell'intervento coronarico percutaneo si aggiravano attorno ai 125 mg/dL se non in trattamento con statine da almeno 4 settimane o di 70 mg/dL se in trattamento con statine da un tempo minimo di 4 settimane. Ai pazienti sono state somministrate ogni due settimane per 52 settimane alirocumab 150 mg, o placebo, per via sottocutanea. I risultati hanno confermato che la somministrazione dell'anticorpo anti-PCSK9 associato alla terapia con statine è in grado di ridurre l'aterosclerosi. Inoltre, è stato suggerito come l'utilizzo di questo anticorpo monoclonale in maniera precoce può avere effetti preventivi sul fenotipo e sulla composizione della placca<sup>55</sup>.

Lo studio GLACIER (*Goal of Oxidized Ldl and Activated Macrophage Inhibition by Exposure to a Recombinant Antibody*), multicentrico di fase II randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, ha valutato l'attività, la sicurezza e la tollerabilità della somministrazione intravenosa di un anticorpo monoclonale chiamato MLDL1278A in pazienti in trattamento standard per malattia cardiovascolare aterosclerotica<sup>56</sup>. Questo studio ha arruolato 147 pazienti di entrambi i sessi, con età compresa tra i 35 e 80 anni. Come criteri di inclusione sono stati considerati pazienti con nota infiammazione vasale dovuta alla placca ateromatosa, pazienti con patologia aterosclerotica stabile documentata da almeno 3 mesi o pazienti affetti da diabete mellito di tipo II con elevato rischio cardiovascolare. Sono rientrati nello studio anche coloro che prima dello screening erano in trattamento da almeno 6 settimane con statine, ACE inibitori, bloccanti del recettore dell'angiotensina, terapia ipolipemizzante diversa da statine, tiazolidinedioni, steroidi inalatori o agenti che modificano i leucotrieni<sup>56</sup>. In questo studio clinico si è stimata l'infiammazione vascolare tramite una tecnica di imaging chiamata FDG PET-CT. I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi, al primo è stata somministrata una singola dose di anticorpo monoclonale, al secondo gruppo sono state somministrate dosi multiple, mentre al terzo gruppo è stato somministrato il placebo. Lo studio ha concluso che la somministrazione di MLDL1278A non ha avuto un effetto significativo sull'infiammazione della placca carotidea. Questo risultato inconcludente potrebbe essere stato influenzato dal fatto che i pazienti erano già in trattamento con una terapia ipolipemizzante<sup>57</sup>.

### **2.2.3 Infiammazione: ruolo dell'inflammasoma**

L'inflammasoma è un complesso macromolecolare multiproteico citosolico attivato dal sistema immunitario innato che funge da piattaforma per la maturazione di citochine infiammatorie<sup>58,59</sup>. Numerose sono le evidenze che correlano l'inflammasoma con patologie autoinfiammatorie, autoimmuni, malattie degenerative e disordini metabolici<sup>59</sup>. E' noto, inoltre, che l'inflammasoma funge da mediatore proinfiammatorio nelle malattie cardiovascolari anche se i precisi meccanismi d'azione non sono stati

ancora del tutto chiariti<sup>58</sup>. Sono stati identificati vari tipi di inflammasomi, tuttavia quello più noto è l'inflammasoma intracellulare NLRP3 (*Nod-Like Receptor Protein 3*). Il principale componente dell'inflammasoma NLRP3 è caratterizzato da un dominio N-terminale che include PYD (*Pyrin Domain*), CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain* ovvero dominio associato alla caspasi) e il dominio di oligomerizzazione legante i nucleotidi (NOD/NACHT). Il dominio C-terminale, invece, è caratterizzato da LRR (ripetizione ricca di leucina) che permette d'identificazione di patogeni e, in seguito, la cascata di effetti biologici. L'attivazione canonica dell'inflammasoma inizia dal riconoscimento dell'immunità innata, tramite recettori di riconoscimento dei pattern (PRRs), di modelli molecolari associati a patogeni (PAMPs) o modelli molecolari associati al danno (DAMPs). Questo primo segnale chiamato *priming* induce l'oligomerizzazione di NLRP3 e il reclutamento di ASC attraverso interazioni PYD-PYD. Successivamente tramite il legame CARD-CARD si arriva all'oligomerizzazione delle proteine pro-caspase-1 che per scissione auto-protolitica si converte in caspasi-1 attiva la quale converte le pro-leucine IL-18 e IL- $\beta$  in interleuchine IL-18 e IL- $\beta$  attive generando così una robusta risposta infiammatoria locale e sistemica. Questa prima fase è importante in quanto induce la trascrizione dei componenti dell'inflammasoma. Segue poi un segnale di "innescò" che permette l'assemblaggio dell'inflammasoma nel citosol<sup>58-60</sup> (**Figura 12**).



**Figura 12** Struttura dell'inflammasoma NLRP3. Nel dominio N-terminale è possibile individuare il dominio pirinico (*Pyrin Domain*, PYD), il dominio associato alla caspasi (*Caspase Activation and Recruitment Domain*, CARD) e il dominio di oligomerizzazione legante i nucleotidi (*Nucleotide binding Oligomerization Domain*, NOD/NACHT). Il dominio C-terminale si compone, invece, della ripetizione ricca di leucina (*Leucine-Rich Repeat*, LRR). Durante il *priming* dell'inflammasoma, pro-caspase-1 nonché forma inattiva, per scissione auto-protolitica viene convertita in caspasi-1 attiva<sup>58</sup>.

L'attivazione dell'inflammasoma differisce a seconda che le lesioni siano acute o croniche. Nel primo caso, si ha una veloce e importante risposta dell'inflammasoma che richiede un intervento terapeutico tempestivo. Nel secondo caso, invece, l'inflammasoma è attivo in maniera meno significativa contribuendo così alla progressione della malattia che può essere rallentata da un intervento farmacologico la cui finestra terapeutica è più ampia. L'inflammasoma è quindi coinvolto in diverse patologie cardiovascolari, tra cui l'aterosclerosi<sup>60</sup>. Questo è stato dimostrato da uno studio in cui topi deficitari di apolipoproteina E sono stati alimentati con una dieta ricca di colesterolo. Già dopo due settimane si è osservato il deposito di

cristalli di colesterolo nel nucleo necrotico e nella zona subendoteliale associato alla presenza di cellule immunitarie; lo stesso fenomeno non è stato osservato nei topi che seguivano una dieta equilibrata<sup>61</sup>.

Nell'aterosclerosi sono particolarmente coinvolte le interleuchine IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  che sono prodotte localmente e agiscono sulle cellule endoteliali influenzando la formazione, lo sviluppo e il distacco della placca aterosclerotica. Le lipoproteine ossidate attivano l'inflammasoma NLRP3 che promuove la fuoriuscita di catepsina B nel citoplasma. In seguito, l'innescò di IL-1 induce la produzione di IL-6 creando un ambiente protrombotico con stimoli proinfiammatori e procoagulanti<sup>62</sup>.

Di fronte a queste evidenze sono stati condotti numerosi studi per valutare l'azione degli anticorpi monoclonali nei confronti delle interleuchine attivate dall'inflammasoma nelle patologie cardiovascolari. Tuttavia, relativamente all'aterosclerosi, lo studio delle diverse fonti bibliografiche ha permesso di individuare un solo trial clinico relativo alla somministrazione di un anticorpo monoclonale mirato all'inflammasoma. Nel 2017 è stato pubblicato lo studio relativo a un trial di fase III (CANTOS) randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, relativo alla valutazione degli eventi cardiovascolari a seguito della somministrazione sottocutanea trimestrale di canakinumab, un anticorpo monoclonale avente come target l'interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Lo studio ha valutato l'effetto di canakinumab nel prevenire gli eventi cardiovascolari in pazienti maggiorenni di entrambi i sessi con elevati livelli di proteina C-reattiva ad alta sensibilità (PCR $\geq$ 2 mg/L), colpiti da infarto del miocardio un mese prima dell'arruolamento nello studio. Il trial è proseguito con ulteriori due sottostudi mirati a verificare gli effetti della somministrazione continua di anticorpo monoclonale<sup>63,64</sup>. È emerso che 48 mesi dopo la prima somministrazione, l'anticorpo monoclonale non diminuiva i livelli di lipidi ma inibiva i livelli di proteina C-reattiva (-26% con somministrazione di 50 mg di mAb, -37% con 150 mg di mAb e -41% con 300 mg di mAb). La somministrazione di 150 mg di canakinumab ha dato risultati significativi per l'end-point primario e secondario (comprendente la rivascolarizzazione per angina instabile). Tuttavia, i risultati non hanno raggiunto la significatività statistica riguardo la mortalità per tutte le cause. Lo studio ha potuto concludere che la somministrazione trimestrale di 150 mg di canakinumab porta ad una riduzione significativa degli eventi cardiovascolari rispetto al placebo<sup>63,64</sup>. In Italia canakinumab è autorizzato per il trattamento di varie patologie, ad esempio nella febbre familiare mediterranea, ma non nelle ipercolesterolemie.

Evidenze scientifiche hanno dimostrato l'importanza di altre interleuchine nello sviluppo dell'aterosclerosi. L'interleuchina 37 (IL-37) appartiene alla grande famiglia della IL-1. È espressa nelle cellule muscolari lisce delle arterie coronarie e nelle placche aterosclerotiche. La sua azione antinfiammatoria è stata dimostrata dall'aumento della stabilità e dalla riduzione della composizione della placca. Studi preclinici eseguiti in topi carenti di ApoE, l'IL-37 ricombinante ha ridotto l'aterosclerosi e la calcificazione vascolare. Anche IL-38 sembrerebbe svolgere azioni antinfiammatorie così come l'IL-33 che generando una risposta T helper di tipo 2 favorisce la risoluzione dell'infiammazione. Al contrario, l'IL-18 è una citochina proinfiammatoria il cui effetto è stato evidenziato dalla riduzione della placca aterosclerotica a seguito della delezione del gene codificante per IL-37 in topi carenti di ApoE<sup>62</sup>.

### 3. Terapia genica

#### 3.1 Aspetti generali

L'Agenzia Europea per i medicinali (*European Medicines Agency, EMA*) inserisce la terapia genica nella grande famiglia dei medicinali per le terapie avanzate (*Advanced Therapy Medicinal Products, ATMPs*) basandosi sull'utilizzo di geni, cellule o tessuti. La terapia genica, dall'inglese *gene therapy*, consiste in un gene ricombinante nonché un tratto di DNA sintetizzato in laboratorio proveniente da fonti diverse che, veicolato nel corpo, vanta effetti profilattici, diagnostici o terapeutici e in quest'ultimo caso mira a diverse malattie ivi inclusi disordini genetici, cancro o patologie a lungo termine<sup>65</sup>.

La FDA, oltre a definire la terapia genica in maniera analoga rispetto a quanto indicato dall'EMA, sottolinea anche i diversi meccanismi con i quali è possibile allestirla. Precisamente, può consistere nella sostituzione di un gene determinante la malattia con una copia sana del gene stesso, nell'inattivazione del gene responsabile della patologia oppure nell'espressione di un gene nuovo o modificato in modo tale da contribuire al trattamento della patologia. L'FDA, inoltre, si sofferma anche sui diversi prodotti genici ottenibili, tra cui il DNA plasmidico che consiste in una molecola circolare di DNA ingegnerizzata permettendo così l'inserimento del gene corretto che poi verrà introdotto nell'organismo umano. Molto utilizzati sono anche i vettori virali, modificati al fine di renderli innocui per l'organismo e sfruttati come veicoli per l'inserzione di geni terapeutici. Oltre a questi anche i vettori batterici vengono sfruttati in modo analogo. La tecnologia di editing genetico umano, invece, mira a riparare i geni mutati o a interrompere nel genoma l'espressione dei geni dannosi. Rientrano in questo contesto anche i prodotti di terapia genica cellulare derivati dal paziente dal quale vengono prelevate le cellule "malate" e dopo averle modificate geneticamente vengono reintrodotti nel paziente servendosi di un vettore, spesso virale<sup>66</sup>.

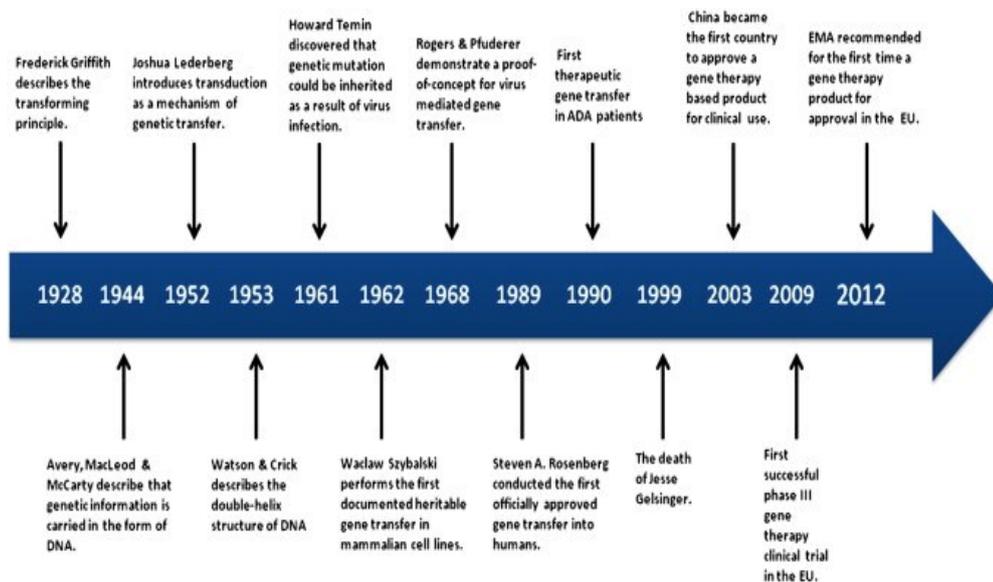


Figura 13 Timeline degli avvenimenti più importanti nello sviluppo della terapia genica<sup>67</sup>.

A partire dalla fine degli anni venti del secolo scorso si sono susseguiti una serie di eventi che hanno determinato la nascita della terapia genica (**Figura 13**).

Tutto ebbe inizio nel 1928 con la pubblicazione del *Griffith's Experiment*, un rapporto del batteriologo britannico Frederick Griffith, che nello studio epidemiologico della polmonite batterica scoprì che mescolando prima batteri viventi non virulenti di forma R del pneumococco di tipo I con batteri inattivati dal calore di forma S virulenta del pneumococco di tipo II e iniettandoli nei topi, si assisteva alla morte di questi a causa della polmonite batterica. Secondo Griffith alla base c'era una teoria secondo la quale si poteva avere una trasformazione da un tipo batterico ad un altro, teoria che fu poi confermata negli anni seguenti da altri studiosi che riuscirono a ottenere la stessa trasformazione non più *in vivo* ma *in vitro*<sup>67</sup>. Nel 1932 lo scienziato James L. Alloway individuò il *transforming principle* responsabile della trasformazione batterica che nel 1944 grazie ad Avery, McCarty e MacLeod si svelò essere causata dall'acido desossiribonucleico ovvero dal DNA. Alla fine degli anni quaranta, il genetista e microbiologo Joshua Lederberg oltre a individuare la coniugazione batterica come possibile meccanismo di trasferimento genetico, assieme a Norton Zinder introdusse il termine trasduzione per spiegare come i fagi potevano trasferire il materiale genetico e come era possibile l'acquisizione, da parte di specie batteriche diverse, di resistenza nei confronti dello stesso antibiotico<sup>67</sup>. Dopo la scoperta negli anni cinquanta della struttura a doppia elica del DNA da parte di Watson, Crick, Wilkins e Franklin, nel 1961 Howard Temin capì che a seguito di un'infezione virale specifiche mutazioni genetiche potevano essere ereditate e questo gettò le basi per la comprensione che l'informazione genetica può anche fluire dall'RNA al DNA. Nel 1962, la prima prova documentata di trasferimento genico ereditario in cellule mammifere (*DNA-mediated heritable transformation of biochemical trait*) pubblicata da Szybalski ha permesso di dimostrare che un difetto genetico può essere annullato trasferendo il tratto di DNA funzionale corrispondente da altra fonte evidenziando che il gene traslato può essere ereditato dalle cellule figlie<sup>67</sup>. Altra pietra miliare nella scoperta della terapia genica è avvenuta nel 1968 quando Rogers e Pfunderer hanno dimostrato come il virus del mosaico del tabacco poteva essere utilizzato come vettore virale. Successivamente, gli stessi scienziati hanno eseguito il primo studio di terapia genica umana utilizzando come vettore il *Shope papilloma virus* ipotizzando che contenesse il gene codificante l'arginasi capace di migliorare la malattia del ciclo dell'urea da deficit di arginasi (argininemia). Le due ragazze protagoniste di questo studio non evidenziarono un miglioramento della malattia e solo negli anni seguenti si capì che il motivo del fallimento era dovuto al fatto che il genoma virale non conteneva il gene codificante per l'arginasi<sup>67</sup>.

Nel 1972, per fronteggiare le preoccupazioni dell'opinione pubblica riguardanti l'eticità e i rischi della *gene therapy*, sono stati avanzati degli standard etici per l'applicazione clinica. Nonostante ciò, a causa di un intervento di ingegneria genetica discutibile moralmente, negli anni ottanta è stato emanato un rapporto sulla terapia genica denominato *Splicing Life* da parte della Commissione del Presidente degli USA nel quale è stata sottolineata la differenza tra trattamento medico, potenziamento non medico e tra editing di genoma umano somatico e germinale<sup>68</sup>.

La differenza fondamentale tra la terapia genica somatica e germinale consiste nel fatto che nel primo caso il materiale genetico viene inserito nelle cellule bersaglio e il carattere non viene trasmesso alla progenie mentre nel secondo caso questo avviene. Nello specifico, nella terapia genica di linea germinale a spermatozoi e ovuli vengono inseriti dei geni funzionali determinandone l'integrazione nell'intero genoma e l'ereditarietà alle generazioni future. Diversamente, nella terapia genica somatica l'introduzione del gene funzionale alle sole cellule somatiche è sufficiente a generare un effetto terapeutico<sup>69</sup>. Questo è stato un punto di svolta in quanto l'attuale legislazione permette la terapia genica alle sole cellule somatiche<sup>67</sup>.

Alla fine degli anni ottanta il Comitato consultivo del DNA ricombinante (RAC) ha approvato il primo protocollo clinico per l'inserimento di un gene estraneo negli esseri umani tramite vettore retrovirale<sup>67</sup>. Sono quindi stati raccolti i linfociti infiltranti il tumore in pazienti affetti da melanoma metastatico e, successivamente alla coltivazione *in vitro*, gli stessi linfociti sono stati reinseriti nel corpo dei pazienti malati. Sono stati trattati due pazienti affetti da melanoma avanzato con linfociti infiltrati modificati ed esperimenti il fattore di necrosi tumorale. Nel 1990, la FDA ha approvato per la prima volta uno studio di terapia genica a scopo terapeutico tramite vettore retrovirale. Sono stati trattati due bambini affetti da una malattia monogenica che comporta immunodeficienza a causa del deficit dell'enzima adenosina deaminasi. I globuli bianchi sono stati prelevati dai pazienti e sottoposti a modifica *ex vivo* per esprimere il gene che codifica per la corretta forma di adenosina deaminasi. Lo stesso studio è stato poi avviato in Europa<sup>67,68</sup>. Dopo l'avvio di numerosi studi di terapia genica per il trattamento di molteplici malattie, nel 1999 un paziente diciottenne ha preso parte ad uno studio clinico di terapia genica per sopperire alla carenza dell'enzima epatico ornitina transcarbamilasi necessario per l'eliminazione di azoto da amminoacidi e proteine. Sfortunatamente il sistema immunitario del giovane ha risposto in maniera massiccia alla somministrazione del vettore adenovirale causando la morte per insufficienza multiorgano. Questa vicenda è ricordata come la prima morte collegata a un vettore virale<sup>67</sup>.

Altri importanti avvenimenti sono accaduti negli anni duemila. In particolar modo, nel 2003 la Cina è stato il primo paese ad approvare per l'uso clinico un prodotto di terapia genica con vettore virale mirato al trattamento del carcinoma a cellule squamose della testa e del collo<sup>67</sup>. Nel 2009 Cerepro, farmaco contenente un vettore adenovirale, è stato il primo prodotto di terapia genica in Europa ad aver concluso la fase III dello studio clinico mirato al trattamento del glioma in pazienti già sottoposti a resezione chirurgica del tumore<sup>67</sup>. Nel 2012, l'EMA ha approvato un prodotto di terapia genica in Europa nominato Glybera per il trattamento del deficit di lipoproteina lipasi<sup>67</sup>. Purtroppo il farmaco non è più disponibile anche per i suoi elevatissimi costi.

Secondo uno studio condotto avvalendosi di un database contenente informazioni su tutti gli studi di terapia genica condotti in tutto il mondo, tra il 1989 e il 2015 sono stati condotti, completati o approvati 2335 trial clinici. I picchi sono stati raggiunti nel 1999, nel 2008 e nel 2015 con, rispettivamente, 117, 120 e 163 studi. Dei 36 paesi, agli Stati Uniti deve essere riconosciuta la percentuale maggiore di studi clinici condotti (66,81%). Nel continente europeo, invece, il Regno Unito si è contraddistinto per lo svolgimento di circa la metà dei trial clinici europei mentre agli ultimi posti si è posizionato il continente asiatico con Cina

(2,44%) e Giappone (1,1%). Per quel che concerne le indicazioni approvate, il cancro si attesta al primo posto (64,41%), infatti l'oncologia rappresenta un campo di notevole interesse per il costante aumento di casi. Al secondo posto di questa classifica si contraddistinguono le malattie monogeniche (10%) che essendo meno frequenti vengono incentivate nello studio tramite agevolazioni fiscali. Solo l'8% degli studi è indirizzato alle patologie infettive e cardiovascolari<sup>70</sup>.

Dalla sua nascita, la terapia genica ha avuto uno sviluppo altalenante registrando successi alternati a periodi più bui. Nell'ultimo decennio il tutto sembra essersi stabilizzato e attualmente il ritmo è in costante crescita tanto da aver fatto progredire la definizione di terapia genica permettendo, non solo modifiche permanenti del DNA cellulare, ma anche cambiamenti nella traduzione del gene in proteine. Purtroppo, gli elevati costi continuano a rappresentare dei limiti che meritano di essere risolti<sup>71</sup>.

