

# Nuove frontiere della farmacologia: cellule, anticorpi, recettori “esca”, RNA e ATMP

**Elena Cattaneo, Chiara Zuccato**

## Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire la capacità di riconoscere e classificare i farmaci biologici e i medicinali per le terapie avanzate (ATMP)
- ▶ Comprendere le nozioni di base relative alle diverse tipologie di cellule staminali, la loro idoneità per scopi di trapianto nella medicina rigenerativa e le attuali applicazioni terapeutiche
- ▶ Apprezzare la rilevanza degli anticorpi monoclonali in qualità di farmaci e i loro campi di utilizzo
- ▶ Comprendere la funzione dei recettori “esca” e il loro impiego nelle malattie infiammatorie croniche
- ▶ Conoscere i farmaci a RNA, il relativo meccanismo di funzionamento e le applicazioni terapeutiche

I progressi scientifici nel campo dell'ingegneria genetica e della biologia cellulare e tissutale hanno permesso lo sviluppo di nuovi prodotti medicali a base biologica, che offrono opportunità di trattamento fino a pochi anni fa inattese. L'obiettivo di questo capitolo è quello di fornire una panoramica generale di questa nuova frontiera della farmacologia moderna. Si darà, inoltre, ampio spazio ai medicinali per terapie avanzate (ATMP), ivi incluse la terapia genica e quella cellulare, e ai prodotti di ingegneria tissutale.

## Cellule staminali e medicina rigenerativa

Con il termine “medicina rigenerativa” ci si riferisce a quella branca della medicina il cui obiettivo è il recupero permanente di tessuti e organi danneggiati mediante la sostituzione delle cellule degenerate con cellule nuove. Queste terapie a base di cellule possono essere di tipo autologo, quando il paziente riceve cellule isolate dal proprio corpo e re-impiantate, o di tipo allogenico, quando il paziente riceve le cellule da un donatore.

Tre sono le categorie di cellule staminali impiegate nella terapia cellulare. Una prima categoria di cellule staminali sono le cellule staminali multipotenti o somatiche, localizzate nei tessuti differenziati sia fetali sia adulti, capaci di dare origine esclusivamente a cellule differenziate dei tessuti in cui risiedono. Una seconda categoria di staminali è rappresentata dalle

cellule staminali embrionali (ES) che vengono isolate dalle blastocisti umane sovrannumerarie. La terza categoria, di più recente identificazione, comprende le staminali pluripotenti indotte (iPS), ottenute mediante riprogrammazione allo stadio embrionale delle cellule somatiche, come per esempio i fibroblasti della pelle. Entrambe queste categorie di staminali (embrionali o indotte) sono classificate come “pluripotenti”, perché in grado di generare i derivati cellulari specializzati dei tre foglietti germinativi e, quindi, potenzialmente, tutti i 250 tipi di cellule specializzate dei nostri tessuti. Per utilizzare le cellule staminali in medicina rigenerativa è necessario istruirle applicando protocolli di differenziamento che mirano a ricapitolare in vitro le fasi dello sviluppo in vivo. L'obiettivo dei ricercatori che utilizzano le staminali pluripotenti è ottenere dalle cellule immature proprio quei prodotti specializzati che rispondono agli obiettivi terapeutici prefissi. È per questo motivo che gli avanzamenti nel campo della medicina rigenerativa sono strettamente correlati ai progressi delle conoscenze sulla biologia delle cellule staminali e alla comprensione dei segnali che ne garantiscono lo sviluppo e la maturazione in vivo. Una volta nel tessuto danneggiato, in aggiunta al meccanismo di sostituzione cellulare, le cellule staminali possono rilasciare molecole che innescano meccanismi molecolari e cellulari che si traducono in un “effetto terapeutico” sul tessuto danneggiato. Un ulteriore approccio di medicina rigenerativa, meno perseguito, si basa sulla stimolazione farmacologica

delle cellule staminali residenti nei tessuti endogeni di interesse, quindi in vivo, al fine di stimolarne il potenziale riparativo.