La terapia genica si basa su due approcci. Il primo e il più comune consiste nel prelievo ematico del paziente e nella riprogrammazione delle cellule alterate in laboratorio per poi reintrodurle nell'organismo<sup>72</sup>. In questo caso la modifica viene effettuata su cellule *ex vivo*<sup>67</sup>. Questa strategia è adatta a colpire un determinato organo perciò numerosi studi preclinici sono stati condotti nel trattamento della cecità e delle malattie che colpiscono le diverse componenti dell'occhio come la cornea e la degenerazione retinica. Purtroppo, la terapia genica *ex vivo* non si presta al trattamento di organi interni come cervello, cuore e polmoni, per questo si è sviluppata la terapia genica *in vivo* che attualmente è protagonista di alcuni studi clinici per il trattamento di malattie ereditarie e potenzialmente anche di malattie acquisite come malattia arteriosa aterosclerotica, rigetto dell'innesto cardiaco e stenosi dopo interventi vascolari<sup>69</sup>. Questo secondo approccio induce la modifica genetica direttamente nel corpo ovvero nelle cellule *in vivo*<sup>67,72</sup>. Il continuo progresso ha permesso di svolgere sperimentazioni in organi come fegato e cuore anche se l'assenza di insorgenza di una risposta immunitaria rimane ancora una sfida. Basti pensare che circa il 50% dei pazienti vengono esclusi dai trial a causa di una già esistente immunità nei confronti dei capsidi virali. A questo proposito diversi studi sono stati condotti per ovviare il problema dell'immunità<sup>73</sup>. Nel futuro la speranza è quella di sfruttare la terapia genica, certamente per trattare malattie legate a un solo gene alterato, ma anche per patologie cardiovascolari e nel dolore cronico dove sono coinvolti più geni mutati<sup>72</sup>. Probabilmente nella vasta area della biotecnologia, la terapia genica è attualmente la più promettente sia per le recenti scoperte, sia per le prospettive future<sup>73</sup>.

Per trasferire il gene di interesse nella cellula bersaglio, la terapia genica può avvalersi dei vettori virali oppure dei vettori non virali. Quest'ultimi hanno il vantaggio di una tossicità e immunogenicità limitata con una produzione su scala moderatamente ampia. Purtroppo, però, non rilasciano il gene nella cellula target in maniera efficiente e con un'espressione prolungata impedendo, così, la loro applicazione a patologie che hanno questa necessità. I vettori virali, seppure la loro sicurezza sia più ridotta rispetto ai vettori non virali, sono stati modificati al fine di migliorare la loro farmacocinetica e farmacodinamica a vantaggio del paziente<sup>69</sup>.

### 3.1.1 Scelta dei vettori per il trasferimento genico

L'allestimento della terapia genica si basa su tre scelte. La prima consiste nell'identificare il vettore virale più adatto che influenzerà la dimensione della "cassetta di espressione" cioè del costrutto (secondo step). Solo alla fine verrà considerata la modalità di consegna del vettore. È da sottolineare che la selezione del vettore virale si deve basare sulla capacità di carico di questo, su una possibile continua espressione genica, sulla tossicità del vettore e sull'integrazione o meno del genoma virale nel genoma umano. Il vettore virale deve essere manipolato geneticamente in modo da ottenere una forma ricombinante, la quale seppur in grado di infettare la cellula bersaglio, non deve essere in grado di replicarsi e dare una risposta immunogenica nell'ospite. Il vettore virale ricombinante si ottiene dunque dalla rimozione del genoma del virus wild-type ad eccezione delle sequenze in *cis* necessarie per il suo impacchettamento<sup>74</sup>. Attualmente per il trasporto genico possono essere utilizzati diversi tipi di vettori virali, tra cui i virus adeno-associati (AAV), adenovirus (Ads), retrovirus, poxvirus e virus dell'Herpes Simplex (HSV). Ogni virus ha delle caratteristiche peculiari e questo rende ragione del fatto che un vettore virale non può essere adatto a tutte le applicazioni<sup>75</sup>.

### 3.1.2 Virus adeno-associati

Il virus adeno-associato (AAV), scoperto nel 1965, appartiene al genere *Dependovirus* della famiglia dei Parvovirus. Anche se in linea generale gli AAV possiedono un capsido proteico icosaedrico senza involucro, possono essere utilizzati come vettori per diversi tessuti bersaglio in quanto ogni sierotipo ha un capsido particolare che gli conferisce un'affinità specifica a determinati recettori cellulari. Il genoma consiste in un singolo filamento lineare di DNA con due frame di lettura. I geni codificanti per le proteine di replicazione Rep78, Rep68, Rep52 e Rep40 sono contenuti in posizione 5' mentre nel frame di lettura in posizione 3' sono contenuti i geni codificanti per le proteine del capsido VP1, VP2 e VP3. I virus adeno-associati non sono in grado di replicarsi in maniera autonoma e per questo necessitano di un virus helper, come l'*Herpes virus* o l'adenovirus, per penetrare nel nucleo. Il virus penetra nella cellula inserendosi con il sito S1 del cromosoma 19 e dando avvio alla replicazione nell'ospite dopo che il capsido ha attecchito alla cellula servendosi di proteoglicani eparan solfato carichi negativamente potenziato da recettori di fattori di crescita e integrine co-recettrici. Negli studi clinici il sierotipo 2 di AAV è quello più utilizzato<sup>75</sup>. È stato osservato che il genoma virale non si integra nell'ospite in quanto forma concatameri circolari che rimangono nelle cellule senza mai dividersi anche se in grado di esprimere il transgene per mesi. Gli AAV sono spesso preferiti nella terapia genica *in vivo* in quanto, data l'esistenza di almeno 12 sierotipi, presentano tropismi specifici per cellule e tessuti; inoltre, hanno una bassa immunogenicità, una buona sicurezza clinica e la capacità di trasduzione sia nelle cellule in divisione che nelle cellule quiescenti. Tuttavia, i costi elevati e i limitati organi bersaglio sono solo alcuni degli ostacoli che limitano l'applicazione di questi vettori<sup>76</sup>.

Per la creazione di vettori virali adeno-associati è importante sottolineare che la dimensione della cassetta di espressione deve essere inferiore a 5 kb e che il transgene deve essere convertito da singolo a doppio

filamento<sup>77</sup>. Il virus adeno-associato viene dunque privato dei geni codificanti per le proteine Rep e Cap consentendo la creazione di uno spazio più che sufficiente all'inserimento del DNA di interesse. Rep, Cap e altri geni helper vengono inseriti in uno o due plasmidi mentre le sequenze ITR hanno tutti gli elementi necessari per la replicazione e l'impacchettamento. Infine, vengono utilizzate cellule renali embrionali per la trasfezione dei plasmidi e del virus ricombinante<sup>75</sup>.

Secondo una recente revisione, l'AAV è il vettore virale più promettente per il trasferimento genico nei pazienti affetti da malattie neuromuscolari. Tuttavia, l'approvazione da parte di FDA, EMA e AIFA di Luxturna®, un prodotto di *gene therapy* mirato al trattamento della malattia retinica ereditaria basato su vettori virali AAV2, ha aperto le porte per l'utilizzo di questi vettori virali anche in altri tipi di patologie. È anche in fase di studio l'utilizzo di vettori adeno-associati per le patologie che colpiscono il sistema nervoso centrale. Inoltre, sforzi sono stati condotti per comprovare l'utilizzo di AAV nell'espressione genica a livello epatocitario dei fattori della coagulazione VII e IX per il trattamento dell'emofilia<sup>78</sup>.

### 3.1.3 Adenovirus

La scoperta dell'adenovirus (Ad) risale al lontano 1953 anno in cui è stato ritrovato per la prima volta nel tessuto adiposo umano. Vi sono 7 specie di adenovirus umano (da A a G) e 57 sierotipi; Ad2 e Ad5 appartenenti alla specie C sono i più utilizzati in terapia genica. Il capsido proteico icosaedrico che ospita il DNA non presenta l'involucro ma la sua particolarità consiste in una proteina pentamerica di base ad ogni vertice del capsido dalla quale si sviluppa una proteina di fibra trimerica che termina con un dominio globulare a manopola. Il genoma virale è un doppio filamento di DNA di lunghezza variabile tra i 26 e i 40 kb. Si presenta molto compatto e si compone di una regione precoce e una regione tardiva corrispondenti alle sequenze di trascrizione<sup>75</sup>. Importante sottolineare che E1, E2, E3, E4 sono le quattro unità trascrizionali contenute nella regione precoce. Inoltre, in ciascuna estremità del filamento si possono riconoscere sequenze di ripetizione terminale invertita (ITR) corrispondenti a circa 103 coppie di basi. L'invasione del virus nella cellula ospite ha inizio nel momento in cui il dominio globulare a manopola interagisce con CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*), proteina recettoriale di coxsackievirus e adenovirus espressa in un gran numero di cellule umane. Mediante endocitosi il virus penetra nell'ospite e il virione viene diretto nel nucleo della cellula dove inizia il processo di trascrizione virale. Al termine la cellula ospite si disintegra permettendo la fuoriuscita del virus<sup>75</sup>. Da sottolineare che gli adenovirus non si integrano nel genoma dell'ospite<sup>76</sup>.

I vettori adenovirali possono essere carenti di replicazione oppure oncolitici competenti di replicazione. È possibile riconoscere tre generazioni di vettori adenovirali. La prima è mancante della regione E1A/E1B. Si crea così uno spazio di circa 4,5 kb sufficiente a inserire il genoma richiesto. Nella seconda generazione, lo spazio è ulteriormente ampliato dall'assenza dei siti E2 ed E4. La terza generazione è anche chiamata adenovirus helper dipendente o gutless in quanto sono assenti tutte le sequenze eccetto gli ITR e i segnali

di confezionamento<sup>76</sup>. I vettori adenovirali di prima generazione sono i più utilizzati negli studi clinici, ne sono esempi i vettori Ad2 e Ad5 della specie C<sup>75</sup>.

Esistono diversi metodi che consentono l'allestimento di vettori adenovirali. Secondo il metodo originale, il vettore virale si allestisce co-trasfettando in cellule embrionali renali o in altri tipi di cellule che contengono E1 in *trans* il genoma dell'adenovirus e un plasmide contenente il genoma di interesse. A causa della bassa incidenza di ricombinazione e della complessità del processo si è sviluppata un'altra modalità che si avvale di *Escherichia coli* per effettuare la ricombinazione omologa dell'inserzione del gene esogeno dal plasmide all'adenovirus. Si ottiene un vettore ricombinante che ha tutti i componenti necessari per la replicazione nei batteri. Anche se efficiente, questo metodo richiede l'utilizzo di due diversi ceppi di *E. coli* e una certa difficoltà nell'individuare le modifiche genomiche. Per ottenere vettori di elevata resa virale ed espressione del gene target è dunque necessario trasfettare separatamente plasmidi Ad ricombinanti in cellule renali embrionali. Questa problematica ha comportato lo sviluppo della terza modalità che evita la ricombinazione nei batteri in quanto le cellule embrionali renali vengono co-trasfettate con il plasmide contenente la sequenza genica di interesse e un plasmide di packaging che presenta la maggior parte del genoma adenovirale. Infine, il quarto approccio consente la clonazione diretta del genoma adenovirale in un vettore plasmidico assieme al gene che si vuole far esprimere e la successiva trasfezione in una linea cellulare helper. Questo metodo anche se impegnativo permette la clonazione e l'assemblaggio del genoma adenovirale<sup>79</sup>.

I vettori adenovirali ricombinanti vengono sfruttati in diversi ambiti anche se la terapia genica antitumorale rimane la principale. È stato condotto un trial clinico in cui i pazienti affetti da una particolare forma di neoplasia toracica non resecabile, il mesotelio pleurico maligno (*Malignant Pleural Mesothelioma*, MPM), sono stati trattati con due dosi terapeutiche di un vettore adenovirale ricombinante difettoso di replicazione e contenente il gene codificante per l'interferone  $\alpha 2\beta$  (IFN  $\alpha 2\beta$ ) associato a celecoxib e chemioterapia per un ciclo di 14 giorni. Il razionale di questo studio consiste nel generare una vaccinazione *in situ* determinante un'importante risposta immunitaria che da un lato induce morte cellulare e dall'altro modifica il microambiente tumorale. I risultati hanno dimostrato che la chemioterapia associata a immunoterapia genetica aumenta i livelli di sopravvivenza globale garantendone la fattibilità, la sicurezza e la tollerabilità<sup>80</sup>.

Un altro esempio di come può essere utilizzato un vettore adenovirale ricombinante nella terapia genica è dato dal disegno ReCAP trial. Uno studio adattivo, multi-sito, senza soluzione di continuità, randomizzato e in aperto di fase II/III mirato ai pazienti con nuova diagnosi di cancro alla prostata. In questo caso è stata valutata l'efficacia di una terapia genica suicida mediata da un vettore adenovirale competente per la replicazione associata a radioterapia<sup>81</sup>. Per terapia genica suicida si intende l'utilizzo di proteine virali per convertire i pro-farmaci in farmaci attivi e quindi tossici per le cellule tumorali<sup>75</sup>. Infatti, nel disegno sperimentale la somministrazione del vettore adenovirale ricombinante è stata seguita dal profarmaco 5-fluorocitosina e valganciclovir che si è dimostrato radiosensibilizzare per le cellule tumorali. Questo disegno ha gettato le basi nel facilitare la ricerca di nuove strategie limitando i tempi richiesti del disegno

sperimentale ed è stato approvato dall'FDA per lo studio ReCAP consentendo anche l'arruolamento dei pazienti<sup>81</sup>.

Il vettore adenovirale ricombinante è stato utilizzato anche in uno studio che mirava a verificare il suo effetto nella fibrogenesi epatica. Partendo dal presupposto che l'attivatore del plasminogeno (PAI-1) è potenzialmente profibrotico, è stata indotta la fibrosi epatica nei ratti e successivamente è stato somministrato il vettore adenovirale contenente la sequenza siRNA in grado di downregolare PAI-1. Come risultato si è ottenuto un miglioramento della fibrosi cardiaca, un aumento della proliferazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi cellulare<sup>82</sup>.

### 3.1.4 Retrovirus

I retrovirus rappresentano un'ulteriore categoria che viene sfruttata per l'allestimento di vettori virali. Essi si suddividono in retrovirus semplici (denominati anche retrovirus oncogeni) e retrovirus complessi come lentivirus e spumavirus. Entrambe le categorie presentano la stessa struttura virale di base che consiste in un capsido proteico circondato da un doppio strato lipidico esprimente glicoproteine di superficie e transmembrana. Il genoma virale è un singolo filamento lineare di RNA all'interno del quale è possibile identificare un dominio codificante in cui è espresso il gene pro che codifica per la proteasi virale e altri tre segmenti contenenti i geni gag, pol ed env relativi a proteine coinvolte nell'integrazione, replicazione ed incapsulamento virale. Ciò che contraddistingue i retrovirus è la capacità di convertire il singolo filamento di RNA in un doppio filamento di DNA per mezzo della trascrittasi inversa che subentra successivamente all'interazione tra le glicoproteine dell'involucro virale e i recettori dell'ospite<sup>75</sup>. Il retrovirus è stato il primo vettore a essere utilizzato nella terapia genica *in vivo* ma attualmente è stato sostituito a causa degli svantaggi che possono derivare dal suo utilizzo come la possibilità che il genoma si integri nel cromosoma ospite provocando una mutagenesi inserzionale oltre che necessitare di cellule in divisione per l'inserimento del proprio genoma nell'ospite<sup>76</sup>. Per allestire il vettore retrovirale si parte dal presupposto che, per essere difettosi nella replicazione, si devono rimuovere i geni gag, pol ed env. Lo spazio creatosi verrà sfruttato per l'inserimento del genoma di interesse. Si prosegue con la creazione di tre plasmidi. Nel primo vengono inseriti i geni gag e pol in un plasmide mentre il gene env viene inserito in un secondo plasmide. Il plasmide di confezionamento contiene invece il restante genoma virale con la sequenza di DNA da far esprimere. I tre plasmidi vengono successivamente trasfettati in cellule di packaging<sup>75</sup>.

I vettori retrovirali hanno trovato impiego negli studi di ingegneria molecolare e riparazione tissutale. In particolar modo sono stati sfruttati per far esprimere fattori di crescita e fattori di differenziazione di cellule ossee e cellule staminali oltre che permettere la riparazione cartilaginea e consentire l'angiogenesi per il trattamento di patologie cardiovascolari<sup>75</sup>.

### 3.1.5 Lentivirus

I lentivirus sono una sottocategoria di retrovirus di cui il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) è l'esempio più comune. Il lentivirus, a differenza dei retrovirus semplici, ha un genoma più complesso in quanto vanta due geni regolatori e quattro geni accessori codificanti per proteine necessarie alle diverse fasi del ciclo cellulare<sup>75</sup>. Sebbene questo vettore virale trovi impiego principalmente nelle terapie geniche *ex vivo*, oggi viene sfruttato anche nella terapia genica *in vivo* e, più in particolare, nel trattamento di malattie croniche e monogeniche. Diversamente dai retrovirus, i lentivirus sono in grado di inserire il genoma dell'ospite anche in cellule che non sono in divisione offrendo così un minor rischio di mutagenesi inserzionale<sup>76</sup>. Nell'allestimento del vettore, vengono eliminati i due geni regolatori, i quattro geni accessori e le sequenze gag, pol ed env. Questo consente di avere lo spazio necessario per l'introduzione del genoma di interesse<sup>75</sup>. Attualmente, l'allestimento di vettori lentivirali si basa sull'utilizzo di tre o quattro plasmidi. Nel primo viene inserito il transgene, le sequenze LTR (*long-terminal repeats*) esprimenti elementi *cis* non codificanti e la sequenza rev. Il secondo plasmide contiene le sequenze gag e pol mentre il terzo plasmide contiene la sequenza genica codificante l'involucro. Il quarto plasmide è previsto solo nel caso in cui la sequenza rev non sia stata inserita nei precedenti vettori<sup>83</sup>. Infine, i plasmidi ottenuti vengono co-trasfettati in cellule renali embrionali<sup>75</sup>.

I vettori lentivirali (*lentiviral vectors*, LV) sono stati spesso protagonisti di studi con cellule ospiti non divisibili come le cellule cardiache e neuronali. Il primo studio clinico approvato e basato sull'utilizzo di questo vettore ha riguardato VRX496<sup>TM</sup> un prodotto di terapia anti-HIV a RNA<sup>75</sup>.

### 3.1.6 Herpes Virus

L'*Herpes simplex* (HSV), il virus che causa l'herpes labiale, viene sfruttato come vettore virale per la capacità di infettare l'ospite e rimanere latente a lungo prima di ricomparire nuovamente. Il capsido proteico icosaedrico è protetto da un involucro virale contenente un gran numero di glicoproteine. Interposto tra nucleocapside e involucro virale, HSV presenta anche il tegumento costituito da una serie di proteine ed enzimi. Il genoma virale consiste in un doppio filamento di DNA suddiviso in segmenti unici lunghi e segmenti unici brevi le cui estremità sono ricoperte da sequenze ripetute e invertite. HSV-1 è la forma più comune di *Herpes virus* che viene utilizzata per l'allestimento dei vettori virali<sup>75</sup>.

La prima tipologia di vettore virale si allestisce eliminando dall'*Herpes virus* i geni  $\alpha$  responsabili della replicazione virale e inserendo, al loro posto, la sequenza di DNA che si vuole far esprimere. Si utilizza successivamente una linea cellulare contenente i geni precedentemente deleti dal virus<sup>75</sup>.

*Kuroda et al.* hanno condotto uno studio per l'allestimento di un nuovo tipo di vettori costituiti da *Herpes simplex*, difettosi nella replicazione e al tempo stesso non tossici. Diversamente dai normali vettori virali difettosi nella replicazione, non sono stati eliminati alcuni geni precoci (come ICP4 che codifica per un fattore di trascrizione o ICP27 che codifica per un regolatore post-trascrizionale) ma l'intera espressione

genica IE (*immediate-early*) inducendo l'eterocromatinizzazione del genoma virale e arrestando l'espressione genica virale dannosa. È importante sottolineare che l'espressione dei geni terapeutici viene mantenuta per l'espressione del trascritto associato alla latenza (LAT). Al virus mutante viene inserita la sequenza genica di interesse ed è poi introdotto in una particolare linea cellulare (USOS-ICP4/27) contenente i geni ICP4 e ICP27 precedentemente deleti nel virus. La resa e la funzionalità di questi vettori può essere notevolmente influenzata dalle condizioni di coltura<sup>84</sup>.

La seconda tipologia di vettori virali ottenibili dall'*Herpes virus* sono i vettori HSV-1 che si replicano condizionatamente e, diversamente dagli altri, sono il risultato della delezione di geni virali non essenziali. Ciò comporta la loro replicazione solo in alcune cellule o tessuti e per questo hanno trovato applicazione nello studio di farmaci applicabili a tumori cerebrali ottenendo la denominazione di vettori oncolitici HSV-1<sup>85</sup>.

Recentemente, l'FDA ha approvato Vyjuvek®, il primo trattamento di terapia genica basato sull'utilizzo di un vettore virale dell'*Herpes simplex* di tipo 1 per una rara forma di malattia cutanea, l'epidermolisi bollosa distrofica<sup>86</sup>. Da poco anche l'EMA ha dato l'approvazione per l'utilizzo dello stesso tipo di preparazione.

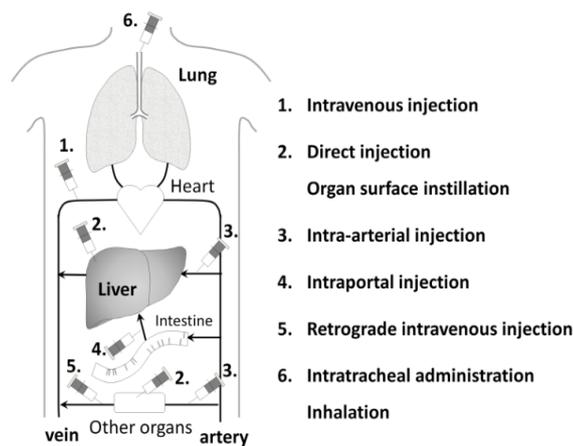
L'epidermolisi bollosa distrofica recessiva è una malattia genetica rara che colpisce la pelle a causa di una mutazione del gene COL7A1 codificante il collagene VII (C7) normalmente assemblato in fibrille di ancoraggio che permettono l'interazione di epidermide e derma. Lo studio condotto ha valutato l'effetto di beremagene geperpavec (B-VEC), un vettore HSV-1 difettoso nella replicazione contenente due copie del gene COL7A1. *In vitro* si è assistito al ripristino dell'espressione del collagene VII nei cheratinociti e nei fibroblasti mentre *in vivo* la produzione di C7 ha permesso il ripristino della cute. Questi risultati hanno consentito lo svolgimento del primo trial clinico randomizzato, controllato con placebo di fase I e II di terapia genica topica. Nove pazienti sono stati trattati per dodici settimane con B-VEC, somministrato per via topica, o con placebo inducendo il raggiungimento degli endpoint primari e secondari riguardanti l'espressione di C7 e il suo assemblaggio nelle fibrille. Inoltre, è stata verificata la riduzione delle ferite e la persistenza della guarigione. Non è stata, invece, valutata la severità del dolore. Il trial ha testimoniato l'efficacia del di B-VEC nel promuovere la guarigione delle ferite<sup>87</sup>.

Come precedentemente anticipato, dopo aver scelto il vettore virale più adeguato al prodotto di terapia genica che si vuole ottenere, il passo successivo riguarda la selezione della cassetta di espressione più adeguata.

Nella terapia genica esistono diverse modalità di espressione del genoma. Ad esempio, negli studi clinici spesso si opta per la sovraespressione di uno o più geni ma altrettanto utilizzati sono gli approcci di knockdown/knockout che si avvalgono di tecniche di interferenza dell'RNA. Valida alternativa può essere la tecnologia di editing genetico (come il sistema CRISP) mentre l'optogenetica e i DREADDs (*Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*) sono sfruttati per il controllo dell'attività cellulare<sup>74</sup>.

### 3.1.7 Modalità di somministrazione del transgene

A seguito della scelta del vettore virale e della cassetta di espressione, la modalità di somministrazione del transgene rappresenta l'ultimo punto cruciale da considerare (**Figura 14**). La via di somministrazione è una decisione rilevante della terapia genica *in vivo* che deve essere presa indipendentemente dal tipo di vettore scelto, virale o non virale, considerando che avrà ripercussioni sul destino e sull'accessibilità del gene somministrato. Una scelta più libera è possibile nel caso in cui le cellule bersaglio siano distribuite in tutto il corpo come macrofagi e cellule dendritiche mentre una particolare attenzione deve essere dedicata a tutti quei fattori che possono in qualche modo influenzare il transgene e che sono diversi a seconda della via di somministrazione scelta<sup>88</sup>.



**Figura 14** Rappresentazione schematica delle possibili modalità di somministrazione del transgene<sup>88</sup>.

Sicuramente la via di somministrazione orale è molto attraente ma allo stesso impegnativa in quanto la barriera epiteliale, il pH acido dello stomaco ma anche i fluidi digestivi sono solo alcune delle problematiche che questa via presenta<sup>88</sup>.

*Guohong et al.* hanno valutato la stabilità di un vettore adenovirale di tipo due (rAAV2) contenente  $\beta$ -galattosidasi e transgeni della proteina a fluorescenza verde potenziata somministrato per via orale. Gli esperimenti condotti *in vivo* hanno dimostrato che nei topi riceventi il prodotto genico in assenza di bicarbonato e aprotinina la stabilità del vettore virale era ridotta, mentre nei topi riceventi il vettore virale ricombinante associato a bicarbonato di sodio e aprotinina il trasferimento genico era migliorato. Purtroppo, però, la trasduzione genica nel tratto gastrointestinale è rimasta comunque inadeguata<sup>89</sup>. Anche se i sistemi non virali sono riconosciuti per la loro ridotta capacità di trasfezione del genoma rispetto ai vettori virali, si sono dimostrati promettenti nella via di somministrazione orale anche se l'espressione genica e l'effetto terapeutico rimane ancora da documentare<sup>90</sup>. A questo proposito è stato condotto uno studio che ha valutato i potenziali delle nanoparticelle lipidiche nelle patologie gastrointestinali. In modelli sperimentali *in vitro*, le nanoparticelle veicolanti siRNA si sono dimostrate stabili anche dopo esposizione a un pH fino a 1,2 mentre la stabilità diminuiva in presenza di pepsina e sali biliari. *In vivo*, invece, è stato dimostrato che le nanoparticelle possono rimanere nel tratto gastrointestinale fino a otto ore. Questo studio non ha garantito

l'efficacia del siRNA ma ha sottolineato la capacità delle nanoparticelle di resistere all'ambiente gastrointestinale, di entrare nelle cellule epiteliali e di rilasciare il loro contenuto<sup>91</sup>.

La somministrazione endovenosa ha il vantaggio di permettere al prodotto inoculato di interagire con una grande varietà di cellule e di organi; tuttavia, gli effetti collaterali si manifestano con maggior facilità<sup>88</sup>. *Shibata et al.* hanno condotto il primo studio che ha permesso di convalidare la somministrazione endovenosa come modalità di rilascio del transgene cocleare veicolato dal vettore adeno-associato rAAV2/9 per l'applicazione della terapia genica nella prevenzione o nel ripristino della sordità causata dalla sordità genetica. Lo studio ha dimostrato la semplicità di questa via rispetto ad altre e ha sottolineato la riproducibilità, l'effetto atraumatico e binaurale nel senso che la trasduzione avviene contemporaneamente nella coclea membranosa e negli organi vestibolari. Ad ogni modo la somministrazione endovenosa non si è dimostrata priva di svantaggi. Infatti l'impossibilità di verificare la consegna del transgene, le limitazioni di volume e di trasduzione derivanti dal tipo cellulare ma soprattutto gli effetti collaterali derivanti dall'espressione del transgene in tessuti diversi da quello bersaglio ne sono esempi<sup>92</sup>.

*Gregory et al.* hanno sfruttato la via di somministrazione endovenosa per l'allestimento di nanoparticelle come approccio terapeutico per il glioblastoma. Il glioblastoma è una forma di tumore cerebrale aggressiva, rappresenta circa il 47% dei tumori al cervello diagnosticati e la sopravvivenza a 5 anni è del 5%. In questa forma tumorale è l'invasività e l'infiltrazione nel tessuto cerebrale, e la protezione della barriera ematoencefalica che lo rende insensibile alla classica chemioterapia. Diversi fattori di crescita e citochine come IL-6 ed EGF sembrano attivare la via STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) tramite la fosforilazione della tirosina determinando la progressione tumorale e l'evasione dal sistema immunitario. Una volta attivato STAT3, la sua traslocazione nel nucleo provoca la trascrizione di geni che inibiscono l'apoptosi e promuovono la proliferazione e la metastatizzazione. In uno studio è stata sfruttata la somministrazione endovenosa e la capacità delle proteine naturali di attraversare la barriera ematoencefalica per indirizzare una preparazione a base di nanoparticelle proteiche sintetiche con albumina sierica umana polimerizzata e il peptide penetrante il tumore (iRGD) veicolante siRNA contro STAT3. Si è osservato sia *in vivo* che *in vitro* la downregulation di STAT3 che, in associazione alla terapia classica, in collaborazione con il sistema immunitario ha promosso la sopravvivenza a lungo termine dei topi portatori di glioblastoma<sup>93</sup>. Con la via di somministrazione endovenosa è stato dimostrato il particolare tropismo epatico dei vettori adenovirali permettendo l'adozione di strategie per ridurre l'espressione del transgene nel fegato. Le problematiche relative all'insorgenza di risposte immunitarie innate e adattive con vettori virali però permangono<sup>88</sup>.

La via di somministrazione locale, sul tessuto bersaglio, permette la consegna del transgene ad uno specifico organo, tessuto o sito e può essere classificata a sua volta in via vascolare e via non vascolare. La via vascolare comprende le vie intra-arteriose, intraportali ed endovenose retrograde mentre la via non vascolare permette la somministrazione direttamente nell'organo bersaglio<sup>88</sup>. *Foley et al.* hanno studiato la somministrazione intra-arteriosa come possibile via per veicolare il vettore virale adeno-associato contenente il gene corretto CLN2 che nella malattia da accumulo lisosomiale denominata

ceroidolipofuscinosi neuronale infantile tardiva (LINCL) è mutato. In questo studio, i topi sono stati trattati con una soluzione iperosmolare di mannitolo che ha determinato la rottura osmotica della barriera ematoencefalica. In seguito è stata effettuata la somministrazione intra arteriosa del prodotto di *gene therapy*<sup>94</sup>.

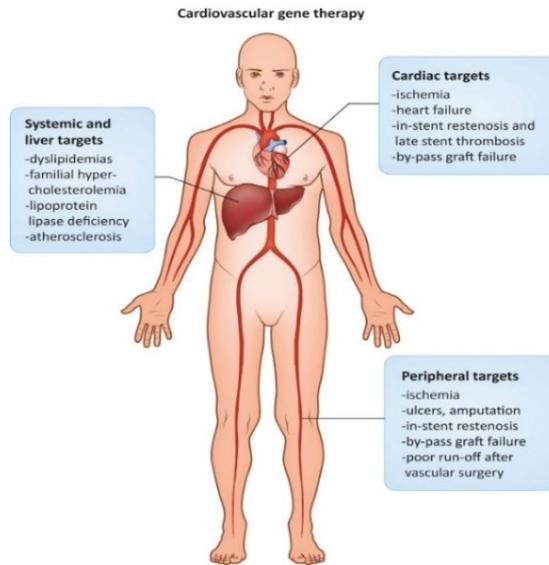
Riassumendo, le vie di somministrazione sistemiche permettono un'ampia distribuzione del prodotto genico ma allo stesso tempo causano anche importanti effetti collaterali. Queste osservazioni hanno promosso le vie di somministrazione locali come valide alternative per la *gene therapy*. E' comunque importante sottolineare che la via di somministrazione dipende dal tipo di malattia che deve essere trattata considerando che ad essa possono essere associate altre strategie.<sup>88</sup>

### 3.2 Sviluppi della terapia genica nelle CVD

Alla fine degli anni ottanta, l'utilizzo della terapia genica in ambito cardiovascolare è diventato realtà a seguito della dimostrazione che il cateterismo endovascolare per il trasferimento genico intra-arterioso era possibile. Purtroppo, però, il successo della terapia genica cardiovascolare in clinica è ancora modesto in quanto la carente conoscenza dei fenomeni fisiopatologici, il limitato trasferimento e la scarsa espressione genica nel sito bersaglio sono solo alcuni dei fattori limitanti<sup>95</sup>.

Nonostante diversi fallimenti, l'approvazione di prodotti di terapia genica è avvenuta nella dislipidemia e nell'ischemia critica degli arti (*Peripheral Arterial Disease, PAD*). In particolare, Glybera è il primo prodotto di terapia genica approvato in Unione Europea per trattare una grave forma ereditaria di carenza di lipoproteina lipasi, che causa elevate concentrazioni di trigliceridi nel sangue postprandiali con grave rischio di pancreatiti. Tuttavia, la licenza di questo vettore adeno-associato di tipo 1 veicolante per la lipoproteina lipasi, somministrato con iniezioni intramuscolari multiple, non è stata rinnovata a causa del ridotto numero di persone affette da questa malattia genetica<sup>95,96</sup>.

L'ischemia critica degli arti è una delle condizioni peggiori associate alla malattia delle arterie periferiche che limita gravemente la perfusione distale degli arti inferiori provocando, nei casi peggiori, la loro amputazione. In questo contesto è stato condotto uno studio di fase II randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo relativo alla somministrazione di NL003, un plasmide contenente una sequenza genica codificante per due isoforme del fattore di crescita degli epatociti HGF (*Hepatocyte Growth Factor*). I risultati hanno dimostrato la sicurezza e l'efficacia nella guarigione delle ulcere agli arti e il sollievo dal dolore dando il via libera allo studio clinico di fase III<sup>97</sup>. Finalmente nel settembre del 2019, il Giappone ha approvato in maniera condizionata e limitata nel tempo Collatogene®, il prodotto di terapia genica caratterizzato da un plasmide veicolante il fattore di crescita degli epatociti somministrato con iniezioni multiple intramuscolari negli arti inferiori<sup>98</sup>.



**Figura 15** Rappresentazione dei principali target di terapia genica cardiovascolare<sup>95</sup>.

La **Figura 15** elenca tutti i possibili bersagli della terapia genica cardiovascolare a livello sistemico, epatico, cardiaco e periferico.

### **Malattia coronarica**

Come risaputo, la cardiopatia coronarica causa un ridotto flusso di sangue al miocardio ma fortunatamente alcuni pazienti possono sviluppare arterie collaterali a sostegno della perfusione cardiaca. Questa conoscenza è stata la base per lo sviluppo di prodotti di terapia genica volti a favorire l'angiogenesi nel miocardico ischemico in quanto, seppure il bypass coronarico e l'angioplastica siano le principali forme di trattamento, non tutti i pazienti sono candidabili. Il fattore di crescita endoteliale cardiovascolare (VEGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita degli epatociti (HGF) e la combinazione di terapia genica e cellulare sono stati a lungo testati per favorire la crescita vascolare (**Tabella 1**)<sup>95</sup>.

| <b>Trial or Author Name</b>     | <b>Vector</b>            | <b>Route</b> | <b>Phase</b> | <b>Enrollment</b> | <b>Outcomes</b>  |
|---------------------------------|--------------------------|--------------|--------------|-------------------|--|
| Rosengart et al <sup>25</sup>   | AdVEGF121                | IMY          | I            | 21                | Tolerated  |
| Kastrup et al <sup>26</sup>     | AdVEGF121                | IMY          | I/II         | 17                | Safe but no effects in exercise capacity and perfusion   |
| Stewart et al <sup>27</sup>     | AdVEGF121                | IMY          | II           | 67                | Improvement in exercise time to 1-mm ST-segment depression, total exercise duration              |
| Kastrup et al <sup>28</sup>     | phVEGF121                | IMY          | II           | 80                | Improved regional wall motion  |
| Hedman et al <sup>29</sup>      | AdVEGF165                | IC           | II           | 103               | Safe and increased perfusion but no differences in the restenosis rate or minimal lumen diameter |
| Ripa et al <sup>30</sup>        | phVEGF165,G-CSF          | IMY          | II           | 48                | Safe but no effects  |
| Stewart et al <sup>31</sup>     | phVEGF165                | IMY          | II           | 93                | No improvement in perfusion  |
| Yang et al <sup>32</sup>        | AdHGF                    | IC           | I            | 18                | Safe   |
| Hartikainen et al <sup>33</sup> | AdVEGF-D <sup>dNdc</sup> | IMY          | I            | 30                | Safe and well-tolerated, increased perfusion   |
| Henry et al <sup>34</sup>       | AdFGF-4                  | IC           | III          | 532               | No difference but gender-specific effects in the exercise tolerance test                         |

**Tabella 1** Elenco dei trial clinici condotti per il trattamento della malattia coronarica utilizzando prodotti di terapia genica<sup>96</sup>.

Come riportato in **Tabella 1**, diversi trial clinici di fase I, II e III sono stati condotti utilizzando vettori virali o DNA plasmidici contenenti la sequenza codificante le diverse isoforme di VEGF, HGF o FGF. Purtroppo, la tabella riporta risultati non particolarmente promettenti.

### **Malattia vascolare periferica**

La malattia vascolare periferica (PAD) si caratterizza per le occlusioni aterosclerotiche delle arterie localizzate negli arti inferiori. In linea generale, i pazienti affetti da PAD sono più anziani e questo non fa altro che aumentare la difficoltà di trattamento dato che le attuali cure farmacologiche sono spesso inefficaci e non tutti i pazienti sono idonei ai trattamenti standard. Anche per la PAD sono stati allestiti prodotti di terapia genica basati sui fattori di crescita endoteliali somministrati per via intra-arteriosa o intramuscolare ma anche in questo caso i risultati non si sono dimostrati incoraggianti<sup>95</sup>.

Diversi studi hanno verificato l'efficacia dei vari sottotipi di VEGF in plasmidi o in vettori virali. Tuttavia, i dati ottenuti sono piuttosto discordanti, in alcuni è stato dimostrato il miglioramento della vascolarizzazione mentre in altri non si è individuata una significativa riduzione del tasso di amputazione. Il fattore *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) media la sua attività angiogenica fosforilando il suo recettore (c-Met, *mesenchymal-epithelial transition factor*) localizzato nelle cellule endoteliali e muscolari lisce vascolari. È stato verificato anche un effetto antinfiammatorio che permette di evitare la formazione di edema e un effetto antifibrotico che comporta una migliore ossigenazione dei tessuti. Purtroppo, anche in questo caso i diversi studi condotti hanno portato a risultati contrastanti<sup>96</sup>.

## **Insufficienza cardiaca**

L'allestimento di prodotti genici mirati all'insufficienza cardiaca, spesso causata dalla progressione della malattia coronarica, richiede dei geni terapeutici diversi rispetto a quelli codificanti i fattori di crescita endoteliale e lo studio CUPID II, approfondito in seguito in questa tesi, ne è la dimostrazione. Sembra che in futuro lo studio dell'associazione di terapia genica e cellulare possa portare a dei risultati promettenti così come le terapie angiogeniche e il trasferimento di acidi nucleici mediante nanoparticelle ed esosomi<sup>95</sup>.

## **Dislipidemie**

Per quanto concerne le dislipidemie, vari sono i possibili target farmacologici; tra questi, la lipoproteina a, la PCSK9, l'apolipoproteina C-III e l'apolipoproteina (a)<sup>95</sup>.

La lipoproteina (a) [Apo(a)] ha proprietà proinfiammatorie e proaterosclerotiche che la rendono un fattore di rischio indipendente per la malattia coronarica quando i suoi livelli plasmatici sono elevati. Attualmente la FDA ha approvato l'aferesi delle lipoproteine come unico trattamento per ridurre gli elevati livelli di lipoproteina (a) ma l'uso clinico è limitato a causa dei costi e della compliance da parte dei pazienti<sup>99</sup>.

Le strategie più recenti per l'inibizione di PCSK9 e apolipoproteina (a) si basano sul silenziamento genico tramite oligonucleotidi antisenso (*Synthetic Antisense Oligonucleotide*, ASO) e siRNA (*short interfering RNA*). Gli ASO sono singoli e corti filamenti di DNA sintetici chimicamente modificati che vengono somministrati per via sottocutanea inibendo nel nucleo la trascrizione genica della proteina bersaglio. I siRNA, invece, permettono una soppressione sequenza-specifica dell'espressione genica. Consistono in un doppio filamento di RNA risultato dall'associazione di un filamento guida (antisenso) e un filamento passeggero (senso) che rilasciati negli epatociti veicolano il filamento guida al trascritto dell'RNA messaggero della proteina target inibendone la traduzione e quindi la sintesi proteica. Essendo molto potente richiede minori somministrazioni sottocutanee.<sup>99</sup> Secondo una recente revisione, gli oligonucleotidi antisenso e i siRNA sono stati sfruttati per inibire la sintesi epatica di apolipoproteina A. In questo contesto Pelacarsen è il più avanzato esempio di ASO coniugato con GaINAc mentre Olpasiran e SLN360 sono i principali esempi di siRNA<sup>99</sup>.

Recentemente si sono sviluppati ASO e siRNA coniugati con GaINAc (N-acetilgalattosamina triantennaria) che sembra migliorare la loro veicolazione al fegato favorendone la loro stabilità, il loro assorbimento e permettendo la somministrazione di una minore dose di farmaco<sup>99</sup>.

AZD8233 è un oligonucleotide antisenso coniugato con GaINAc che prende di mira l'RNA messaggero di PCSK9 a livello epatico inibendo la traduzione e quindi la sintesi della corrispondente proteina. I diversi studi clinici condotti hanno dimostrato la tollerabilità e la riduzione dose dipendente di PCSK9, LDL-C e apolipoproteina B<sup>99</sup>.

Inclisiran è un siRNA anch'esso coniugato con GaINAc agisce mediante l'inibizione epatica di PCSK9; è stato approvato dall'EMA nel dicembre del 2020 per la cura dell'ipercolesterolemia primaria o dislipidemia mista<sup>99,100</sup>.

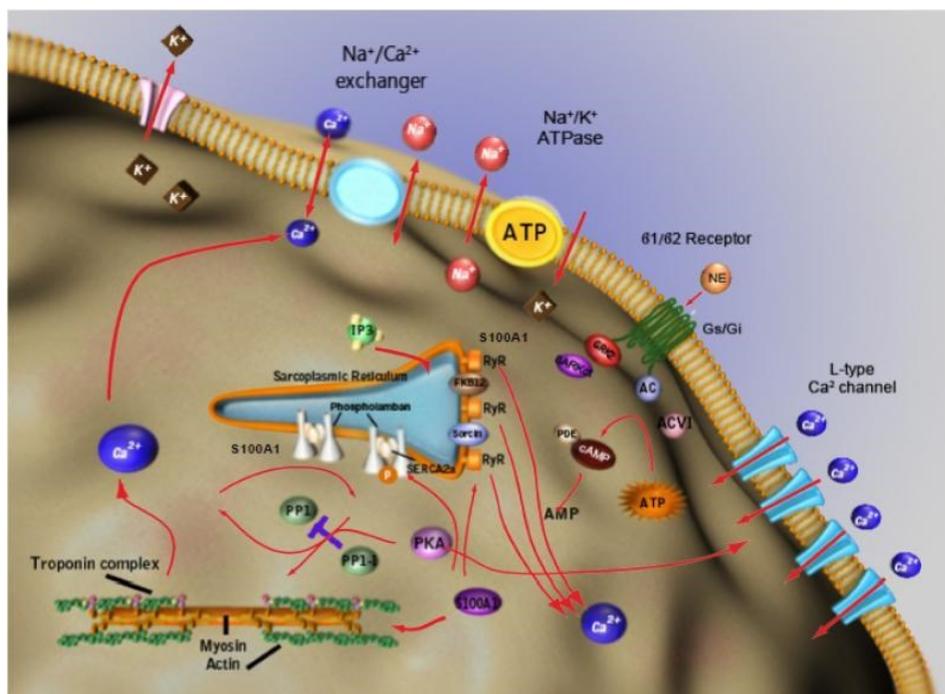
### 3.2.1 SERCA2A come bersaglio di *gene therapy*

L'insufficienza cardiaca è una sindrome clinica che spesso si manifesta come risultato di una gittata cardiaca ridotta associata o meno a pressioni intracardiache elevate. Questo determina una sindrome clinica che si contraddistingue per una varietà di sintomi tra cui dispnea, ortopnea, gonfiore agli arti inferiori uniti a segni come congestione polmonare o elevata pressione venosa giugulare<sup>101</sup>.