In questa sezione tratteremo degli aspetti di terapia cellulare in medicina rigenerativa, tralasciando le strategie in vivo in quanto ancora difficili da immaginare a scopo terapeutico per la maggior parte delle malattie. Ci focalizzeremo più ampiamente sui prodotti medicali a base di staminali che vengono somministrati a pazienti con efficacia clinica a lungo termine. Questo è il caso dei trattamenti che utilizzano le staminali somatiche o multipotenti di pelle, cornea e le staminali ematopoietiche. Descriveremo anche casi in cui le staminali pluripotenti sembrano essere molto promettenti per il trattamento di malattie complesse, come la malattia di Parkinson o il diabete.

### **Approcci di terapia cellulare per il trattamento di malattie ematopoietiche**

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, autologhe o allogeniche, rappresenta una procedura salvavita comunemente utilizzata per contrastare neoplasie ematologiche e gravi disturbi genetici. Negli ultimi 20 anni, come trattamento efficace per disturbi monogenici al trapianto si è aggiunta la possibilità di ricorrere alla terapia genica *ex vivo* delle staminali ematopoietiche: per esempio, nel caso di immunodeficienze primarie, emoglobinopatie e disturbi metabolici con coinvolgimento neurologico. Tra i primi prodotti di terapia genica per uso clinico approvati occorre menzionarne uno, frutto del lavoro di Alessandro Aiuti e dei suoi colleghi all'Ospedale San Raffaele di Milano. Approvato nel 2016 nell'UE per trattare la sindrome da immunodeficienza combinata dovuta a deficit dell'enzima adenosina deaminasi (SCID-ADA). Si tratta di una frazione cellulare arricchita di cellule CD34+ autologhe (ovvero prelevate dal paziente stesso), che vengono espanse in coltura e modificate geneticamente con un vettore retrovirale contenente la sequenza del gene ADA umano, e poi reinfuse. Dal 2000, sono stati trattati a Milano con staminali ematopoietiche ingegnerizzate circa 30 pazienti con SCID-ADA, riuscendo a dimostrare il totale successo del trattamento nel contrastare la malattia. La terapia genica associata al trapianto di staminali ematopoietiche è stata utilizzata per il trattamento di altre gravi patologie ematopoietiche, tra cui SCID-X1, un'immunodeficienza combinata grave causata da mutazioni nel gene IL2R sul cromosoma X, e la leucodistrofia metacromatica (MLD), una malattia rara da accumulo lisosomiale causata dalla mutazione nel gene arisulfatasi A (ARSA), fondamentale per l'eliminazione dei solfati; quest'ultimo è stato il primo farmaco a base di terapia genica approvato dall'EMA, nel dicembre 2020, per il trattamento dei bambini affetti da MLD. Il farmaco, costituito da cellule staminali ematopoietiche trasdotte con un vettore

lentivirale portatore di una copia funzionante del gene ARSA, sfrutta le capacità delle cellule ematopoietiche di migrare nel sistema nervoso. Le cellule mieloidi trasdotte sono in grado di produrre quantità elevate dell'enzima ARSA, che viene poi utilizzato dai neuroni e dalle altre cellule residenti.

### **Approcci di medicina rigenerativa per il trattamento delle lesioni degli epiteli**

Uno degli ambiti di medicina rigenerativa con applicazioni cliniche è quello della riparazione degli epiteli squamosi, che includono l'epidermide e la cornea. I cheratinociti della pelle che formano gli olocloni, necessari per il rinnovamento epidermico a lungo termine, sono il veicolo d'elezione per il trattamento dell'epidermolisi bollosa, una malattia ereditaria causata dalla mutazione dei geni che producono il collagene o la laminina. Come conseguenza di questo difetto genico, la pelle è esposta a continue ulcerazioni che diventano oggetto di infezioni e di aumentato rischio di tumori. Michele De Luca e Graziella Pellegrini, dell'Università di Modena e Reggio Emilia, per primi hanno dimostrato che da un lembo di pelle del paziente è possibile ottenere cheratinociti che formano olocloni. Gli olocloni sono stati corretti geneticamente e utilizzati per la produzione di foglietti di nuova pelle autologa che, nel 2013, è stata trapiantata con successo per la prima volta in un paziente affetto da epidermolisi bollosa. Nel novembre 2017, la rivista *Nature* ha pubblicato la prova di un ulteriore risultato di rilievo raggiunto dagli scienziati di Modena: da un piccolo lembo di cute di 4 cm è stato ottenuto un numero sufficiente di staminali da generare circa 1 m<sup>2</sup> di pelle geneticamente corretta che, innestata in un bimbo con epidermolisi bollosa, ne ha permesso la completa guarigione.