Secondo dati recenti, si stima che circa 6,7 milioni di americani di età superiore a 20 anni soffrano di insufficienza cardiaca ed è previsto un incremento fino a 8,5 milioni entro il 2030. Il rischio di scompenso cardiaco nel corso della vita ha raggiunto il 24%, pertanto 1 persona su 4 può sviluppare insufficienza cardiaca. La prevalenza negli adulti statunitensi varia dall'1,9% al 2,6% e questa percentuale tende ad aumentare nella popolazione anziana<sup>102</sup>.

Nell'insufficienza cardiaca i livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare sono anormali. Nello specifico, una riduzione nel rilascio di calcio durante la sistole, una presenza prolungata di calcio a livello intracellulare e un aumento di calcio durante la diastole sono le tre caratteristiche rappresentanti un funzionamento alterato del reticolo sarcoplasmatico<sup>103</sup>.

Nel momento in cui lo ione calcio entra nella cellula tramite i canali del calcio di tipo L, il reticolo sarcoplasmatico rilascia  $\text{Ca}^{2+}$  per mezzo dei recettori canale della rianodina (RyR2) aumentando la concentrazione di calcio libero intracellulare che associato alla troponina C provoca l'accorciamento del sarcomero e la contrazione muscolare. Il rilassamento muscolare, invece, ha inizio dalla chiusura dei recettori RyR2 combinato alla dissociazione del  $\text{Ca}^{2+}$  dal complesso della troponina. Il reticolo sarco/endoplasmatico del calcio ATPasico di tipo 2a (*Sarco/Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPasi*, SERCA2A) ha un ruolo fondamentale nel regolare la contrazione in quanto catalizza la ricaptazione del 70% di  $\text{Ca}^{2+}$  nel reticolo sarcoplasmatico. Da sottolineare che nel ciclo del calcio partecipano anche la protein chinasi A (PKA), la  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulina chinasi (CaMKII) e la protein fosfatasi di tipo 1 (PP1), **Figura 16**<sup>103</sup>.



**Figura 16** *Processo contrazione-eccitazione mediato dallo ione calcio*<sup>103</sup>.

SERCA2 è la principale isoforma di SERCA e SERCA2a è espressa prevalentemente nel cuore. Nello scompenso cardiaco l'espressione e l'attività di SERCA2a è ridotta comportando un'alterata ricaptazione di  $\text{Ca}^{2+}$  nel reticolo sarcoplasmatico e, conseguentemente, un'elevata concentrazione di calcio durante la diastole. Sfortunatamente lo sviluppo di farmaci modulatori di SERCA2a non ha dato i risultati sperati e proprio per questo motivo si è pensato alla terapia genica come valida alternativa per il controllo di SERCA2a nell'insufficienza cardiaca<sup>103</sup>. L'espressione di SERCA2a sottoforma di cDNA in un vettore virale è un promettente approccio di terapia genica volto al trattamento dell'insufficienza cardiaca cronica<sup>104</sup>. Il risultato dovrebbe consistere nell'aumento di espressione di proteine SERCA2a corrette dato che in uno studio è emerso che l'espressione di SERCA2a per mezzo del vettore adeno-associato di tipo 2 porta a un aumento dose-dipendente della contrattilità in animali affetti da insufficienza cardiaca<sup>104,105</sup>.

In linea generale, negli studi preclinici effettuati in modelli animali è stato osservato un aumento nei livelli di SERCA2a dopo la somministrazione di vettori adeno-associati esprimenti il gene codificante per SERCA2a. Inoltre, la tolleranza alla terapia e il ripristino della funzione cardiaca hanno spinto all'esecuzione del primo studio clinico in soggetti umani relativo alla sovraregolazione di calcio tramite somministrazione percutanea di un prodotto di terapia genica. Ha così preso avvio il trial CUPID (*calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease*) di fase I/II. Questo studio multicentrico è stato suddiviso in due fasi. La fase I si è svolta in aperto con un continuo aumento della dose somministrata per infusione intracoronarica, mentre la fase II è stata condotta in modo randomizzato, in doppio cieco, controllato a gruppi paralleli e ha confrontato l'uso del prodotto genico a dosi variabili verso il placebo. Sono stati arruolati pazienti (9 in totale) con scompenso cardiaco avanzato di classe III/IV aventi una frazione di eiezione ventricolare sinistra  $\leq 30\%$ . Altri criteri di inclusione hanno compreso altri

parametri di funzionalità cardiaca quali assorbimento massimo di ossigeno  $\leq 16 \text{ mL}\cdot\text{kg}\cdot\text{min}$ , presenza di un defibrillatore cardiaco impiantabile e la concomitante terapia ambulatoriale per scompenso cardiaco stabile. Dopo un follow-up da 6 a 12 mesi lo studio ha dimostrato un livello di sicurezza accettabile anche se si sono verificati 37 eventi avversi di cui l'81% di gravità lieve o moderata. Per quanto riguarda l'efficacia, dei 9 pazienti trattati dopo il sesto mese diversi hanno mostrato dei miglioramenti in tutti i parametri di efficacia e di attività biologica dello scompenso cardiaco. Questi risultati di fase I hanno permesso l'avvio di uno studio clinico di fase II<sup>106</sup>.

Il trial CUPID II è stato condotto tra il 2012 e il 2014. Lo studio di fase IIb randomizzato, multinazionale, in doppio cieco e controllato con placebo è stato condotto in 67 centri clinici e ospedali in USA, UE e Israele permettendone la connotazione come il più grande trial di *gene therapy* condotto sull'insufficienza cardiaca. Sono stati arruolati 250 pazienti con scompenso cardiaco di classe II-IV e una frazione di eiezione ventricolare sinistra  $\leq 0,35$ . Dopo un follow up di 12 mesi non sono stati evidenziati miglioramenti di eventi ricorrenti rispetto al placebo<sup>107</sup>. A causa dei risultati neutrali del trial CUPID II si è verificata l'interruzione di altri trial clinici tra cui AGENT-HF e SERCA-LVA<sup>104</sup>.

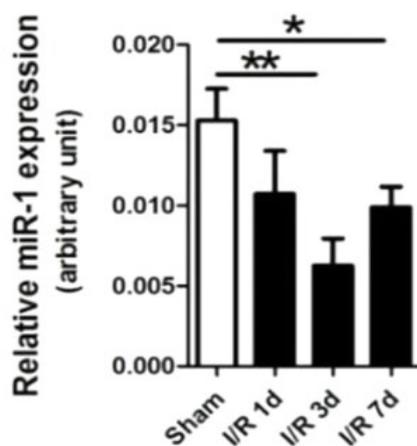
### **3.2.2 Ruolo di miRNA-1 e miRNA-21 nelle complicanze post infarto del miocardio**

I miRNA (*microRNA*) sono sequenze di RNA non codificanti con una lunghezza di circa 22 nucleotidi prodotti a seguito dell'attività trascrizionale dell'RNA polimerasi grazie alla quale vengono convertiti a partire da sequenze di DNA prima in miRNA primari, poi in miRNA precursori e, infine, in miRNA maturi. I miRNA vengono definiti intragenici se prodotti principalmente da introni di geni codificanti proteine o intergenici quando vengono trascritti da un gene ospite ma regolati da propri promotori. In linea generale, i miRNA interagiscono con la sequenza 3' dell'RNA messaggero di una determinata proteina comportandone il suo silenziamento anche se sono state dimostrate interazioni con altre regioni geniche. I miRNA non si occupano solo della soppressione ma anche dell'attivazione genica in determinate condizioni. Inoltre, secondo recenti studi, i miRNA possono essere trasportati in compartimenti subcellulari per il controllo dei processi di trascrizione e traduzione<sup>108</sup>. Queste sequenze non codificanti sono quindi fondamentali in quanto coinvolte in diversi processi biologici come proliferazione cellulare, ematopoiesi, morte cellulare, modellazione del sistema nervoso. Inoltre, agiscono come oncogeni o soppressori delle cellule tumorali, intervengono nelle risposte cellulari allo stress ossidativo e in altri aspetti di omeostasi cellulare<sup>108,109</sup>. Sono potenzialmente utilizzabili come biomarcatori per l'identificazione di malattie, come mediatori delle comunicazioni cellula-cellula e, dunque, la loro espressione alterata è associata a una varietà di patologie<sup>108</sup>.

L'importanza dei miRNA in ambito cardiovascolare è stata compresa solo tra il 2006 e il 2007 grazie anche alla dimostrazione che in modelli animali e in pazienti affetti da insufficienza cardiaca c'era un'espressione alterata di miRNA. Inoltre, sembrano rappresentare valide alternative terapeutiche nei modelli di infarto miocardico, danno da ischemia-riperfusion e aritmie cardiache<sup>109</sup>.

Una recente review sottolinea l'importanza dei miRNA come modulatori dei processi molecolari e cellulari coinvolti nel danno da ischemia-riperfusion che può emergere a seguito della riperfusione miocardica, si propongono quindi come approccio terapeutico successivo all'infarto acuto del miocardio. Quest'ultimo provoca una riduzione del flusso sanguigno nelle arterie coronarie con conseguenti alterazioni del miocardio che possono sfociare nella morte dei cardiomiociti. L'intervento coronarico percutaneo o gli agenti trombolitici vengono selezionati come valida alternativa di riperfusione miocardica ovvero di ripristino tempestivo del flusso sanguigno al cuore. Purtroppo, la riperfusione miocardica è un'arma a doppio taglio perché, se da un lato si ripristina la circolazione sanguigna, dall'altro si verifica un danno mitocondriale che provoca ulteriore morte cellulare costituendo circa la metà del danno miocardico finale. Secondo la suddetta recensione, miRNA-1 e miRNA-21 sono le principali sequenze non codificanti coinvolte nel danno da ischemia-riperfusion in quanto sono i mediatori delle vie di apoptosi nei cardiomiociti danneggiati<sup>110</sup>. miRNA-1 è particolarmente espresso a livello cardiaco e una sua alterata regolazione è considerata dannosa per i cardiomiociti. A seguito di infarto del miocardio e di tempestiva riperfusione, si verifica una riduzione nell'espressione di miRNA-1 che varia nel corso dei giorni. miRNA-1, quindi, viene rilasciato dal miocardio al flusso sanguigno aumentando la sua concentrazione a livello sistemico. Proprio per questo motivo è stato ipotizzato l'utilizzo di miRNA-1 come biomarcatore di danno cardiaco anche se attualmente la difficoltà nel tradurre i risultati preclinici in clinici non lo permette<sup>110</sup>.

In questo contesto, è stato condotto uno studio che ha valutato l'espressione di miRNA-1 nel miocardio di ratti dopo ischemia-riperfusion che ha ipotizzato Hsp90 AA1 (*heat shock protein 90 alpha family class A member 1*) come bersaglio di miRNA-1. Lo studio condotto ha utilizzato dei ratti suddivisi in quattro gruppi. Il primo gruppo ha rappresentato il controllo mentre ai rimanenti tre gruppi è stata eseguita un'occlusione coronarica di 45 minuti con successiva riperfusione analizzata in tempi diversi per ogni gruppo (I/R-1day, I/R-3day e I/R-7day). Si è osservato che nel miocardio dei ratti del gruppo I/R-1d, l'espressione di miRNA-1 è diminuita rispetto al controllo, inoltre nei gruppi I/R-3d e I/R-7d si osserva una riduzione maggiore nei livelli di miRNA-1 rispetto al gruppo I/R-1d (**Figura 17**)<sup>111</sup>.

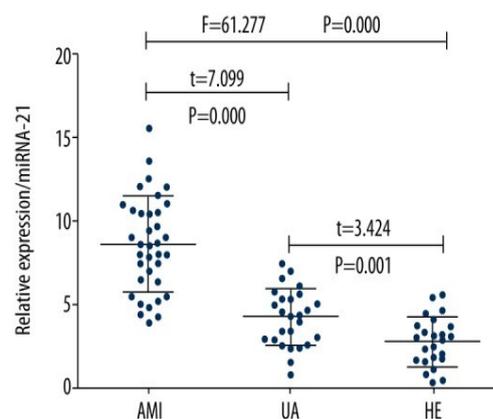


**Figura 17** Rappresentazione dell'espressione di miRNA-1 nei giorni 1, 3 e 7 successivi all'intervento di riperfusione<sup>111</sup>.

Per quanto concerne i cardiomiociti apoptotici, il loro numero è aumentato notevolmente nel gruppo I/R-1day mentre si riduce nei successivi tre gruppi<sup>111</sup>.

Per valutare l'effetto dell'espressione di miRNA-1 sull'apoptosi dei cardiomiociti sono stati trasfettati miRNA-1 mimici e mi-RNA-1 inibitori in cellule ventricolari di ratto neonato. L'espressione di miRNA-1 nelle cellule ventricolari di ratto neonato è aumentata in presenza di miRNA-1 mimici e si è ridotta in presenza di inibitori di miRNA-1. Questi ultimi oltre a comportare la diminuzione dell'espressione di miRNA-1, ha ridotto l'espressione della proteina pro-apoptotica Bax e ha aumentato l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Lo studio ha confermato che la morte dei cardiomiociti è direttamente correlata al fenomeno di ischemia-riperfusion e che in linea generale la sovraespressione di miRNA-1 migliora l'apoptosi mentre una sua riduzione contribuisce al recupero di alcune proteine, tra cui Hsp90 AA1 e Bcl-2 nel miocardio di ratto nel giorno tre e nel giorno sette dopo il fenomeno ischemia-riperfusion. Dai risultati è emerso che la soppressione di miRNA-1 e il recupero di Hsp90 AA1 contribuiscono alla protezione dal fenomeno ischemia-riperfusion<sup>111</sup>. Si è inoltre osservato che miRNA-21 è particolarmente espresso nell'obesità e nelle patologie cardiovascolari anche se il suo effetto cardioprotettivo è ancora dibattuto<sup>110</sup>.

È stato condotto uno studio clinico arruolando trentotto pazienti anziani con età superiore a 65 anni affetti da patologie cardiovascolari. In particolare, alcuni di questi pazienti erano affetti da angina instabile, altri da infarto acuto del miocardio senza sopraslivellamento del tratto ST mentre i restanti 25 anziani sani sono stati selezionati casualmente. Per gli anziani affetti da angina instabile e da infarto acuto del miocardio è stato prelevato un campione ematico di sangue in momenti successivi alla manifestazione della patologia mentre per i pazienti sani il campione è stato prelevato al mattino a digiuno. La **Figura 18** mostra i diversi gradi di espressione di miRNA-21 in base alla patologia<sup>112</sup>.



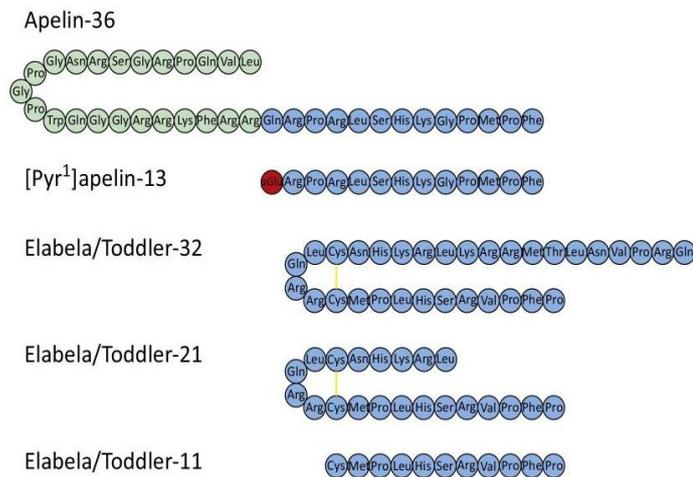
**Figura 18** I livelli di espressione di miRNA-21 aumentano progressivamente dai pazienti sani (*healthy elderly people, HE*), ai pazienti angina instabile (*unstable angina, UA*) fino ai pazienti con infarto acuto del miocardio (*acute myocardial infarction, AMI*)<sup>112</sup>.

Inoltre, è stata dimostrata un'associazione positiva tra l'espressione di miRNA-21 e gli indicatori diagnostici dell'isoforma prevalentemente cardiaca della creatinasi (CK-MB) e di troponina in pazienti con infarto acuto del miocardio. Dunque, da questo studio si evince che in pazienti affetti da infarto acuto del miocardio i livelli di miRNA-21 sono più elevati e questo può supportare l'ipotesi di una sua correlazione con l'apoptosi delle cellule miocardiche e il suo utilizzo come biomarcatore diagnostico di infarto acuto. I risultati supportano l'idea che l'aumentata espressione di miRNA-21 nel siero di pazienti sia correlato all'apoptosi e che la sua espressione errata sia associata a malattie cardiovascolari dato che miRNA-21 è costitutivamente espresso nelle cellule muscolari lisce vascolari, nei fibroblasti e nei miociti cardiaci. Dallo studio condotto sembrerebbe che la sovraespressione di miRNA-21 agisca negativamente nei confronti di TNF- $\alpha$  che normalmente promuove l'apoptosi dei cardiomiociti oltre al processo di infiammazione<sup>112</sup>. Infatti, miRNA-21 inibisce l'apoptosi attraverso l'interazione di PDCD4 nei cardiomiociti infartuati<sup>110</sup>. Alla luce di questo presupposto, *Song et al.* hanno condotto uno studio in cui hanno studiato l'uso di vescicole extracellulari (EV) contenenti miRNA-21 somministrate per via intramiocardica in un modello murino per verificare il recupero della funzione cardiaca. Le cellule renali embrionali umane (HEK293T) geneticamente modificate sono state sfruttate per ottenere miRNA-21 con un elevato livello di espressione. Lo studio ha così dimostrato *in vitro* e *in vivo* il possibile utilizzo di miRNA-21 inserito EV per l'utilizzo nel trattamento dell'infarto miocardico in un modello animale<sup>113</sup>.

Tuttavia, i risultati degli studi fino ad ora ottenuti sono al momento ancora controversi, solo ulteriori studi potranno, in futuro definire se l'impiego di miRNA potrà emergere come nuova tecnologia nel trattamento delle patologie cardiovascolari<sup>110</sup>.

### 3.2.3 ELA gene therapy

Il recettore dell'apelina (APJ receptor), accoppiato alle proteine G (GPCR), è stato scoperto nel 1993 per la sua somiglianza con il recettore dell'angiotensina AT<sub>1</sub> pari al 30% dell'omologia di sequenza ma è rimasto un recettore orfano fino al 1998 quando fu identificata l'apelina come suo ligando osservando così il suo ruolo a livello cardiovascolare grazie alla sua azione di mediatore paracrino/autocrino nelle cellule endoteliali cardiache e vascolari<sup>114</sup>.



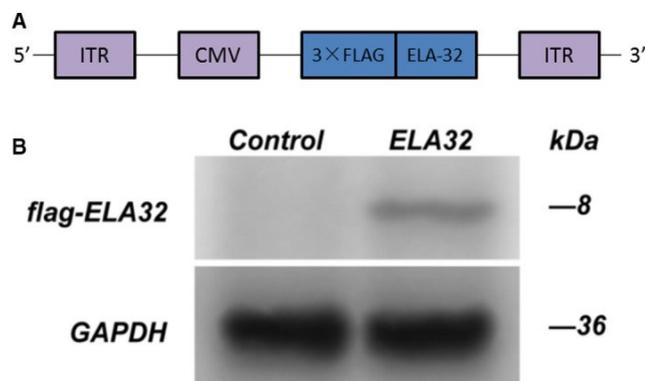
**Figura 19** In base ai siti di scissione proteolitica la pre-proteina apelina si può presentare con un numero diverso di amminoacidi ovvero Apelin-36 e [Pyr<sup>1</sup>] apelin-13. Elabela/Toddler-32, Elabela/Toddler-21 e Elabela/Toddler-11 sono le diverse isoforme di Elabela<sup>114</sup>. Si noti che apelina, elabela e toddler sono sinonimi.

Studi successivi hanno evidenziato Elabela/Toddler come ulteriore ligando del recettore APJ<sup>115</sup>. *Apela*, identificato in una regione non codificante del genoma, è il gene che codifica per Elabela/Toddler che in base alla scissione effettuata dalle peptidasi può presentarsi in tre tipi di peptidi maturi aventi diverso numero di amminoacidi (Elabela/Toddler-32, Elabela/Toddler-21 ed Elabela/Toddler-11, **Figura 19**). Da sottolineare il diverso meccanismo di attivazione che Elabela e apelina svolgono nei confronti del recettore APJ<sup>114</sup>.

Nell'ipertensione, l'asse elabela/apelina-APJ svolge un ruolo fondamentale testimoniato dalla riduzione della loro concentrazione plasmatica nei pazienti ipertesi. Elabela/Toddler regola il tono vascolare svolgendo un'azione vasodilatatoria nelle arterie coronarie con un meccanismo indipendente dal rilascio di NO contrastando così la risposta vasopressoria. Diversamente, l'apelina promuove vasodilatazione con meccanismi NO dipendente e prostanoide-dipendente<sup>116</sup>.

L'ormone secretorio Elabela-32 oltre a permettere l'angiogenesi dopo infarto del miocardio, svolge un ruolo anche nello sviluppo embrionale del sistema cardiovascolare. Sulla base di queste conoscenze è stato condotto uno studio sperimentale per verificare se un prodotto di terapia genica esprime Elabela potesse promuovere l'angiogenesi come alternativa alla classica riperfusione nell'area necrotica infartuata<sup>117</sup>. Nello studio i topi sono stati suddivisi in tre gruppi ovvero il gruppo di controllo non esposto all'infarto, il gruppo

MI+PBS (*Myocardial Infarction + Phosphate-Buffered Saline*) con due iniezioni di PBS a distanza di una settimana nella vena caudale, e il gruppo MI+AAV-ELA in cui il prodotto genico è stato iniettato con le stesse modalità del gruppo precedente. Successivamente i topi sono stati sacrificati per l'analisi del miocardio. La **Figura 20A** mostra l'allestimento del prodotto genico ricombinante<sup>117</sup>.



**Figura 20 A)** Sequenza genica per l'allestimento del vettore virale ricombinante. **B)** Espressione di Ela-32 nel gruppo controllo e nel gruppo che ha subito il trasferimento genico per mezzo di vettore adeno-associato (AAV)<sup>117</sup>.

A due settimane dall'infarto, il gruppo MI+AAV-Ela ha evidenziato valori del peptide natriuretico (*N-terminal pro-B-type Natriuretic Peptide*), di volume diastolico (*Left Ventricular End-Diastolic Diameter*) e di *Low Voltage Differential Signaling* significativamente ridotti, mentre i valori di LVEF (*Left Ventricular Ejection Fraction*) aumentati tra le due e quattro settimane dopo l'infarto<sup>117</sup>.

Dopo quattro settimane dall'infarto e dal trattamento si è verificato che l'espressione di Ela-32 era presente solo nel gruppo trattato con AAV-3xFlag/Ela (**Figura 20B**) e il suo RNA messaggero era espresso in modo elevato nel miocardio. ELA-32 ha aumentato l'espressione dei fattori endoteliali VEGF/VEGFR2 e Jagged1/Notch3, una via di segnalazione che permette la differenziazione e lo sviluppo cellulare, suggerendo la sua funzione nel promuovere l'angiogenesi, inibire la fibrosi miocardica e l'apoptosi con un complessivo miglioramento cardiovascolare. I risultati ottenuti hanno permesso di constatare un possibile utilizzo della Ela *gene therapy* come approccio terapeutico alternativo dell'infarto del miocardio<sup>117</sup>. Ovviamente questi sono dati preliminari ottenuti in modelli animali che andranno ancora studiati in altri modelli e poi verificati in soggetti umani.

## 4. Terapia cellulare

### 4.1 Definizioni

L'EMA definisce i farmaci per la terapia cellulare somatica il risultato della manipolazione che cellule o tessuti possono subire al fine di modificare le loro normali caratteristiche biologiche. Inoltre, per essere considerati tali, le cellule o i tessuti devono essere utilizzati per funzioni diverse rispetto a quelle che normalmente hanno nell'organismo. Questa definizione ha permesso di introdurre i prodotti della terapia cellulare nella grande categoria dei medicinali per le terapie avanzate (*Advanced Therapy Medicinal Products*, ATMPs) che incorpora anche i farmaci derivanti dalla terapia genica e dall'ingegneria tissutale<sup>65</sup>.

I prodotti cellulari per poter essere definiti tali devono soddisfare due criteri. Il primo prevede la manipolazione sostanziale delle cellule come l'isolamento e l'espansione, mentre il secondo criterio indica l'utilizzo di cellule per svolgere attività diverse rispetto a quelle fisiologiche indipendentemente dal fatto che donatore e ricevente coincidano<sup>118</sup>. Dunque, la terapia cellulare consiste nel trasferimento di materiale cellulare autologo o allogenico in pazienti a fine terapeutico e consta di un mercato globale in continua evoluzione tanto che nel 2021 gli investimenti in questo campo si sono aggirati attorno ai 9,5 miliardi di dollari. Si prevede nel 2028 una crescita che toccherà i 23 miliardi di dollari. La terapia cellulare unisce più aree mediche come la medicina rigenerativa, l'immunoterapia e l'oncologia; in particolare si ricorda il trapianto di midollo osseo, il trapianto di epatociti e di equivalenti cutanei<sup>119</sup>. Dermatologia, diabetologia, oftalmologia, infiammazione e malattie del sistema muscoloscheletrico sono le altre aree terapeutiche ma degno di nota è anche il loro ampio impiego nelle malattie cardiache<sup>118</sup>. Purtroppo, gran parte delle terapie cellulari sono collocate ancora nelle prime fasi dello sviluppo clinico mediante l'utilizzo di trattamenti unicellulari e multicellulari, oltre a impiegare cellule staminali o non staminali<sup>119</sup>. Le cellule staminali nella terapia cellulare rappresentano un approccio promettente per la medicina rigenerativa in quanto viene sfruttata la caratteristica di staminalità per la sostituzione cellulare e il rinnovamento tissutale. In particolare, si parla di cellule staminali autologhe quando vengono utilizzate le cellule staminali del paziente stesso permettendo l'applicazione di una terapia *self-to-self* diversamente dalle cellule staminali allogeniche che appartengono a un donatore sano<sup>120</sup>.

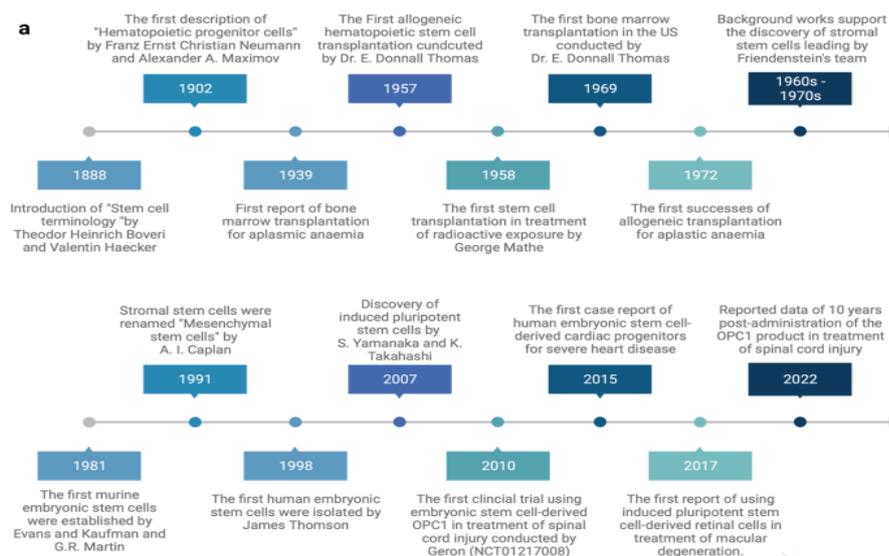
## 4.2 Terapia cellulare staminale

Come precedentemente anticipato, la terapia cellulare può essere allestita con cellule staminali oppure con cellule non staminali.

In quest'ultimo caso, vengono impiegate cellule somatiche tra cui fibroblasti, condrociti, macrofagi, cellule Natural Killer ed epatociti che in seguito al loro isolamento dal corpo umano subiscono una serie di modifiche come propagazione, espansione e selezione per essere, infine, somministrate al paziente non solo a scopo curativo ma anche a scopo preventivo o diagnostico<sup>119</sup>.

La terapia cellulare staminale ha origini lontane quando nel 1868 si capì che il midollo osseo produce cellule del sangue che una volta mature lasciano la cavità midollare per entrare nella circolazione grazie ai vasi sanguigni<sup>121</sup>. Nel 1888 Theodor Heinrich Boveri e Valentin Haecker introdussero per la prima volta la definizione di cellula staminale per indicare una particolare tipologia cellulare nell'embrione capace di differenziarsi in cellule specializzate (**Figura 21**)<sup>120</sup>. Negli anni cinquanta del novecento per preparare i pazienti affetti da leucemia al trapianto di midollo osseo si utilizzava l'irradiazione corporea totale (*Total Body Irradiation*, TBI) o, in alternativa, la ciclofosfamide (Cy) ma solo successivamente si rilevò che la combinazione di TBI e Cy produceva validi risultati<sup>121</sup>. Nel 1957 fu condotto il primo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche da parte del Dr. E. Donnall Thomas in sei pazienti ma solamente due rivelarono attecchimenti parziali a causa degli allora sconosciuti pericoli conseguenti l'operazione<sup>120</sup>. Lo studio fu riportato il 12 settembre 1957 nel *New England Journal of Medicine* in quanto per la prima volta i pazienti furono trattati con infusione endovenosa di midollo proveniente da donatore successivamente a radio e chemioterapia. Purtroppo, non c'erano ancora le necessarie conoscenze sugli antigeni leucocitari umani e sulla compatibilità necessaria tra donatore e ricevente<sup>121</sup>. Negli anni sessanta ci furono importanti sviluppi nell'identificazione degli antigeni leucocitari umani permettendo la scoperta della corrispondenza tra donatore e ricevente. Nel 1969 lo stesso Dr. E. Donnall Thomas realizzò un programma di sperimentazione clinica a Seattle (USA) per il trapianto allogenico di cellule staminali<sup>121</sup>. Nel 1977, otto anni dopo, fu evidenziato che di 100 trapianti solo il 13% dei pazienti era sopravvissuto da 1 a 4,5 anni dopo l'intervento. Proprio per questo motivo Thomas decise di effettuare il trapianto allogenico precocemente rispetto all'avanzare della leucemia acuta riportando un tasso di guarigione del 50%; per questo successo nel 1990 venne insignito del Premio Nobel<sup>121</sup>. Tra gli anni sessanta e settanta Alexander J. Friedenstein e collaboratori individuarono le cellule staminali stromali (*Bone Marrow Stromal Cells*, BMSC) come derivate dal midollo osseo, distinguibili dalla numerosa popolazione ematopoietica per la loro capacità di proliferare come cellule aderenti<sup>120</sup>. Solo nel 1991 è stato coniato definitivamente il termine di cellule staminali mesenchimali per indicare le allora cellule staminali stromali. Negli anni successivi altri numerosi avvenimenti si sono susseguiti e hanno permesso l'inserimento della terapia cellulare staminale nella medicina rigenerativa tra cui la scoperta, alla fine degli anni '90, del trapianto autologo di cellule staminali che, a differenza del tradizionale trapianto, si basa anche sulla somministrazione di farmaci citotossici per eradicare il tumore<sup>120,121</sup>. Gli inadeguati risultati inizialmente raggiunti nel trapianto allogenico erano dovuti alla scarsa conoscenza del fattore limitante il trapianto ovvero la corrispondenza

degli antigeni leucocitari umani tra donatore e ricevente e la necessità di sopprimere il sistema immunitario dopo il trapianto allogenico nel ricevente in modo da controllare una possibile risposta avversa su base immunitaria. Il *graft-versus-leukemia* secondo il quale le cellule T del sistema immunitario colpiscono le cellule malate del ricevente, è diventato un concetto sempre più importante nel combattere il tumore. Ci sono voluti più di 20 anni affinché il trapianto di midollo osseo potesse essere una procedura di scelta per le neoplasie ematologiche; attualmente ha un impatto mondiale e ha aumentato i tassi di sopravvivenza fino al 90%<sup>121</sup>.



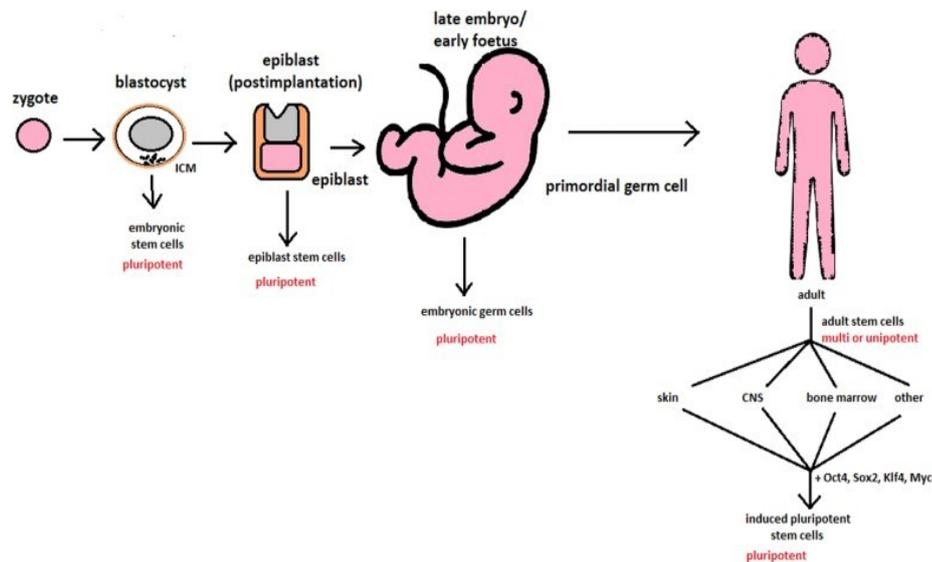
**Figura 21** Principali avvenimenti che hanno determinato la nascita della terapia cellulare con cellule staminali<sup>120</sup>.

#### 4.2.1 Origine delle cellule staminali

L'ampia capacità di auto-rinnovamento nonché la proliferazione diffusa, la potenza ossia la capacità di convertirsi in diversi tipi cellulari e tissutali e l'origine da un singolo clone cellulare rappresentano le caratteristiche fondamentali che permettono di definire le cellule staminali<sup>122</sup>. Esse si presentano non solo nell'embrione ma anche nelle cellule adulte e la loro capacità di differenziamento tende a diminuire man mano che si riduce la loro potenza<sup>123</sup> (**Figura 22**).

Quando lo spermatozoo feconda l'ovulo, si crea lo zigote che appartiene alla categoria delle cellule staminale totipotenti. Queste possiedono il più elevato grado di differenziazione in quanto possono convertirsi in qualsiasi tipo di cellula dell'intero organismo formando sia strutture embrionali che extra-embryonali (come la placenta). A quattro giorni dalla fecondazione si crea la blastocisti, uno stadio dell'embrione preimpianto, caratterizzata dal trofoectoderma responsabile dell'architettura extra-embryonale e dalla massa cellulare interna da cui emergono le cellule staminali pluripotenti (*Pluripotent Stem Cells*, PSCs) che hanno la caratteristica di trasformarsi in qualsiasi tipologia cellulare a patto che non sia extraembrionale. Le cellule staminali embrionali (*Embryonic Stem Cells*, ESCs) provengono proprio dalla massa cellulare interna e durante l'embriogenesi sono in grado di formare tre strati germinali chiamati

rispettivamente endoderma, mesoderma ed ectoderma ciascuno dei quali darà origine a determinate cellule e tessuti prima nel feto e poi nell'organismo adulto<sup>123</sup>. A seguito della loro differenziazione, le cellule staminali embrionali riducono la loro potenza diventando multipotenti con capacità di differenziazione limitata a determinate linee cellulari. Le cellule staminali emopoietiche sono il tipico esempio di cellule multipotenti in quanto sono in grado di differenziarsi in tutte le diverse tipologie di cellule del sangue. Successivamente alla loro specializzazione si trasformano in cellule oligopotenti che hanno un grado di potenza minore e dunque possono convertirsi in modo più limitato. A chiudere il cerchio sono le cellule staminali unipotenti, considerate idonee all'uso nella medicina rigenerativa in quanto capaci di dividersi ripetutamente creando, però, un solo tipo cellulare. La specializzazione delle cellule staminali dipende da segnali esterni, come il contatto tra cellule, e segnali interni governati a livello genico. Inoltre, fino a quando un organismo è vivo le cellule staminali possono rifornirlo illimitatamente per la propria riparazione anche se gli organi influenzano l'attività di queste cellule<sup>123</sup>.



**Figura 22** Associazione tra sviluppo dell'organismo umano e potenza delle cellule staminali<sup>123</sup>.

#### 4.2.2 Popolazioni di cellule staminali

Le cellule staminali vengono suddivise in tre gruppi: cellule staminali embrionali (*Embryonic Stem Cells*, ESCs), cellule staminali pluripotenti indotte (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs) e cellule staminali adulte<sup>124</sup>.

##### Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali sono pluripotenti e quindi in grado di differenziarsi nei tre strati germinali. Anche se la loro produzione avviene principalmente da ovociti fecondati *in vitro* e non *in vivo*, il loro utilizzo in clinica è limitato per motivi etici<sup>123,124</sup>.

### **Cellule staminali pluripotenti indotte**

Le cellule staminali pluripotenti indotte, create artificialmente in laboratorio a partire da cellule somatiche, sono anche chiamate cellule staminali etiche. La loro scoperta è avvenuta nel 2006 utilizzando cellule di topo e l'anno successivo è stata applicata a cellule umane<sup>123,124</sup>. Nello specifico, Takahashi e Yamanaka capirono che i fibroblasti embrionali e adulti di topo potevano subire una riprogrammazione ed essere convertiti in cellule con caratteristiche tipiche delle ESCs per mezzo della sovraespressione di una serie di fattori di trascrizione. Dunque, le cellule staminali pluripotenti indotte derivano da cellule adulte ma necessitano della coespressione di particolari fattori associati alla pluripotenza. Il risultato si traduce in cellule molto simili alle ESCs in quanto possono proliferare, autorinnovarsi e differenziarsi nei tre strati germinali<sup>125</sup>. Le iPSCs sono state inizialmente sfruttate per ovviare al problema etico derivante dalla necessità di impiegare embrioni umani per l'ottenimento delle cellule staminali embrionali. Tuttavia i costi elevati e i tempi lunghi di produzione rappresentano le principali sfide delle cellule staminali pluripotenti indotte il cui allestimento può provenire da fibroblasti cutanei, dal sangue cordonale o dal sangue periferico<sup>126,127</sup>. Il problema dell'immunogenicità subentra nel momento in cui vengono utilizzate le ESCs come fonte di cellule differenziate quando donatore e ricevente spesso non coincidono provocando così l'attivazione del sistema immunitario del paziente nel momento in cui le proteine dell'antigene leucocitario umano del donatore hanno un aplotipo diverso rispetto a quello del ricevente a causa della non corrispondenza dei loci genici A, B e DR<sup>125,127</sup>. Fortunatamente i farmaci immunosoppressori sono in grado di evitare il rigetto da trapianto. Inoltre, sono state individuate altre alternative tra cui il trasferimento nucleare di cellule somatiche, noto come clonazione terapeutica, che permette di utilizzare le ESCs del paziente stesso e consente la creazione di banche di donatori di cellule staminali embrionali che possiedono i diversi aplotipi delle proteine dell'antigene umano permettendo una corrispondenza tra donatore e ricevente<sup>125</sup>.

È fondamentale la differenziazione delle cellule staminali pluripotenti indotte appena ottenute, nei tipi cellulari di interesse in quanto se ciò non avviene, possono insorgere tumori a causa del potenziale di differenziazione e dell'elevata capacità proliferativa<sup>125</sup>. I fattori di riprogrammazione agiscono come fattori di cancellazione della memoria epigenetica e possono essere sfruttati per indurre la pluripotenza tramite approcci integrativi in cui le loro sequenze geniche vengono inserite nel genoma delle cellule di partenza, diversamente dai processi non integrativi che evitano modifiche genetiche permanenti con il vantaggio di ridurre possibili mutazioni. Da sottolineare che i metodi precedentemente descritti possono sfruttare vettori virali o non virali. Clinicamente parlando, le iPSCs possono essere utilizzate in diversi campi come la ricerca di base, lo screening di farmaci, gli studi tossicologici, la modellazione di malattie e la terapia cellulare<sup>125,126</sup>.

### **Cellule staminali adulte**

L'ultima tipologia cellulare è rappresentata dalle cellule staminali adulte o somatiche il cui stato di multipotenza permette la crescita, la sostituzione e la guarigione delle cellule che quotidianamente vanno incontro a morte<sup>123,124</sup>. Sono un esempio le cellule staminali mesenchimali presenti in vari tessuti tra cui il

midollo osseo dove avviene la loro differenziazione in cellule adipose, ossee e cartilaginee<sup>123</sup>. Lo studio di queste cellule ha permesso di evidenziare la loro capacità di differenziarsi in diversi lignaggi cellulari, e il loro potenziale effetto antinfiammatorio e immunomodulatorio<sup>128</sup>. Le principali fonti di cellule staminali mesenchimali sono il midollo osseo, la frazione vascolare stromale del tessuto adiposo, la placenta e il tessuto del cordone ombelicale<sup>128</sup>.

Le cellule staminali emopoietiche sono cellule primitive multipotenti dalle quali si generano le diverse cellule del sangue come eritrociti, leucociti e piastrine oltre alle cellule della linea mieloide e linfoide<sup>123,129</sup>. Sono presenti in diversi organi come il midollo osseo, il sangue periferico e il sangue del cordone ombelicale. Sfruttano la caratteristica di autorinnovamento e differenziazione per raggiungere la maturazione passando attraverso le cellule progenitrici intermedie<sup>129</sup>. Altri esempi di cellule staminali adulte sono le cellule neuronali che producono le cellule nervose e strutture di supporto (oligodendrociti e astrociti), le cellule staminali muscolari e le cellule staminali cutanee<sup>123,124</sup>.

Rispetto alle cellule staminali embrionali, il tempo di proliferazione delle cellule staminali adulte è maggiore; tuttavia, è possibile riprogrammarle ritornando al loro stato di pluripotenza<sup>123</sup>. Esse compaiono durante lo sviluppo fetale e rimangono per tutta la vita, dunque sono cellule indifferenziate che normalmente si trovano in uno stato di quiescenza ma hanno il potenziale di proliferare e differenziarsi nelle varie cellule a seconda del tessuto nel quale si trovano<sup>130,131</sup>. Nello specifico, le cellule staminali adulte hanno caratteristiche di auto-rinnovamento nei tessuti e negli organi e sono in grado di produrre linee di cellule precursori dalle quali si ottiene una progenie di cellule differenziate. Per il processo di differenziazione, le cellule staminali somatiche si posizionano in nicchie, siti topografici e funzionali specifici del tessuto formati da cellule differenziate, che modulano le cellule staminali e le cellule progenitrici unipotenti<sup>132</sup>. Da un punto di vista terapeutico le cellule staminali adulte sono potenzialmente in grado di trattare l'invecchiamento e tutta una serie di malattie degenerative anche se errori nei meccanismi di regolazione possono indurre il cancro<sup>131</sup>.