Approcci simili vengono utilizzati per curare le lesioni della cornea. La cornea è un epitelio che si rinnova durante tutto l'arco della vita, esattamente come succede per la pelle. Ciò viene garantito dalle cellule staminali limbari presenti nello strato basale dell'epitelio del *limbus*, la zona di transizione tra cornea e congiuntiva bulbare. In caso di ustione o di lesione, la cornea scompare e l'epitelio congiuntivale prende il sopravvento, portando alla copertura del bulbo, con conseguente cecità. Gli studiosi hanno dimostrato che è possibile ricostruire l'epitelio corneale in vitro partendo dalle cellule staminali limbari, identificate sulla base della loro capacità di generare olocloni. La forza dei dati biologici e dell'efficacia terapeutica dei trapianti ha permesso rapidamente a questo prodotto di essere riconosciuto come farmaco a base di staminali, approvato in Europa nel 2014. Il farmaco consiste in un lembo di epitelio generato in vitro da staminali limbari che, dopo trapianto nel paziente, consente di ottenere una cornea trasparente e stabile nel tempo, con pieno recupero della funzione visiva.

### **Approcci di medicina rigenerativa nel campo del sistema nervoso centrale**

Nel campo delle malattie neurodegenerative particolare rilievo hanno gli studi condotti sulla malattia di Parkinson, considerata un modello favorevole per lo sviluppo di una terapia di medicina rigenerativa perché si sviluppa come conseguenza di un meccanismo noto, specifico e localizzato, cioè la degenerazione selettiva dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra*, che si può contrastare con il trapianto di nuovi neuroni dopaminergici. I primi studi di questo genere furono condotti trapiantando neuroni dopaminergici prelevati "freschi" dal tessuto mesencefalico fetale di embrioni murini direttamente nel modello murino di Parkinson. I risultati positivi ottenuti nell'animale portarono all'avvio della sperimentazione nell'uomo, ricorrendo al trapianto di neuroni dopaminergici ottenuti da tessuto fetale umano abortivo. Negli ultimi 40 anni sono stati trapiantati più di 200 pazienti ed è stata fornita la prova di concetto che il trapianto di neuroni dopaminergici è in grado di revertire la malattia a lungo termine. Per la scarsa disponibilità e la variabilità del tessuto fetale, negli anni successivi sono stati messi a punto protocolli per la generazione di neuroni dopaminergici da staminali embrionali umane che, dopo trapianto nei modelli murini di Parkinson, si sono dimostrati capaci di integrarsi e formare una vasta rete di connessioni nel cervello danneggiato. È recente l'apertura degli studi clinici MSK-DA01, STEM-PD e TED-A9, che mirano a valutare l'efficacia di questo nuovo prodotto cellulare nel paziente. Due studi pubblicati su *Nature* nell'aprile del 2025 confermano la sicurezza del trapianto e aprono a sperimentazioni cliniche più ampie.

### **Approcci di medicina rigenerativa nel campo del diabete, sclerosi multipla e distrofia muscolare**

Diversi gruppi lavorano sull'ottimizzazione dei protocolli per ottenere cellule  $\beta$ -pancreatiche da staminali pluripotenti umane, da posizionare in dispositivi compatibili e impiantabili sottocute in pazienti con diabete di tipo 1, in grado di rilasciare insulina e di controllare i livelli di glucosio.