Diversi studi clinici sono stati avviati per il trattamento di varie patologie ma pochi di essi si sono tradotti in terapie approvate. In particolare, l'utilizzo di cellule staminali della pelle ha avuto successo nella rigenerazione cutanea a seguito di ustioni mentre il trapianto il midollo osseo, che sfrutta le cellule staminali emopoietiche, è emerso come trattamento di tumori ematologici. Gli Stati Uniti hanno approvato una terapia a base di cellule progenitrici ematopoietiche dal sangue del cordone ombelicale mentre l'Europa ha approvato Holoclar® un prodotto di terapia cellulare a base di cellule staminali dell'occhio per curare i danni della cornea<sup>131</sup>. *Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T cell therapy* è una terapia cellulare innovativa in cui le cellule T del sistema immunitario del paziente sono ingegnerizzate *ex vivo* in modo da riconoscere specifici antigeni. In seguito alla reinfusione nel paziente, prendono di mira solo gli antigeni tumorali selezionati. Nel 2019, l'AIFA ha conferito lo status di innovazione per le prime due terapie cellulari CAR-T, tisagenlecleucel e axicabtagene ciloleucel indirizzate all'antigene CD19 dei linfociti B, includendole nei formulari regionali e finanziate con il fondo nazionale per i farmaci innovativi oncologici. Tuttavia, solo alcuni centri ospedalieri delle Regioni sono autorizzati al trattamento in ottemperanza dei severi criteri di

selezione indicati dall'AIFA. Dal 2022 queste terapie sono coperte dai budget e formulari sanitari regionali determinando ulteriori sfide e limitazioni nel loro utilizzo a causa degli elevati costi<sup>133</sup>. In questo contesto, un recente studio ha valutato che per ogni singolo paziente *responder* il costo della terapia CAR-T a livello ospedaliero si aggira attorno a 378735,47 euro di cui 71220,84 euro sono destinati all'assistenza e alla gestione del paziente<sup>134</sup>.

### 4.3 Aspetti farmacologici nella terapia cellulare cardiaca

Le cellule staminali sono metabolicamente attive e possiedono una bassa energia cinetica che accresce con gli stimoli chimici percepiti in seguito alla somministrazione. Dimensioni, massa, solubilità, dosaggio e biodistribuzione sono le caratteristiche che consentono di contraddistinguere i farmaci dai prodotti di terapia cellulare. Questi ultimi possono essere utilizzati come farmaci diretti mentre i pro-bioprodotti necessitano di un processo di bioattivazione che permette la differenziazione delle cellule staminali in cardiomiociti la cui attività viene sostenuta da cellule accessorie. I bioprodotti possono anche fungere da agenti di rilascio di metaboliti, permettendo così la liberazione di fattori paracrini, e da agenti di rilascio indiretti. In linea generale, la creazione di un bioprodotto ha inizio con la raccolta delle cellule dal tessuto di origine a cui segue la caratterizzazione e la coltivazione. Sia prima che dopo l'espansione può essere svolto uno screening genetico ed epigenetico per escludere danni al DNA cellulare e alterazioni dell'espressione genetica mentre i test microbiologici mirano all'esclusione di contaminazioni endogene ed esogene. Il prodotto ottenuto viene sottoposto a procedure di conservazione, crioconservazione e congelamento limitanti la vitalità cellulare che nella fase di pre-iniezione dovrebbe aggirarsi attorno al 95%<sup>135</sup>.

Nella terapia cellulare, la farmacocinetica consiste nella determinazione della dose iniziale, della via di somministrazione, della biodisponibilità e della clearance cellulare. Questi parametri corrispondono all'ADME della farmacologia classica<sup>136</sup>. Per quanto concerne le vie di somministrazione, ne esistono diverse che possono essere sfruttate per l'iniezione del bioprodotto e che, assieme alla tipologia cellulare e agli ambienti incontrati, influenzano la biodistribuzione. La capacità di attecchimento cellulare dipende molto dal processo infiammatorio alla base della patologia perché da un lato stimola la proliferazione cellulare grazie al sistema del complemento mentre dall'altro si può creare un ambiente ostile alla sopravvivenza cellulare. Inoltre, le evidenze dimostrano che anche la pressione esercitata dalla contrazione miocardica può limitare il numero di cellule trattenute suggerendo così che il ridotto flusso sanguigno e la limitata attività del cuore siano fattori che limitano l'impianto cellulare<sup>135</sup>. Tra tutte, la via di somministrazione endovenosa periferica è sicuramente la più semplice e sicura ma l'efficacia di rilascio è minore dell'1% a causa dell'effetto metabolico promosso da fegato, milza e polmoni. Così le cellule subiscono numerosi passaggi prima di raggiungere l'area infartuata e una volta arrivate nel sito di interesse l'interazione è comunque limitata. Tutto ciò provoca un esaurimento dell'efficacia delle cellule staminali dopo un periodo di tempo che varia dai 3 ai 6 mesi. La somministrazione intracoronarica può essere utilizzata come alternativa nei pazienti affetti da occlusione dell'arteria coronaria; essa sfrutta un catetere a palloncino con

filo che permette la migrazione transendoteliale delle cellule raggiungendo con più facilità la regione infartuata e promuovendo un'interazione più duratura senza compromettere la sicurezza. L'iniezione intramiocardica, diversamente dalle altre vie di somministrazione, permette il posizionamento diretto nel compartimento miocardico per mezzo dell'iniezione transendocardica, transvenosa coronarica retrograda o transepicaardica. La clearance delle cellule staminali somministrate per via intramiocardica si basa su un modello cinetico di tre fasi. La prima di queste consiste nella rapida riduzione della clearance in maniera proporzionale al numero di cellule iniettate a cui segue una seconda fase caratterizzata da un ulteriore abbassamento, in questo caso però graduale, dovuto a fattori microambientali come apoptosi, ROS e ischemia. L'ultima fase evidenzia, invece, un lieve aumento del parametro farmacocinetico provocato dalla proliferazione cellulare<sup>135</sup>.

La farmacodinamica della terapia cellulare richiede la determinazione di biomarcatori ed endpoint correlati al meccanismo d'azione del bioprodotto perché attraverso queste conoscenze è possibile ottimizzare alcuni parametri, tra cui la gestione degli effetti collaterali. In questo contesto, recenti studi hanno considerato l'utilizzo di vescicole extracellulari derivate da cellule staminali mesenchimali; tra queste, esosomi e microvescicole sono in grado di condizionare le risposte dei tessuti danneggiati. È stato dimostrato che le vescicole extracellulari sono in grado di stimolare la proliferazione delle cellule sopravvissute attraverso un trasferimento orizzontale di mRNA. Le cellule staminali mesenchimali, attraverso microRNA, sono in grado di ridurre i danni promossi dall'ischemia/riperfusion e, dunque, gli esosomi ad esse correlate sono in grado di sopprimere l'attivazione dei recettori Toll-Like<sup>136</sup>.

#### **4.4 Sviluppi della terapia cellulare nelle patologie cardiache**

Attualmente notevoli progressi hanno migliorato gli interventi farmacologici nei pazienti affetti da patologie cardiovascolari ma il recupero completo dell'attività miocardica rimane ancora un obiettivo da realizzare; per questa ragione si sono sfruttate le caratteristiche delle cellule staminali per creare un trattamento volto alla rigenerazione miocardica e non alla sola gestione della malattia. Si è stimato che la terapia cellulare potrebbe diminuire il tasso di mortalità per malattie cardiache dell'80%; dunque, alla luce di queste stime si sono intrapresi diversi studi preclinici e clinici<sup>137</sup>.

Le cellule progenitrici cardiache endogene sono in grado di sostituire i cardiomiociti non più funzionali. In particolare, è stata dimostrata la possibilità di estrarre e far proliferare queste cellule dal tessuto cardiaco e successivamente unirle creando aggregati sferici noti come cardiosfere<sup>138</sup>. In altri termini, le cellule delle cardiosfere (*Cardiosphere-Derived Cells*, CDCs) sono cluster multicellulari che derivano dalla clonazione della popolazione di cellule progenitrici cardiache nonché miscela eterogenea di cellule staminali che si possono ritrovare in campioni biotipici atriali o ventricolari<sup>139</sup>. Le cellule derivate da cardiosfere sono in grado di agire nel miocardio differenziandosi e secernendo citochine ad effetto pro-angiogenico consentendo un miglioramento del miocardio infartuato<sup>138</sup>. Il meccanismo d'azione suggerisce la

combinazione di due eventi, la proliferazione dei cardiomiociti nativi e il reclutamento di cellule progenitrici endogene governate da segnali paracrini<sup>140</sup>.

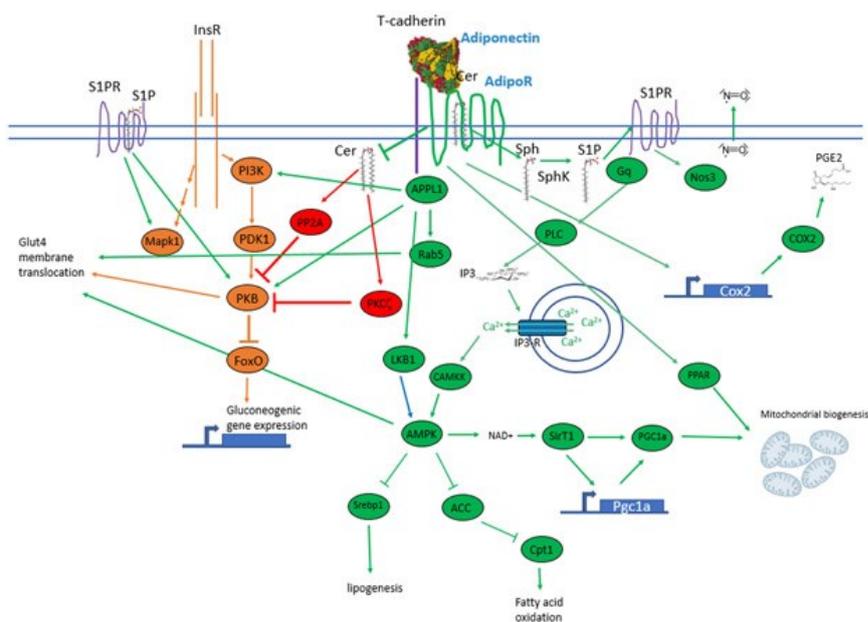
È stato condotto un interessante studio che ha verificato la loro efficacia nell'insufficienza cardiaca con frazione di eiezione conservata (*Heart Failure with preserved Ejection Fraction*, HFpEF)<sup>141</sup>. La decisione di effettuare questo studio deriva dalla volontà di verificare la nuova ipotesi di patogenesi dell'HFpEF secondo la quale esiste, alla base, un importante stato infiammatorio provocato da una serie di comorbidità tra cui obesità, diabete, broncopneumopatia cronica ostruttiva e ipertensione sale-sensibile. Si manifesta così un'inflammazione dell'endotelio vascolare coronarico in cui i cardiomiociti contigui subiscono un decremento nella biodisponibilità di ossido nitrico (NO) e nell'attività della protein chinasi G (PKG). Quest'ultima induce ipertrofia che, accompagnata alla rigidità delle cellule del miocardio, provoca la perdita di elasticità durante la diastole e di conseguenza l'insorgenza dell'insufficienza cardiaca<sup>142</sup>.

Lo svolgimento di un trial clinico di fase II multicentrico, randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo ha consentito di convalidare l'efficacia e la sicurezza delle CDCs nel trattamento dei pazienti maschi affetti dalla distrofia muscolare di Duchenne. La somministrazione di quattro infusioni endovenose sequenziali in pazienti di età pari o superiore a 10 anni con una compromissione degli arti inferiori moderata, ha permesso di migliorare l'end-point primario nonché il valore di PUL 1.2 (*Performance of Upper Limb*) del gomito inerente il deterioramento funzionale dell'arto superiore entro i 12 mesi<sup>143</sup>.

*Gallet et al.* hanno impiegato modelli di ratto con ipertensione sale-indotta evidenziando che la somministrazione intracoronarica di CDCs per quattro settimane limitava le conseguenze della dieta ricca di sale come l'ipertrofia ventricolare, ma non l'ipertensione. Inoltre, le CDCs hanno modificato la regolazione genica coinvolta nei processi dell'inflammazione e della fibrosi contribuenti alla HFpEF<sup>144</sup>.

In un altro studio *in vivo* ratti maschi sensibili al sale sono stati suddivisi in due gruppi, al primo è stata assegnata una dieta a basso tenore di sale (0,3% NaCl), mentre al secondo una dieta ricca di sale (8% NaCl)<sup>141</sup>. Dopo 14 settimane, in modo randomizzato, i ratti dei due gruppi sono stati trattati con placebo oppure con CDCs allogeniche somministrate per via intracoronarica. Dopo due settimane dall'inizio dei trattamenti è stato dimostrato che nei ratti alimentati con una dieta ricca di sale si è sviluppata l'insufficienza cardiaca con frazione di eiezione conservata in associazione a disfunzione diastolica. A livello del sistema immunitario si è confermata un'inflammazione sistemica sostenuta da leucocitosi, linfopenia, granulocitosi e monocitosi. Si è osservato che la somministrazione di CDCs portava a riduzione di granulociti ma non di monociti permettendo comunque il miglioramento della funzione diastolica e della fibrosi<sup>141</sup>. Inoltre, i ratti ricevuti CDCs hanno migliorato la vasodilatazione endoteliale normalmente compromessa in quanto lo stato infiammatorio pregiudica l'espressione di eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*). Nel complesso questo studio ha convalidato la nuova ipotesi di patogenesi dell'insufficienza cardiaca con frazione di eiezione conservata e verificato un effetto antinfiammatorio legato alla riduzione della disfunzione endoteliale<sup>141</sup>.

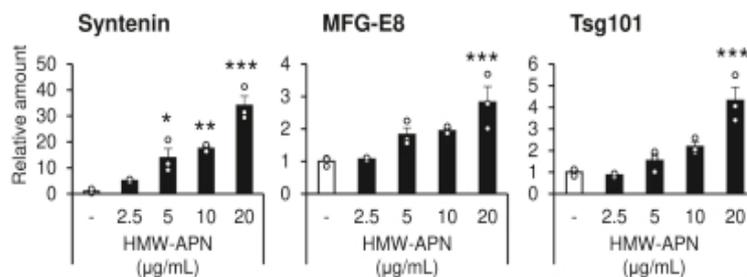
Altri autori hanno studiato l'impiego della terapia cellulare nell'insufficienza cardiaca. *Nakamura Y et al.* hanno utilizzato ratti affetti da patologia cardiaca indotta per sovraccarico pressorio ai quali sono state somministrate cellule staminali mesenchimali valutandone l'efficacia in base ai livelli di adiponectina ed esosomi<sup>145</sup>. Quest'ultimo ormone derivato dai grassi, funge da messaggero nella comunicazione tra i vari organi e il tessuto adiposo<sup>146</sup>. L'adiponectina, prodotta dagli epatociti, esplica effetti pleiotropici in diversi organi tra cui fegato, rene, vasi sanguigni, cellule  $\beta$ -pancreatiche ed è rimossa dagli epatociti. I suoi effetti antinfiammatori, antifibrotici e insulino-sensibilizzanti non sono da sottovalutare. Inoltre, l'azione antiapoptotica è tra le più importanti e viene esplicita soprattutto a livello dei cardiomiociti<sup>146</sup>. L'associazione tra bassi livelli plasmatici di adiponectina e l'insorgenza di varie patologie tra cui quelle cardiovascolari ha confermato l'effetto protettivo di questo ormone<sup>147</sup>. La **Figura 23** rappresenta la classica via di segnalazione intracellulare avviata dall'interazione dell'adiponectina con il suo recettore AdipoR con conseguente regolazione della lipogenesi, dell'ossidazione degli acidi grassi e della biogenesi mitocondriale. La riduzione nell'espressione dell'insulina è testimoniata dall'inattivazione della serina/treonina proteina fosfatasi 2A (*Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A*, PP2A) mentre gli effetti antinfiammatori derivano dalla regolazione della COX2<sup>148</sup>.



**Figura 23** Cascata di segnalazione intracellulare generata dall'interazione di adiponectina con il recettore AdipoR<sup>148</sup>.

Il legame dell'adiponectina al suo recettore può essere potenziato dalla T-caderina, una molecola multifunzionale che media effetti vasali e di rigenerazione tissutale oltre che fungere da co-recettore dell'adiponectina<sup>148,149</sup>. Gli esosomi, invece, sono piccole vescicole delimitate da un doppio strato lipidico che mediano la comunicazione cellula-cellula attraverso il trasferimento di nucleotidi codificanti e non, proteine, lipidi etc. nei fluidi biologici in condizioni fisiopatologiche; inoltre, rappresentano una via alternativa a quella lisosomiale. Vengono prodotti nella via endocitica durante la maturazione dell'endosoma in corpi multivescicolari per gemmazione interna della membrana limitante<sup>150</sup>.

È noto che le cellule staminali mesenchimali sono cellule staminali adulte che producono esosomi e sulla loro superficie presentano la T-caderina che, legandosi all'adiponectina ad alto peso molecolare (*high-molecular-weight adiponectin*, HMW-APN), permette a quest'ultima di stimolare la biogenesi di esosomi. Gli autori dello studio hanno prima evidenziato l'espressione di T-caderina da parte delle hMSCs (*human adipose tissue-derived Mesenchymal Stem Cells*, hMSCs) oltre all'aumento di esosomi prodotti delle cellule staminali mesenchimali del tessuto adiposo confermato dall'incremento dei comuni marcatori di esosomi nonché sintetina, MFG-E8 e Tsg101(Figura 24)<sup>145</sup>.



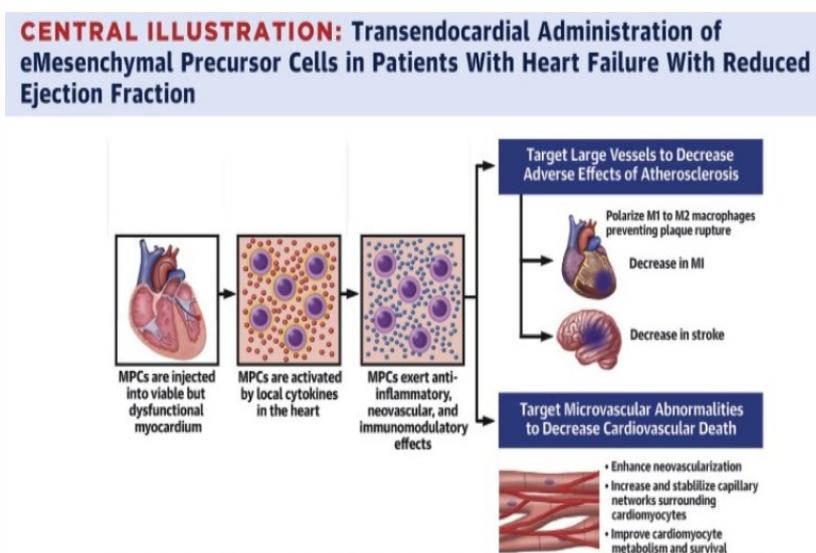
**Figura 24** Espressione di marcatori degli esosomi in relazione alla presenza di adiponectina<sup>145</sup>.

La somministrazione endovenosa bisettimanale di hMSCs in topi con insufficienza cardiaca da sovraccarico di pressione ha migliorato la funzione cardiaca e la frazione di eiezione, inoltre sono stati ridotti i marcatori dello scompenso cardiaco e i segni dell'ipertrofia ventricolare sinistra. L'effetto dell'adiponectina a livello plasmatico è stato studiato somministrando a topi wild type (WT) e a topi knockout per l'adiponectina, hMSCs infettate con adenovirus esprimenti i marcatori degli esosomi gLuc ed MFG-E8. Si è così evidenziato che l'area sottesa alla curva (AUC) di gLuc era maggiore dopo la somministrazione di hMSCs nei topi WT rispetto ai topi knockout. Lo studio suggerisce quindi che l'adiponectina promuove la produzione di esosomi sostenendo così l'azione cardioprotettiva guidata dalle hMSCs. Il pioglitazone, noto farmaco agonista ai PPAR $\gamma$ , agisce indirettamente sugli effetti cardioprotettivi delle hMSCs in quanto aumenta l'adiponectina circolante<sup>145</sup>. Lo studio ha inoltre confermato l'importanza nell'espressione di T-caderina per la produzione di esosomi e la funzione cardioprotettiva delle hMSCs<sup>145</sup>.

I risultati promettenti degli studi condotti in modelli animali ha recentemente permesso l'avvio di alcuni trials clinici.

DREAM-HF è uno studio clinico di fase III randomizzato, multicentrico, in doppio cieco e controllato con placebo che ha valutato la sicurezza e l'efficacia della somministrazione transendocardica di cellule precursori mesenchimali allogene prelevate dal midollo osseo di tre volontari sani, in 565 pazienti affetti da insufficienza cardiaca con frazione di eiezione ridotta (frazione di eiezione ventricolare sinistra  $\leq 40\%$  o  $\leq 35\%$ ). Sono stati arruolati pazienti di età compresa tra i 18 e gli 80 anni di età con almeno un ricovero per insufficienza cardiaca massimo 9 mesi prima dello studio o con una visita specialistica urgente che ha richiesto una terapia farmacologica o pazienti con fibrillazione atriale aventi livelli del peptide NT-proBNP  $>1.200$  pg/ml. Sono stati considerati come endpoint primari l'arco temporale richiesto per l'ospedalizzazione a causa di eventi non fatali e l'assistenza per aritmie ventricolari sintomatiche o per

insufficienza cardiaca con scompenso mentre il tempo di morte per tutte le cause e i componenti dell'endpoint primario sono stati considerati endpoint secondari. Prima della somministrazione transendocardica e a 12 mesi dall'intervento, sono state effettuate delle ecografie che hanno dimostrato come le cellule precursori mesenchimali hanno aumentato la frazione di eiezione ventricolare sinistra principalmente nei pazienti con infiammazione (**Figura 25**). Inoltre, si è evidenziata una riduzione del rischio di ictus o di infarto del 58% e di altri eventi cardiovascolari avversi. Anche se gli endpoint primari e secondari non hanno dato risultati significativi, il trial ha identificato nuove ipotesi sul meccanismo d'azione delle cellule precursori mesenchimali nell'insufficienza cardiaca con ridotta frazione di eiezione suggerendo la possibilità di migliorare gli esiti soprattutto nei casi in cui vi sia una importante componente infiammatoria<sup>151</sup>.