Approcci con trapianto di staminali sono in sperimentazione anche per il trattamento della sclerosi multipla. La cellula staminale d'elezione in questo caso è la staminale neurale, il cui trapianto si è dimostrato vantaggioso in modelli di primati non umani, con miglioramento delle funzioni dopo iniezioni intratecali ed endovenose. Per valutare la fattibilità del trapianto di staminali neurali in pazienti con sclerosi multipla progressiva secondaria, sono stati quindi avviati due studi clinici (NCT03269071, NCT03282760). In entrambi i casi, a due anni dal trapianto non si sono registrati fenomeni avversi. A queste evidenze si sono aggiunte alcune indicazioni

relative a un beneficio circa i livelli di molecole neuroprotettive e antinfiammatorie.

Per il trattamento delle patologie degenerative del muscolo sono state analizzate diverse cellule staminali con attività miogenica, tra cui i mesangioblasti. Isolati dal topo nel 2003, sono cellule capaci di differenziare in diversi tipi cellulari del mesoderma, incluso il muscolo scheletrico. Il loro trapianto, per via endovenosa, in topi distrofici produce un recupero funzionale dei muscoli iniettati e un miglioramento clinico nel cane spontaneamente distrofico. Sulla base di queste evidenze precliniche sono in corso alcune sperimentazioni cliniche su un ristretto numero di pazienti distrofici.

### **Anticorpi monoclonali e immunoterapia**

Dal 1986, anno in cui la *Food and Drug Administration* (FDA) statunitense approvava il primo anticorpo monoclonale per uso clinico, il farmaco immunosoppressore muromonab-CD3 per i soggetti sottoposti a trapianto d'organo, sono stati disegnati, sperimentati e proposti come farmaci nel campo dei trapianti, delle patologie infiammatorie e dell'oncologia centinaia di anticorpi monoclonali.

### **Produzione e ingegnerizzazione**

Gli anticorpi monoclonali prodotti per scopi terapeutici sono generalmente immunoglobuline di tipo G con una tipica forma a Y contenenti due regioni (Fab), derivate dall'appaiamento delle regioni VL e VH responsabili del legame con l'antigene, e una porzione (Fc), responsabile delle funzioni effettrici dell'anticorpo. Tre sono i metodi più comunemente usati per la produzione degli anticorpi monoclonali. Il classico metodo dell'ibridoma, messo a punto da Köhler e Milstein, presenta come limite la senescenza cellulare e la conseguente produzione di anticorpi recanti mutazioni. In alternativa, è stata sviluppata la *single B cell technology* in cui, dopo isolamento dell'RNA da una singola cellula B di topo immunizzato, il DNA complementare dei domini VH e VL viene clonato in vettori di espressione per produrre gli anticorpi su larga scala. Il terzo metodo più comunemente usato è il *phage display*. Sviluppato nei primi anni '90 del secolo scorso, è una strategia che accoppia la tecnologia del DNA ricombinante alle proprietà genetiche del fago M13, per costruire vettori che contengono gli elementi essenziali del virus e il cDNA codificante i domini VH e VL fuso con il cDNA di una proteina del capsido del fago. Quando il vettore così assemblato è utilizzato per infettare i batteri, i fagi che ne risultano espongono sul loro capsido i domini VH e VL dell'anticorpo. Questa tecnica è diventata estremamente utile per conservare popolazioni di fagi (librerie) che esprimono gli anticorpi derivati, per

esempio, da un animale immunizzato o da pazienti immunizzati.

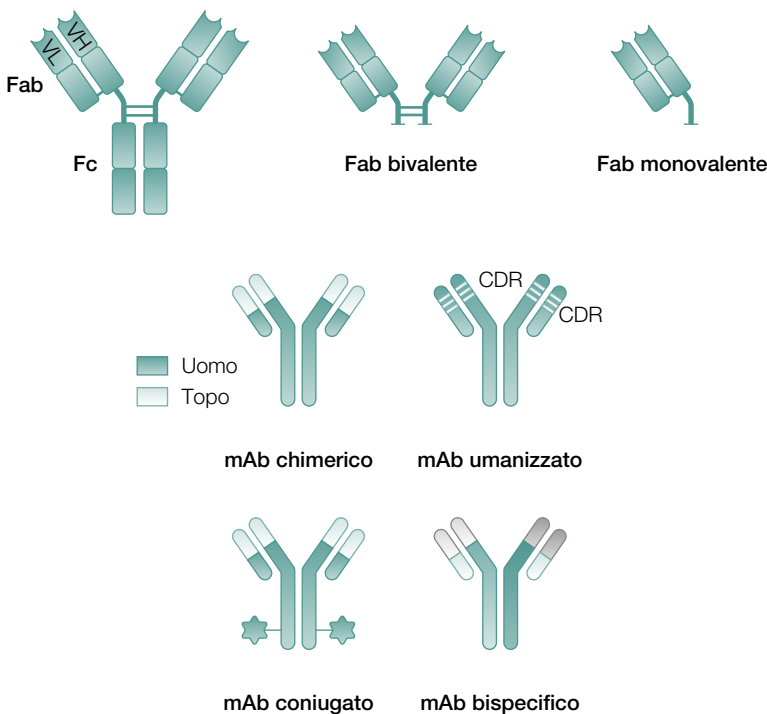
Oltre agli anticorpi murini, sono oggi disponibili anticorpi monoclonali prodotti nel coniglio, nella pecora e nei camelidi, una famiglia di mammiferi a cui appartengono cammelli e dromedari. Questa famiglia ha acquisito notevole interesse nella ricerca di base, nella diagnostica e terapia in quanto gli anticorpi da essa generati presentano una struttura che consente il riconoscimento di epitopi non facilmente accessibili agli anticorpi di altre specie.

Un anticorpo terapeutico ideale deve avere tre importanti caratteristiche: elevata affinità (forza di legame non covalente con l'antigene), alta specificità e assenza di immunogenicità. Parallelamente all'evoluzione dei metodi di ingegnerizzazione, le tecnologie di produzione degli anticorpi monoclonali si sono pertanto affinate, per produrre anticorpi con questi requisiti (Figura 4.1). Gli sforzi più grandi sono stati compiuti per implementare le funzioni effettrici degli anticorpi murini, molto basse nell'uomo, e per limitare considerevolmente la risposta immunitaria che il paziente mette in atto contro un anticorpo murino (*Human Anti-Mouse Antibody response*, HAMA). Una prima strategia per ridurre l'immunogenicità è stata la produzione di *anticorpi chimerici uomo-topo* costituiti dai domini variabili VH e VL della catena pesante e della catena leggera di un anticorpo monoclonale murino e dai domini costanti della catena pesante e della catena leggera di un anticorpo umano. La molecola risultante è umana per il 70-80% della sequenza e questo è sufficiente a ridurre l'immuno-

genicità rispetto all'anticorpo murino. Un ulteriore metodo, chiamato *umanizzazione*, prevede che solo le sequenze *complementarity-determining region* (CDR) murine, direttamente responsabili dell'interazione con l'antigene, siano introdotte in un anticorpo umano. L'anticorpo risultante è umano al 90%, con rischio di HAMA assai modesto. Un ulteriore progresso nel campo degli anticorpi monoclonali per uso terapeutico è stata la produzione di *anticorpi bispecifici* che, riconoscendo due antigeni perché composti da frammenti di due diversi anticorpi monoclonali, presentano maggiori proprietà citotossiche. Infine, esiste un ampio gruppo di anticorpi chiamati *Antibody-Drug Conjugates* (ADC) che possono essere chimicamente coniugati con un "carico", cioè una molecola, quale un isotopo radioattivo, una tossina o un farmaco chemioterapico, in grado di causare la morte della cellula che l'anticorpo monoclonale riconosce. L'ingegneria genetica ha inoltre consentito di produrre un'ampia varietà di *frammenti anticorpali* monovalenti, bivalenti e tetravalenti in cui i domini VH e VL sono gli elementi costitutivi essenziali. Questi anticorpi hanno ottime specificità e affinità, unite a un basso grado di immunogenicità.