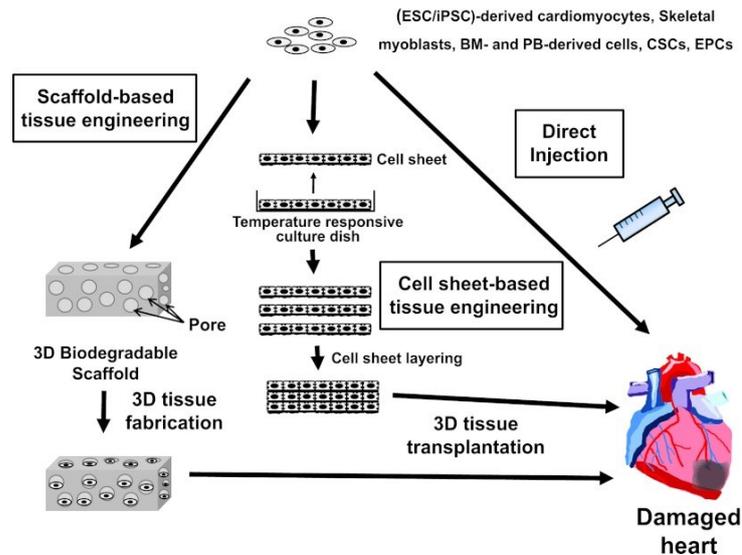
**Figura 25** Effetti della somministrazione transendocardica di cellule precursori mesenchimali<sup>151</sup>.

In un altro studio, le cellule staminali embrionali sono state protagoniste di un trial clinico che ha voluto sfruttare la loro elevata capacità di differenziazione per verificare la possibilità di produrre cellule progenitrici cardiovascolari in pazienti con disfunzione ischemica ventricolare sinistra. Sono stati arruolati 6 pazienti (età mediana pari a 66,5 anni) a cui sono state somministrate per via epicardica cellule staminali embrionali durante l'intervento di bypass coronarico. Gli endpoint primari hanno considerato la possibilità di insorgenza di neoplasie a livello cardiaco, la comparsa di aritmie e l'alloimmunizzazione comprovata dalla presenza di anticorpi del donatore. L'alloimmunizzazione si è sviluppata in tre pazienti mentre i restanti effetti indesiderati non si sono riscontrati. Nello studio si è anche verificata la morte di un paziente per insufficienza cardiaca. Inoltre, si è documentato che la creazione di cellule progenitrici cardiovascolari è in grado di migliorare la contrazione sistolica mantenendo una sicurezza a breve e medio termine<sup>152</sup>.

## 4.5 L'ingegneria tissutale

La terapia rigenerativa basata su cellule è stata riconosciuta come metodo potenzialmente efficace nel trattamento delle patologie cardiovascolari; può essere applicata sottoforma di iniezione diretta di cellule oppure sottoforma di ingegneria tissutale (**Figura 26**)<sup>153</sup>. Quest'ultima si è affermata a partire dagli ottanta del novecento, trova impiego soprattutto negli organi cavi e sfrutta come base principi di trapianto cellulare, di scienza dei materiali e di ingegneria per creare dei sostituti biologici in grado di ripristinare e conservare la normale funzione tissutale<sup>154,155</sup>. L'ingegneria tissutale si esplica per mezzo di scaffold oppure per mezzo di fogli cellulari. Nel primo caso le cellule di interesse sono sparse in scaffold tridimensionali di origine artificiale o provenienti dalla rimozione tissutale di componenti cellulari mediante manipolazioni meccaniche e chimiche; inoltre gli scaffold essendo biodegradabili rimpiazzano inizialmente la matrice extracellulare ma poi distruggendosi durante l'impianto, vengono sostituiti da nuova matrice extracellulare secreta dalle cellule in crescita<sup>153,155</sup>. Nel secondo caso, invece, vengono utilizzati degli aggregati cellulari che uniti e delimitati da una matrice extracellulare generano dei veri e propri fogli che possono essere stratificati ottenendo tessuti tridimensionali densi di cellule. Per la loro fabbricazione ci si avvale di una superficie di coltura in cui le cellule aderiscono tra loro per mezzo di proteine di adesione. Quest'ultime vengono digerite dall'enzima tripsina provocando così il distacco di un vero e proprio foglio cellulare avente proprietà di adesione, facilità di maneggiamento e di trapianto. Ad oggi esistono varie tecnologie che permettono l'ottenimento di fogli cellulari tra cui i metodi che sfruttano polimeri sensibili alla temperatura che controllano l'adesione e il distacco del foglio cellulare in base alla variazione di calore<sup>154</sup>.

L'origine delle cellule utilizzate nell'ingegneria tissutale può essere eterologa, allogena o autologa. Quest'ultima è ovviamente la più ambita in quanto le cellule vengono prelevate dal paziente e, in seguito alla dissociazione ed espansione in coltura, vengono impiantate nello stesso paziente evitando così l'utilizzo di farmaci immunosoppressori oltre al rigetto da trapianto anche se non è esclusa la possibilità di insorgenza di una risposta infiammatoria. Le cellule, indipendentemente che siano differenziate o staminali, vengono inserite in scaffold che è lasciato maturare *in vitro* all'interno di un bioreattore per un breve periodo di tempo prima di procedere all'impianto<sup>155</sup>.



**Figura 26** Metodi di applicazione della terapia rigenerativa basata su cellule<sup>153</sup>.

#### 4.5.1 Biomateriali e il loro impiego nelle CVD

L'ingegneria tissutale si avvale di biomateriali che ricreano la stessa funzione biologica e meccanica della matrice extracellulare generando così una struttura tridimensionale adatta a ospitare le cellule, a permetterne il loro rilascio e il loro sviluppo nei siti bersaglio della rigenerazione tissutale. Nello sviluppo avanzato, le vie metaboliche dell'organismo eliminano i prodotti di degradazione con una velocità tale da mantenere una concentrazione adeguata di metaboliti. Idealmente i materiali scelti dovrebbero essere biodegradabili e biorisorbibili cosicché possa avvenire la sostituzione del tessuto priva di risposta infiammatoria, di rigetto o di necrosi. Altra caratteristica importante è la biocompatibilità rappresentata da materiali di origine naturale come collagene e alginato, matrici di tessuto acellulare come la sottomucosa vescicale/intestinale e polimeri sintetici come l'acido poliglicolico, l'acido polilattico e l'acido poli(lattico-co-glicolico)<sup>155</sup>.

Diversi studi sperimentali preclinici e clinici hanno dimostrato il promettente impiego dell'ingegneria tissutale nelle malattie cardiache.

*Piao et al.* hanno valutato l'efficacia terapeutica di uno scaffold polimerico di poli-glicole-co-caprolattone nell'insufficienza cardiaca a stadio avanzato come conseguenza dell'infarto acuto del miocardio. Nello specifico, si è allestito uno scaffold polimerico in cui sono state seminate cellule staminali originarie del midollo osseo. Successivamente, il costrutto è stato impiantato nell'epicardio di un modello di ratto affetto da infarto del miocardio. Si è osservato che lo scaffold con le cellule derivate del midollo osseo, rispetto al controllo (scaffold senza le cellule staminali), ha permesso la migrazione delle cellule staminali dopo una settimana dall'impianto, la loro differenziazione in cardiomiociti e l'aumento della neovascolarizzazione all'interno e al confine dell'area infartuata nelle quattro settimane successive. La riduzione della dilatazione e della successiva disfunzione ventricolare sinistra ha fornito i risultati positivi sperati<sup>156</sup>.

La sottomucosa dell'intestino tenue è stata sfruttata come base per l'inserzione di cellule staminali mesenchimali nel miocardio infartuato indotto in un modello di coniglio. *Tang et al.* hanno coltivato le cellule nella sottomucosa intestinale per 5/7 giorni e, successivamente, l'innesto cardiaco è stato impiantato nell'epicardio del cuore infartuato. A quattro settimane dall'intervento una serie di parametri tra cui la migrazione cellulare, la differenziazione in cardiomiociti, i cambiamenti patologici del miocardio, la dimensione ventricolare sinistra, la densità di microvasi e la funzione contrattile sono stati verificati con esami strumentali che hanno dimostrato un cambiamento favorevole nel gruppo di controllo (conigli a cui è stata impiantata la sottomucosa dell'intestino tenue senza le cellule staminali mesenchimali) ma soprattutto nei conigli in cui la sottomucosa intestinale è stata seminata con cellule staminali mesenchimali suggerendo il loro potenziale impiego nella rigenerazione miocardica<sup>157</sup>. Altri autori hanno condotto uno studio preclinico che ha individuato il potenziale impiego di uno scaffold creato a partire da una struttura pericardica decellularizzata contenente idrogel peptidico e vescicole extracellulari derivate dalle cellule staminali mesenchimali del tessuto adiposo cardiaco suino in maiali con danno ischemico come risultato del miocardio infartuato. A quattro settimane dall'intervento il gruppo trattato ha evidenziato un miglioramento della frazione di eiezione ventricolare destra (+20,8%) e un minor rimodellamento cardiaco rispetto al gruppo controllo. Inoltre, la densità vascolare è raddoppiata, la fibrosi è diminuita e si è evidenziato anche un effetto antinfiammatorio<sup>158</sup>.

Di recente, un trial clinico ha valutato la fattibilità e la sicurezza dell'impianto, nelle cicatrici ventricolari causate dall'ischemia post-infarto, di uno scaffold di collagene contenente cellule staminali del midollo osseo di origine autologa. I 15 pazienti trattati non hanno manifestato eventi avversi e non sono andati incontro a morte. Secondo i risultati raccolti, lo scaffold con le cellule staminali è stato in grado di aumentare lo spessore cicatriziale (da  $6\pm 1,4$  a  $9\pm 1,5$ mm;  $p = 0,005$ ) con tessuto vitale riducendo il rimodellamento ventricolare. Inoltre, il volume telediastolico ventricolare sinistro è passato da  $142\pm 24$  a  $117\pm 21$  ml ( $p = 0,03$ ) e la frazione di eiezione è aumentata da  $25\pm 7\%$  a  $33\pm 5\%$  ( $p = 0,04$ ). I risultati ottenuti sostengono la potenzialità dell'ingegneria tissutale<sup>159</sup>. Sicuramente altri studi, in molti più pazienti, dovranno essere condotti per un'ulteriore indagine sugli utilizzi di questo tipo di interventi e sulla loro efficacia terapeutica.

## 5. Conclusioni

Le patologie cardiovascolari rappresentano un insieme di malattie tanto variegato quanto complesso e la designazione di principale causa di morte al mondo incentiva l'applicazione dei farmaci biologici in questo ambito.

La ricerca in letteratura ha documentato nei confronti degli anticorpi monoclonali una relativa diffusa applicazione, soprattutto in ambito ospedaliero. Attualmente gli inibitori di PCSK9, quali, evolocumab e alirocumab, rappresentano gli unici anticorpi monoclonali approvati negli USA e in Europa quando il trattamento con statine e/o ezetimibe è inefficace nella cura delle iperlipoproteinemie<sup>53,55</sup>.

La scoperta di BMP1.3 (*Bone Morphogenetic Protein 1.3*), isoforma di BMP1 nonché C-proteasi procollagene che riveste il ruolo di assemblaggio del collagene nella matrice extracellulare durante il processo cicatriziale, ha stimolato la conduzione di uno studio preclinico che ha evidenziato come l'anticorpo monoclonale murino anti-BMP1.3 svolga un'azione antifibrotica e di regolazione del processo cicatriziale; effetti che si traducono nel mantenimento dell'attività cardiaca dopo un evento ischemico<sup>44,45</sup>. Nei topi la somministrazione endovenosa di dosi ripetute dell'anticorpo monoclonale anti-BMP1.3 ha determinato una minor quantità di collagene, di fibrosi e un aumento dei principali parametri di funzione cardiaca. Questo effetto è dovuto alla diminuzione dei livelli di TGF- $\beta$  e del suo gene bersaglio *Lox* responsabile della reticolazione del collagene nella cicatrice. Inoltre, indipendentemente dalla riduzione della fibrosi, lo studio ha evidenziato un effetto protettivo indotto dal trattamento anti-BMP1.3 nei confronti dei cardiomiociti<sup>45</sup>. Ovviamente questi risultati meritano ulteriori approfondimenti per un utilizzo in ambito clinico.

L'inflammasoma NLRP3 (*Nod-Like Receptor Protein 3*) è un mediatore proinfiammatorio coinvolto nelle patologie cardiovascolari e, in particolar modo, nell'aterosclerosi<sup>58,60</sup>. A seguito dell'interazione con le oxLDL, NLRP3 si attiva rilasciando citochine proinfiammatorie che influenzano la formazione, lo sviluppo e la rottura della placca aterosclerotica<sup>62</sup>. In questo contesto, è stato condotto un trial clinico di fase III relativo alla somministrazione dell'anticorpo monoclonale canakinumab, avente come target IL-1 $\beta$ , in pazienti aterosclerotici. Anche se canakinumab non ha raggiunto la significatività statistica riguardo la mortalità per tutte le cause, si è evidenziata una riduzione della proteina C-reattiva e degli eventi cardiovascolari<sup>63,64</sup>.

La terapia genica nelle patologie cardiovascolari consta un numero esiguo di farmaci in commercio. In particolare, Collatogene® è stato approvato in Giappone nel 2019 con approvazione condizionata e limitata nel tempo per il trattamento delle ulcere in pazienti affetti da arteriopatia periferica<sup>98</sup>. Inclisiran, invece, è un siRNA coniugato con GaINAc e inibitore di PCSK9 approvato dall'EMA nel 2020 per la cura dell'ipercolesterolemia primaria o dislipidemia mista<sup>99,100</sup>. Di recente, in modelli animali e nei pazienti affetti da insufficienza cardiaca si è osservato un'espressione alterata di piccole sequenze non codificanti di RNA (miRNA) ipotizzando l'allestimento di prodotti genici mirati al trattamento di varie patologie cardiovascolari, incluso il danno da ischemia-riperfusion e dove miRNA-1 e mi-RNA-21 sono coinvolti<sup>108-</sup>

<sup>110</sup>. Uno studio preclinico ha dimostrato che la riperfusione successiva all'infarto determina una diminuzione nell'espressione di miRNA-1 a livello miocardico e un aumento a livello sistemico<sup>110</sup>. Inoltre esiste una correlazione tra gli alterati livelli di miRNA-1 a livello cardiaco e aumento dei cardiomiociti apoptotici. In altri termini, la sovraespressione di miRNA-1 è associata all'aumento dell'apoptosi, mentre la soppressione ha un effetto di protezione dai danni causati dall'ischemia e successiva riperfusione<sup>111</sup>.

Apelina e Elabela/Toddler sono ligandi del recettore APJ<sup>114</sup>. Uno studio preclinico ha dimostrato che nei topi esprimenti un prodotto di terapia genica codificante per Elabela/Toddler-32 (isoforma di Elabela) aumentano i fattori endoteliali VEGF/VEGFR2 e la via Jagged/Notch3 consentendo la differenziazione e lo sviluppo cellulare con un complessivo miglioramento cardiovascolare documentato dall'azione proangiogenica, antifibrotica e antiapoptotica<sup>117</sup>.

Sebbene gli sviluppi clinici riguardanti la terapia cellulare siano ancora circoscritti, alcune evidenze gettano solide basi per una futura applicazione. In particolare, studi preclinici hanno sottolineato il potenziale delle cellule derivate da cardiosfere (*Cardiosphere-Derived Cells*, CDCs). Questi cluster multicellulari ottenuti dalla clonazione di cellule progenitrici cardiache sono in grado di secernere citochine con effetti proangiogenici in tessuti o organi adulti<sup>138,139</sup>. È stato dimostrato che la somministrazione intracoronarica di CDCs migliora la fibrosi cardiaca e modifica la regolazione genica alla base dell'infiammazione causata dall'insufficienza cardiaca con frazione di eiezione conservata<sup>144</sup>. L'effetto antinfiammatorio delle CDCs è stato confermato da un'altra sperimentazione *in vivo* in cui la somministrazione di CDCs ha migliorato la vasodilatazione endoteliale precedentemente compromessa. Lo studio ha inoltre evidenziato la riduzione dei granulociti, il miglioramento della funzione diastolica e della fibrosi<sup>141</sup>.

La valutazione dell'impiego di cellule staminali mesenchimali nell'insufficienza cardiaca ha suggerito il loro effetto cardioprotettivo veicolato dall'ormone adiponectina che, legato alla T-caderina delle cellule staminali mesenchimali, potenzia la produzione di esosomi con conseguente miglioramento della funzione cardiaca, della frazione di eiezione, dell'ipertrofia ventricolare e la riduzione dei marcatori dello scompenso cardiaco<sup>145</sup>. Agli studi preclinici sono seguiti anche trial clinici. Tra questi, è stata valutata la fattibilità della somministrazione transendocardica di precursori mesenchimali allogenic in 565 pazienti affetti da insufficienza cardiaca con frazione di eiezione ridotta (frazione di eiezione ventricolare sinistra  $\leq 40\%$  o  $\leq 35\%$ ). A 12 mesi dall'intervento è stata documentata una riduzione del rischio di ictus o di infarto del 58%, inoltre le cellule precursori mesenchimali hanno aumentato la frazione di eiezione ventricolare sinistra soprattutto nei pazienti con infiammazione tissutale<sup>151</sup>.

Le evidenze scientifiche attualmente disponibili costituiscono il fulcro di una futura applicazione degli anticorpi monoclonali, così come della terapia genica e cellulare nelle patologie cardiovascolari; tuttavia, lo sviluppo delle terapie avanzate, così come sono state definite dall'EMA e dall'AIFA, è ancora in una fase germinale e necessitano di molte altre indagini per arrivare a un loro uso più esteso.

## 6. Bibliografia

1. Cardiovascular diseases. <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>.
2. Olvera Lopez, E., Ballard, B. D. & Jan, A. Cardiovascular Disease. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
3. Khera, A. V. & Kathiresan, S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet* **18**, 331–344 (2017).
4. Khaku, A. S. & Tadi, P. Cerebrovascular Disease. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
5. Henderson, J., Pollack, A., Harrison, C. & Miller, G. Peripheral arterial disease. *Aust Fam Physician* **42**, 363 (2013).
6. Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
7. Timmis, A. *et al.* European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *European Heart Journal* **43**, 716–799 (2022).
8. Frančula-Zaninović, S. & Nola, I. A. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease’ Risk Factors. *Curr Cardiol Rev* **14**, 153–163 (2018).
9. Fuchs, F. D. & Whelton, P. K. HIGH BLOOD PRESSURE AND CARDIOVASCULAR DISEASE. *Hypertension* **75**, 285–292 (2020).
10. Jung, E., Kong, S. Y., Ro, Y. S., Ryu, H. H. & Shin, S. D. Serum Cholesterol Levels and Risk of Cardiovascular Death: A Systematic Review and a Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Int J Environ Res Public Health* **19**, 8272 (2022).
11. Khalil, H. & Zeltser, R. Antihypertensive Medications. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
12. Wright, J. M., Musini, V. M. & Gill, R. First-line drugs for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* **2018**, CD001841 (2018).
13. Michaeli, D. T., Michaeli, J. C., Albers, S., Boch, T. & Michaeli, T. Established and Emerging Lipid-Lowering Drugs for Primary and Secondary Cardiovascular Prevention. *Am J Cardiovasc Drugs* **23**, 477–495 (2023).
14. Biologicals. <https://www.who.int/health-topics/biologicals>.
15. Biological medicinal products. <https://aifa.gov.it/farmaci-biologici>.
16. What Are ‘Biologics’ Questions and Answers | FDA. <https://www.fda.gov/about-fda/center-biologics-evaluation-and-research-cber/what-are-biologics-questions-and-answers>.
17. Advanced therapies. <https://aifa.gov.it/terapie-avanzate>.
18. Gonçalves, E. Advanced therapy medicinal products: value judgement and ethical evaluation in health technology assessment. *Eur J Health Econ* **21**, 311–320 (2020).

19. Ciucci, G., Colliva, A., Vuerich, R., Pompilio, G. & Zacchigna, S. Biologics and cardiac disease: challenges and opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences* **43**, 894–905 (2022).
20. Castelli, M. S., McGonigle, P. & Hornby, P. J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacology Res & Perspec* **7**, e00535 (2019).
21. Nur, A. *et al.* Antibody Phage Display. in *Phage Display: Methods and Protocols* (eds. Hust, M. & Lim, T. S.) 3–12 (Springer US, New York, NY, 2023). doi:10.1007/978-1-0716-3381-6\_1.
22. Waldmann, H. Human Monoclonal Antibodies: The Benefits of Humanization. in *Human Monoclonal Antibodies* (ed. Steinitz, M.) vol. 1904 1–10 (Springer New York, New York, NY, 2019).
23. Mitra, S. & Tomar, P. C. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J Genet Eng Biotechnol* **19**, 159 (2021).
24. Kim, H.-Y., Stojadinovic, A. & Izadjoo, M. J. Immunization, Hybridoma Generation, and Selection for Monoclonal Antibody Production. in *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (eds. Ossipow, V. & Fischer, N.) 33–45 (Humana Press, Totowa, NJ, 2014). doi:10.1007/978-1-62703-992-5\_3.
25. Marrocco, I., Romaniello, D. & Yarden, Y. Cancer Immunotherapy: The Dawn of Antibody Cocktails. in *Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (ed. Steinitz, M.) 11–51 (Springer, New York, NY, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-8958-4\_2.
26. Alfaleh, M. A. *et al.* Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. *Front Immunol* **11**, 1986 (2020).
27. Nagano, K. & Tsutsumi, Y. Phage Display Technology as a Powerful Platform for Antibody Drug Discovery. *Viruses* **13**, 178 (2021).
28. Patkowski, J. B. *et al.* The F-pilus biomechanical adaptability accelerates conjugative dissemination of antimicrobial resistance and biofilm formation. *Nat Commun* **14**, 1879 (2023).
29. Chen, G. & Sidhu, S. S. Design and Generation of Synthetic Antibody Libraries for Phage Display. in *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (eds. Ossipow, V. & Fischer, N.) 113–131 (Humana Press, Totowa, NJ, 2014). doi:10.1007/978-1-62703-992-5\_8.
30. McGuire, M. J., Li, S. & Brown, K. C. Biopanning of Phage Displayed Peptide Libraries for the Isolation of Cell-Specific Ligands. in *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols: Electrochemical and Mechanical Detectors, Lateral Flow and Ligands for Biosensors* (eds. Rasooly, A. & Herold, K. E.) 291–321 (Humana Press, Totowa, NJ, 2009). doi:10.1007/978-1-60327-569-9\_18.
31. Bazan, J., Calkosiński, I. & Gamian, A. Phage display—A powerful technique for immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* **8**, 1817–1828 (2012).
32. Kaplon, H., Chenoweth, A., Crescioli, S. & Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2022. *MAbs* **14**, 2014296.