### Applicazioni terapeutiche

Gli anticorpi monoclonali sono ampiamente utilizzati nei trapianti, nel trattamento delle malattie infiammatorie e autoimmuni, e in oncologia. È inoltre sempre più frequente il loro utilizzo nel trattamento delle malattie virali. La pandemia da Covid-19 ne ha



**FIGURA 4.1** Struttura degli anticorpi monoclonali e tipologie di anticorpi ingegnerizzati. Le sequenze CDR, regioni determinanti la complementarità, formano i siti di legame per l'antigene.

recentemente messo in luce l'importanza come agenti terapeutici utili a contrastare l'infezione da Sars-Cov2 in soggetti fragili affetti da patologie gravi.

## Malattie infiammatorie e autoimmuni

Gli anticorpi monoclonali ad attività antinfiammatoria sono progettati per riconoscere le molecole coinvolte nell'infiammazione. Tra i primi approvati dalla European Medicines Agency (EMA) per l'uso in clinica vi sono il golimumab, che blocca il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- $\alpha$ ), e il tocilizumab, che lega il recettore per interleuchina-6 (IL-6), e che esercitano rispettivamente azione anti-infiammatoria e azione immunosoppressiva in molte patologie tra cui l'artrite reumatoide e l'artrite psoriasica. Gli anticorpi monoclonali ad attività immunosoppressiva vengono somministrati anche per prevenire il rigetto di organi trapiantati.

## Malattie oncologiche

Attualmente, sono disponibili più di quaranta tipologie di coniugati anticorpo-farmaco (ADC) progettati per veicolare chemioterapici con maggiore selettività verso il tumore. Altri anticorpi monoclonali usati in oncologia sono progettati per legarsi sulla superficie cellulare di molecole coinvolte nella crescita del tumore e nella generazione di metastasi. Anche il blocco dei recettori o dei fattori di crescita che regolano la formazione di nuovi vasi sanguigni, essenziali per l'espansione di un tumore, è risultato molto efficace. Per esempio, l'anticorpo monoclonale umanizzato bevacizumab, un inibitore dell'angiogenesi, lega il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) ed è utilizzato nella terapia di vari tipi di tumore, tra cui il carcinoma del colon.

Uno sviluppo terapeutico ampiamente utilizzato in oncologia è l'immunoterapia. Questo approccio prevede la somministrazione di anticorpi monoclonali per aumentare la capacità del sistema immunitario del paziente di inibire la crescita del tumore. La modulazione della risposta immunitaria mediante immunoterapia necessita di sistemi recettoriali che agiscono sia come "acceleratori" sia come "freni" delle cellule T. Due dei "freni" usati hanno come bersaglio la proteina 4 associata ai linfociti T citotossici (CTLA-4) e la proteina 1 della morte cellulare programmata (PD-1). Anticorpi monoclonali quali l'ipilimumab e il nivolumab si legano ai ligandi naturali di questi recettori, bloccando l'inibizione delle cellule T, che possono così aggredire il tumore.

Un approccio alternativo alla stimolazione diretta delle cellule T è la stimolazione indiretta, ottenuta attivando alcuni recettori localizzati sulle cellule dendritiche, sui macrofagi, sui monociti o sui linfociti B. Recentemente, diversi studi clinici hanno valutato la combinazione dei due approcci su una vasta gamma di tumori solidi. Nonostante gli incoraggianti risultati

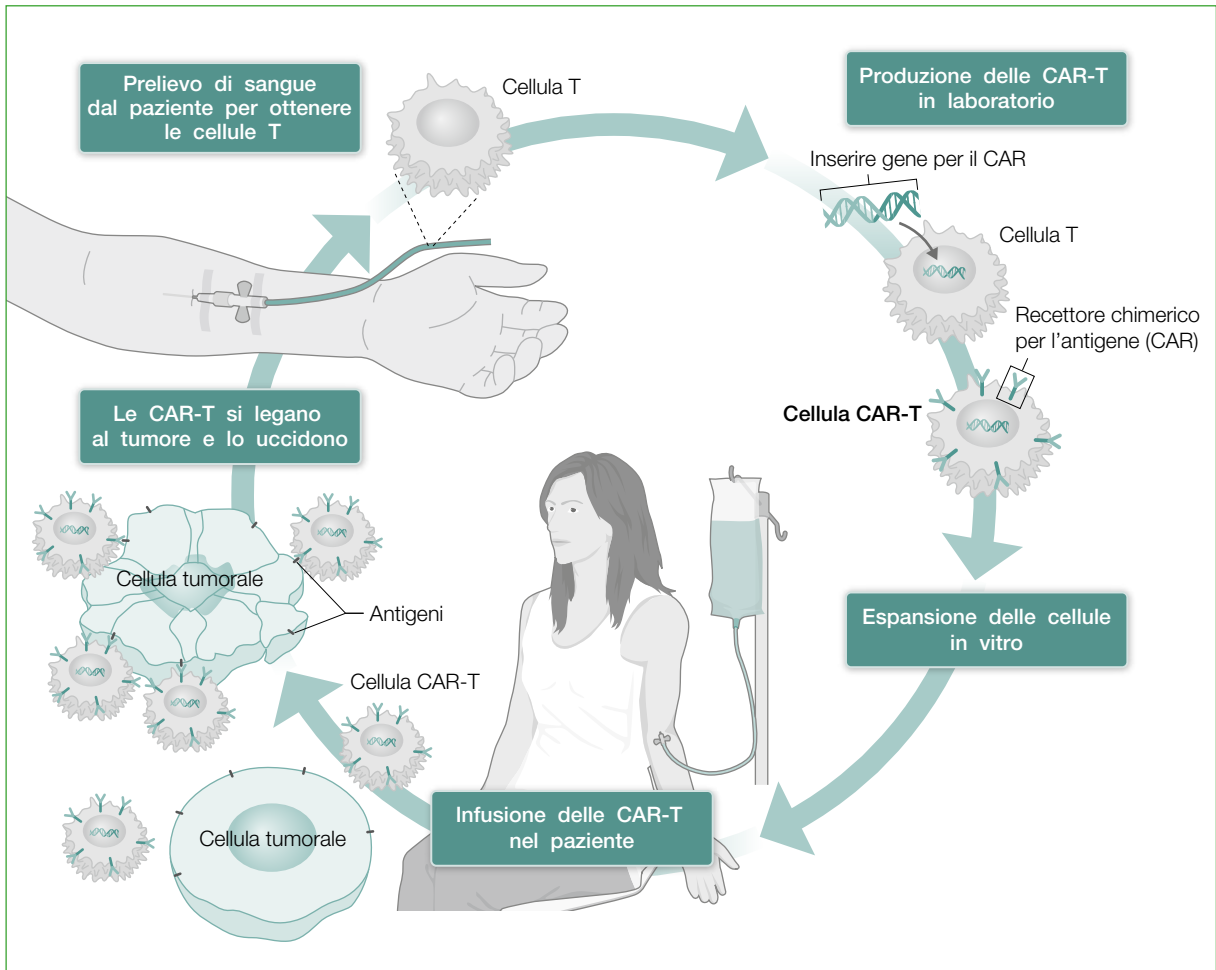
ottenuti, gli scienziati stanno proseguendo nella ricerca di altre strategie.

Tra queste, di particolare interesse è la terapia cellulare adottiva T (*Adoptive Cell Therapy*, ACT). I linfociti tumorali infiltranti isolati da tessuto tumorale asportato, infatti, sono spesso in grado di riconoscere le cellule tumorali. Dopo l'isolamento, i linfociti infiltranti possono essere espansi in vitro e in seguito reintrodotti nel paziente insieme a una dose elevata di interleuchina-2 (Figura 4.2). Studi clinici su pazienti con melanoma metastatico avanzato hanno mostrato notevoli risultati, ottenendo la regressione completa del tumore, soprattutto quando la terapia ACT è stata combinata con un pretrattamento di deplezione dei linfociti.