33. Small-molecule inhibitors, immune checkpoint inhibitors, and more: FDA-approved novel therapeutic drugs for solid tumors from 1991 to 2021 | Journal of Hematology & Oncology | Full Text. <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01362-9>.
34. Pisetsky, D. S. Pathogenesis of autoimmune disease. *Nat Rev Nephrol* **19**, 509–524 (2023).
35. A BRIEF SYNOPSIS OF MONOCLONAL ANTIBODY FOR THE TREATMENT OF VARIOUS GROUPS OF DISEASES - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8775886/>.
36. Product & Delivery Research. [https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/product-and-delivery-research/monoclonal-antibodies-\(mabs\)-for-infectious-diseases](https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/product-and-delivery-research/monoclonal-antibodies-(mabs)-for-infectious-diseases).
37. Wang, X.-Y., Wang, B. & Wen, Y.-M. From therapeutic antibodies to immune complex vaccines. *npj Vaccines* **4**, 1–8 (2019).
38. Minatoguchi, S. Myocardial Infarction and Development of Heart Failure. in *Cardioprotection Against Acute Myocardial Infarction* (ed. Minatoguchi, S.) 1–3 (Springer, Singapore, 2019). doi:10.1007/978-981-15-0167-8\_1.
39. Scalise, R. F. M. *et al.* Fibrosis after Myocardial Infarction: An Overview on Cellular Processes, Molecular Pathways, Clinical Evaluation and Prognostic Value. *Med Sci (Basel)* **9**, 16 (2021).
40. Ma, Z.-G., Yuan, Y.-P., Wu, H.-M., Zhang, X. & Tang, Q.-Z. Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis. *Int J Biol Sci* **14**, 1645–1657 (2018).
41. Yousefi, F. *et al.* TGF- $\beta$  and WNT signaling pathways in cardiac fibrosis: non-coding RNAs come into focus. *Cell Communication and Signaling* **18**, 87 (2020).
42. Bujak, M. & Frangogiannis, N. G. The role of TGF- $\beta$  signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovascular Research* **74**, 184–195 (2007).
43. Guo, X. & Wang, X.-F. Signaling cross-talk between TGF- $\beta$ /BMP and other pathways. *Cell Res* **19**, 71–88 (2009).
44. Katagiri, T. & Watabe, T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a021899 (2016).
45. Vukicevic, S. *et al.* Bone morphogenetic protein 1.3 inhibition decreases scar formation and supports cardiomyocyte survival after myocardial infarction. *Nat Commun* **13**, 81 (2022).
46. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233–241 (2000).
47. Chan, Y.-H. & Ramji, D. P. Atherosclerosis: Pathogenesis Pathogenesis and Key Cellular Processes Cellular processes, Current and Emerging Therapies Therapies, Key Challenges, and Future Research Directions. in *Atherosclerosis: Methods and Protocols* (ed. Ramji, D.) 3–19 (Springer US, New York, NY, 2022). doi:10.1007/978-1-0716-1924-7\_1.
48. Ji, E. & Lee, S. Antibody-Based Therapeutics for Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci* **22**, 5770 (2021).
49. Barale, C., Melchionda, E., Morotti, A. & Russo, I. PCSK9 Biology and Its Role in Atherothrombosis. *Int J Mol Sci* **22**, 5880 (2021).

50. Zhao, Z. *et al.* Molecular Characterization of Loss-of-Function Mutations in PCSK9 and Identification of a Compound Heterozygote. *Am J Hum Genet* **79**, 514–523 (2006).
51. Punch, E., Klein, J., Diaba-Nuhoho, P., Morawietz, H. & Garelnabi, M. Effects of PCSK9 Targeting: Alleviating Oxidation, Inflammation, and Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* **11**, e023328 (2022).
52. Yurtseven, E., Ural, D., Baysal, K. & Tokgözoğlu, L. An Update on the Role of PCSK9 in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* **27**, 909–918 (2020).
53. Nissen, S. E. *et al.* Comparison of PCSK9 Inhibitor Evolocumab vs Ezetimibe in Statin-Intolerant Patients: Design of the Goal Achievement After Utilizing an Anti-PCSK9 Antibody in Statin-Intolerant Subjects 3 (GAUSS-3) Trial. *Clin Cardiol* **39**, 137–144 (2016).
54. Sabatine, M. S. *et al.* Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* **376**, 1713–1722 (2017).
55. Räber, L. *et al.* Effect of Alirocumab Added to High-Intensity Statin Therapy on Coronary Atherosclerosis in Patients With Acute Myocardial Infarction. *JAMA* **327**, 1771–1781 (2022).
56. Genentech, Inc. *A Multicenter, Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Phase II Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Activity of Intravenous MLDL1278A in Patients on Standard-of-Care Therapy for Stable Atherosclerotic Cardiovascular Disease (GLACIER - Goal of Oxidized Ldl and Activated Macrophage Inhibition by Exposure to a Recombinant Antibody)*. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01258907> (2016).
57. Engelen, S. E., Robinson, A. J. B., Zurke, Y.-X. & Monaco, C. Therapeutic strategies targeting inflammation and immunity in atherosclerosis: how to proceed? *Nat Rev Cardiol* **19**, 522–542 (2022).
58. Tong, Y. *et al.* NLRP3 Inflammasome and Its Central Role in the Cardiovascular Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2020**, 4293206 (2020).
59. Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P.-Y. Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nat Med* **21**, 677–687 (2015).
60. Toldo, S. *et al.* Targeting the NLRP3 Inflammasome in Cardiovascular Diseases. *Pharmacol Ther* **236**, 108053 (2022).
61. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
62. Abbate, A. *et al.* Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res* **126**, 1260–1280 (2020).
63. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* **377**, 1119–1131 (2017).
64. Novartis Pharmaceuticals. *A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Event-Driven Trial of Quarterly Subcutaneous Canakinumab in the Prevention of Recurrent Cardiovascular Events Among Stable Post-Myocardial Infarction Patients With Elevated hsCRP*. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01327846> (2020).

65. Advanced therapy medicinal products: Overview | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/advanced-therapy-medicinal-products-overview>.
66. What is Gene Therapy? | FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>.
67. Wirth, T., Parker, N. & Ylä-Herttuala, S. History of gene therapy. *Gene* **525**, 162–169 (2013).
68. TAMURA1, R. & TODA, M. Historic Overview of Genetic Engineering Technologies for Human Gene Therapy. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **60**, 483–491 (2020).
69. Razi Soofiyani, S., Baradaran, B., Lotfipour, F., Kazemi, T. & Mohammadnejad, L. Gene Therapy, Early Promises, Subsequent Problems, and Recent Breakthroughs. *Adv Pharm Bull* **3**, 249–255 (2013).
70. Hanna, E., Rémuzat, C., Auquier, P. & Toumi, M. Gene therapies development: slow progress and promising prospect. *J Mark Access Health Policy* **5**, 1265293 (2017).
71. Gravitz, L. Gene Therapy Is Coming of Age. *Nature* (2021) doi:10.1038/d41586-021-02739-5.
72. Landhuis, E. The Definition of Gene Therapy Has Changed. *Nature* (2021) doi:10.1038/d41586-021-02736-8.
73. Bulaklak, K. & Gersbach, C. A. The once and future gene therapy. *Nat Commun* **11**, 5820 (2020).
74. Benskey, M. J. *et al.* Basic Concepts in Viral Vector-Mediated Gene Therapy. in *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols* (eds. Manfredsson, F. P. & Benskey, M. J.) 3–26 (Springer, New York, NY, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-9065-8\_1.
75. Warnock, J. N., Daigre, C. & Al-Rubeai, M. Introduction to Viral Vectors. in *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols* (eds. Merten, O.-W. & Al-Rubeai, M.) 1–25 (Humana Press, Totowa, NJ, 2011). doi:10.1007/978-1-61779-095-9\_1.
76. Li, X. *et al.* Viral Vector-Based Gene Therapy. *Int J Mol Sci* **24**, 7736 (2023).
77. Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L. & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**, 317–334 (2017).
78. Mendell, J. R. *et al.* Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Mol Ther* **29**, 464–488 (2021).
79. Construction and application of adenoviral vectors: Molecular Therapy - Nucleic Acids. [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/nucleic-acids/fulltext/S2162-2531\(23\)00241-X](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/nucleic-acids/fulltext/S2162-2531(23)00241-X).
80. Serman, D. H. *et al.* A PILOT AND FEASIBILITY CLINICAL TRIAL EVALUATING IMMUNOGENE THERAPY OF MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA (MPM) USING INTRAPLEURAL DELIVERY OF ADENOVIRUS- INTERFERON-ALPHA (Ad.hIFN- $\alpha$ 2b) IN COMBINATION WITH HIGH-DOSE CELECOXIB AND SYSTEMIC CHEMOTHERAPY. *Clin Cancer Res* **22**, 3791–3800 (2016).

81. Lu, M. *et al.* Adaptive Seamless Design for An Efficacy Trial of Replication-Competent Adenovirus-mediated Suicide Gene Therapy and Radiation in Newly-diagnosed Prostate Cancer (ReCAP Trial). *Contemp Clin Trials* **32**, 453–460 (2011).
82. Hu, P.-F. *et al.* Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PAI-1 mRNA ameliorates hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* **51**, 102–113 (2009).
83. Perry, C. & Rayat, A. C. M. E. Lentiviral Vector Bioprocessing. *Viruses* **13**, 268 (2021).
84. Kuroda, S. *et al.* Protocol Optimization for the Production of the Non-Cytotoxic J $\Delta$ NI5 HSV Vector Deficient in Expression of Immediately Early Genes. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **17**, 612–621 (2020).
85. de Silva, S. & Bowers, W. J. Herpes Virus Amplicon Vectors. *Viruses* **1**, 594–624 (2009).
86. FDA Approves First Topical Gene Therapy for Treatment of Wounds in Patients with Dystrophic Epidermolysis Bullosa | FDA. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-topical-gene-therapy-treatment-wounds-patients-dystrophic-epidermolysis-bullosa>.
87. Gurevich, I. *et al.* In vivo topical gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa: a phase 1 and 2 trial. *Nat Med* **28**, 780–788 (2022).
88. Fumoto, S. *et al.* Targeted Gene Delivery: Importance of Administration Routes. in *Novel Gene Therapy Approaches* (IntechOpen, 2013). doi:10.5772/54741.
89. Shao, G., Greathouse, K., Huang, Q., Wang, C.-M. & Sferra, T. J. Gene Transfer to the Gastrointestinal Tract After Peroral Administration of Recombinant Adeno-associated Virus Type 2 Vectors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **43**, 168 (2006).
90. Farris, E. *et al.* Oral Non-Viral Gene Delivery for Applications in DNA Vaccination and Gene Therapy. *Curr Opin Biomed Eng* **7**, 51–57 (2018).
91. Ball, R. L., Bajaj, P. & Whitehead, K. A. Oral delivery of siRNA lipid nanoparticles: Fate in the GI tract. *Sci Rep* **8**, 2178 (2018).
92. Shibata, S. B., Yoshimura, H., Ranum, P. T., Goodwin, A. T. & Smith, R. J. H. Intravenous rAAV2/9 injection for murine cochlear gene delivery. *Sci Rep* **7**, 9609 (2017).
93. Gregory, J. V. *et al.* Systemic brain tumor delivery of synthetic protein nanoparticles for glioblastoma therapy. *Nat Commun* **11**, 5687 (2020).
94. Foley, C. P. *et al.* Intra-arterial delivery of AAV vectors to the mouse brain after mannitol mediated blood brain barrier disruption. *Journal of Controlled Release* **196**, 71–78 (2014).
95. Ylä-Herttuala, S. & Baker, A. H. Cardiovascular Gene Therapy: Past, Present, and Future. *Mol Ther* **25**, 1095–1106 (2017).
96. Shimamura, M., Nakagami, H., Sanada, F. & Morishita, R. Progress of Gene Therapy in Cardiovascular Disease. *Hypertension* **76**, 1038–1044 (2020).
97. Gu, Y. *et al.* A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Study of Hepatocyte Growth Factor in the Treatment of Critical Limb Ischemia. *Mol Ther* **27**, 2158–2165 (2019).

98. Ylä-Herttuala, S. Gene Therapy of Critical Limb Ischemia Enters Clinical Use. *Mol Ther* **27**, 2053 (2019).
99. Chan, D. C. & Watts, G. F. The Promise of PCSK9 and Lipoprotein(a) as Targets for Gene Silencing Therapies. *Clinical Therapeutics* **45**, 1034–1046 (2023).
100. Lamb, Y. N. Inclisiran: First Approval. *Drugs* **81**, 389–395 (2021).
101. Kurmani, S. & Squire, I. Acute Heart Failure: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Heart Fail Rep* **14**, 385–392 (2017).
102. Bozkurt, B. *et al.* Heart Failure Epidemiology and Outcomes Statistics: A Report of the Heart Failure Society of America. *Journal of Cardiac Failure* **29**, 1412–1451 (2023).
103. Gwathmey, J. K., Yerevanian, A. & Hajjar, R. J. Cardiac Gene Therapy with SERCA2a: From Bench to Bedside. *J Mol Cell Cardiol* **50**, 803–812 (2011).
104. Lyon, A. R. *et al.* Investigation of the safety and feasibility of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with chronic heart failure supported with a left ventricular assist device – the SERCA-LVAD TRIAL. *Gene Ther* **27**, 579–590 (2020).
105. Byrne, M. J. *et al.* Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther* **15**, 1550–1557 (2008).
106. JASKI, B. E. *et al.* Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase 1/2 Clinical Trial. *J Card Fail* **15**, 171–181 (2009).
107. Greenberg, B. *et al.* Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet* **387**, 1178–1186 (2016).
108. O’Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 402 (2018).
109. Fayeze, S. S. *et al.* Role of Different Types of miRNAs in Some Cardiovascular Diseases and Therapy-Based miRNA Strategies: A Mini Review. *Biomed Res Int* **2022**, 2738119 (2022).
110. Jayawardena, E., Medzikovic, L., Ruffenach, G. & Eghbali, M. Role of miRNA-1 and miRNA-21 in Acute Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Their Potential as Therapeutic Strategy. *Int J Mol Sci* **23**, 1512 (2022).
111. Zhu, W. S. *et al.* Hsp90aa1: a novel target gene of miR-1 in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Sci Rep* **6**, 24498 (2016).
112. Wang, Z.-H. *et al.* miRNA-21 Expression in the Serum of Elderly Patients with Acute Myocardial Infarction. *Med Sci Monit* **23**, 5728–5734 (2017).
113. Song, Y. *et al.* Localized injection of miRNA-21-enriched extracellular vesicles effectively restores cardiac function after myocardial infarction. *Theranostics* **9**, 2346–2360 (2019).
114. Yang, P., Maguire, J. J. & Davenport, A. P. Apelin, Elabela/Toddler, and biased agonists as novel therapeutic agents in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* **36**, 560–567 (2015).

115. Pauli, A. *et al.* Toddler: An Embryonic Signal That Promotes Cell Movement via Apelin Receptors. *Science* **343**, 1248636 (2014).
116. Song, J., Tang, J., Zhang, Z., Liu, Y. & Zhong, J. Targeting the elabela/apelin-apelin receptor axis as a novel therapeutic approach for hypertension. *Chin Med J (Engl)* **135**, 1019–1026 (2022).
117. Jin, L., Pan, Y., Li, Q., Li, J. & Wang, Z. Elabela gene therapy promotes angiogenesis after myocardial infarction. *J Cell Mol Med* **25**, 8537–8545 (2021).
118. Lisini, D., Frigerio, S., Nava, S. & Pogliani, S. Stem Cell Production: Processes, Practices, and Regulation. in *Stem Cell Production: Processes, Practices and Regulations* (ed. Khan, F. A.) 125–158 (Springer, Singapore, 2022). doi:10.1007/978-981-16-7589-8\_6.
119. El-Kadiry, A. E.-H., Rafei, M. & Shammaa, R. Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. *Front Med (Lausanne)* **8**, 756029 (2021).
120. Hoang, D. M. *et al.* Stem cell-based therapy for human diseases. *Sig Transduct Target Ther* **7**, 1–41 (2022).
121. Sharma, S. K. History of Stem Cell Transplantation. in *Basics of Hematopoietic Stem Cell Transplant* (ed. Sharma, S. K.) 3–7 (Springer Nature, Singapore, 2023). doi:10.1007/978-981-19-5802-1\_1.
122. Kolios, G. & Moodley, Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* **85**, 3–10 (2013).
123. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. & Rybak, Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* **10**, 68 (2019).
124. Jovic, D. *et al.* A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Rev Rep* **18**, 1525–1545 (2022).
125. Moradi, S. *et al.* Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Research & Therapy* **10**, 341 (2019).
126. Aboul-Soud, M. A. M., Alzahrani, A. J. & Mahmoud, A. Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)—Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening. *Cells* **10**, 2319 (2021).
127. Ohnuki, M. & Takahashi, K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**, 20140367 (2015).
128. Pittenger, M. F. *et al.* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regen Med* **4**, 1–15 (2019).
129. Lee, J. Y. & Hong, S.-H. Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *Int J Stem Cells* **13**, 1–12 (2019).
130. Mens, M. M. J. & Ghanbari, M. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Rev* **14**, 309–322 (2018).
131. Cable, J. *et al.* Adult stem cells and regenerative medicine—a symposium report. *Ann N Y Acad Sci* **1462**, 27–36 (2020).
132. Tweedell, K. S. The Adaptability of Somatic Stem Cells: A Review. *J Stem Cells Regen Med* **13**, 3–13 (2017).

133. Jommi, C., Bramanti, S., Pani, M., Ghirardini, A. & Santoro, A. CAR T-Cell Therapies in Italy: Patient Access Barriers and Recommendations for Health System Solutions. *Front Pharmacol* **13**, 915342 (2022).
134. Foglia, E. *et al.* Multidimensional Results and Reflections on CAR-T: The Italian Evidence. *Int J Environ Res Public Health* **20**, 3830 (2023).
135. Jadczyk, T., Faulkner, A. & Madeddu, P. Stem cell therapy for cardiovascular disease: the demise of alchemy and rise of pharmacology. *Br J Pharmacol* **169**, 247–268 (2013).
136. Aijaz, A., Vaninov, N., Allen, A., Barcia, R. N. & Parekkadan, B. Convergence of Cell Pharmacology and Drug Delivery. *Stem Cells Transl Med* **8**, 874–879 (2019).
137. Mahmud, S. *et al.* Opportunities and challenges in stem cell therapy in cardiovascular diseases: Position standing in 2022. *Saudi Pharm J* **30**, 1360–1371 (2022).
138. Davis, D. R. *et al.* Validation of the Cardiosphere Method to Culture Cardiac Progenitor Cells from Myocardial Tissue. *PLoS One* **4**, e7195 (2009).
139. Le, T. Y. L. & Chong, J. J. H. Cardiac progenitor cells for heart repair. *Cell Death Discovery* **2**, 1–4 (2016).
140. Ashur, C. & Frishman, W. H. Cardiosphere-Derived Cells and Ischemic Heart Failure. *Cardiol Rev* **26**, 8–21 (2018).
141. de Couto, G. *et al.* Cell therapy attenuates endothelial dysfunction in hypertensive rats with heart failure and preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **323**, H892–H903 (2022).
142. Paulus, W. J. & Tschöpe, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* **62**, 263–271 (2013).
143. McDonald, C. M. *et al.* Repeated intravenous cardiosphere-derived cell therapy in late-stage Duchenne muscular dystrophy (HOPE-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* **399**, 1049–1058 (2022).
144. Gallet, R. *et al.* Cardiosphere-Derived Cells Reverse Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in Rats by Decreasing Fibrosis and Inflammation. *JACC Basic Transl Sci* **1**, 14–28 (2016).
145. Nakamura, Y. *et al.* Adiponectin Stimulates Exosome Release to Enhance Mesenchymal Stem-Cell-Driven Therapy of Heart Failure in Mice. *Mol Ther* **28**, 2203–2219 (2020).
146. Wang, Z. V. & Scherer, P. E. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol* **8**, 93–100 (2016).
147. Shklyae, S. S. *et al.* Adiponectin: a pleiotropic hormone with multifaceted roles. *Probl Endokrinol (Mosk)* **67**, 98–112 (2021).
148. Straub, L. G. & Scherer, P. E. Metabolic Messengers: Adiponectin. *Nat Metab* **1**, 334–339 (2019).
149. Rubina, K. A. *et al.* Revisiting the multiple roles of T-cadherin in health and disease. *Eur J Cell Biol* **100**, 151183 (2021).
150. Kita, S., Maeda, N. & Shimomura, I. Interorgan communication by exosomes, adipose tissue, and adiponectin in metabolic syndrome. *J Clin Invest* **129**, 4041–4049.

151. Perin, E. C. *et al.* Randomized Trial of Targeted Transendocardial Mesenchymal Precursor Cell Therapy in Patients With Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* **81**, 849–863 (2023).
152. Menasché, P. *et al.* Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **71**, 429–438 (2018).
153. Haraguchi, Y., Shimizu, T., Yamato, M. & Okano, T. Concise Review: Cell Therapy and Tissue Engineering for Cardiovascular Disease. *Stem Cells Transl Med* **1**, 136–141 (2012).
154. Imashiro, C. & Shimizu, T. Fundamental Technologies and Recent Advances of Cell-Sheet-Based Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* **22**, 425 (2021).
155. Olson, J. L., Atala, A. & Yoo, J. J. Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. *Chonnam Med J* **47**, 1–13 (2011).
156. Piao, H. *et al.* Effects of cardiac patches engineered with bone marrow-derived mononuclear cells and PGCL scaffolds in a rat myocardial infarction model. *Biomaterials* **28**, 641–649 (2007).
157. Tan, M. Y. *et al.* Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits. *Biomaterials* **30**, 3234–3240 (2009).
158. Monguió-Tortajada, M. *et al.* Acellular cardiac scaffolds enriched with MSC-derived extracellular vesicles limit ventricular remodelling and exert local and systemic immunomodulation in a myocardial infarction porcine model. *Theranostics* **12**, 4656–4670 (2022).
159. Chachques, J. C. *et al.* Myocardial assistance by grafting a new bioartificial upgraded myocardium (MAGNUM clinical trial): one year follow-up. *Cell Transplant* **16**, 927–934 (2007).