Tra le strategie più innovative per aggredire il tumore si annoverano, inoltre, le cellule T isolate da sangue periferico del paziente e geneticamente ingegnerizzate per riconoscere antigeni tumore-specifici attraverso l'introduzione di un recettore sintetico T cellulare (*Synthetic T Cell Receptor*, sTCR), detto anche più comunemente recettore chimerico per l'antigene (*Chimeric Antigen Receptor*, CAR). Le CAR-T, che sono quindi un prodotto cellulare di terapia genica, dopo reinfusione nel paziente aggrediscono il tumore riconoscendo antigeni specifici sulle cellule tumorali (vedi Figura 4.2). A partire dal 2018, l'EMA ha autorizzato sette terapie con cellule CAR-T. Tra le prime a essere state autorizzate troviamo axicabtagene ciloleucel e tisagenlecleucel: sono CAR-T che riconoscono l'antigene CD19 presente in diversi tumori del sangue. Axicabtagene ciloleucel è usato per il trattamento dei linfomi non-Hodgkin molto aggressivi nei pazienti adulti. Tisagenlecleucel è approvato per bambini e giovani adulti fino ai 25 anni con leucemia linfoblastica acuta a cellule B refrattaria o recidiva. Più recentemente, nel 2021, l'EMA ha anche autorizzato l'uso di idecabtagene vicleucel, la prima terapia a base di CAR-T per il trattamento dei pazienti adulti con mieloma multiplo recidivante e refrattario.

È importante ricordare che le terapie con CAR-T necessitano di un trattamento preventivo di chemioterapia per favorire la persistenza e la crescita delle nuove cellule CAR-T somministrate. Pur trattandosi di terapie in grado di cambiare radicalmente il trattamento di alcune forme di tumore, le CAR-T non sono prive di effetti collaterali, come la sindrome da rilascio di citochine. Altro aspetto da non trascurare è quello relativo al fatto che non sempre è possibile prelevare i linfociti T del paziente per "trasformarli" in CAR-T, perché le chemioterapie utilizzate per combattere il tumore possono avere eliminato definitivamente le cellule di interesse.

Oggi questi limiti possono essere superati mediante l'applicazione della tecnologia CAR alle cellule *natural killer* (NK). A causa di alcune particolari peculiarità molecolari, le NK non danno luogo alla sindrome da rilascio di citochine e al fenomeno della sindrome del trapianto contro l'ospite. Le cellule NK sono quin-



**FIGURA 4.2** Le cellule CAR-T: generazione e impiego in oncologia.

di adatte a una terapia off-the-shelf, ovvero consentono di trattare un ampio numero di pazienti affetti da tumore partendo da un singolo lotto derivante da un donatore sano. L'utilizzo di cellule CAR-NK è oggetto di diversi studi sperimentali. Sono in fase di sperimentazione anche le CAR-CIK (*Cytokine Induced Killer*) ossia linfociti T che uniscono all'attività citotossica dei linfociti T quella antitumorale delle cellule NK. La terapia CAR-CIK si basa sull'impiego di linfociti di donatori compatibili e di tecniche di ingegnerizzazione semplificate e meno costose rispetto a quelle utilizzate per produrre le CAR-T, in quanto non prevedono l'impiego di vettori virali, ma di trasposoni (elementi mobili presenti nel genoma), considerati più sicuri. A oggi, nessuna tipologia di cellule CAR si è dimostrata efficace nel contrastare i tumori solidi. I principali ostacoli da superare sono l'espressione eterogenea dell'antigene bersaglio e la difficile penetrazione nel tumore, oltre al microambiente tumorale immunosoppressivo e ipossico che ne limita la sopravvivenza. Recenti ricerche però forniscono nuovi strumenti utili per superare questi limiti. Il

protagonista è il microbiota. Se opportunamente ingegnerizzati, alcuni probiotici possono colonizzare il tumore solido e marcarlo con antigeni specifici, per il riconoscimento da parte delle cellule CAR.

### Recettori esca o "decoy"

Mentre il riconoscimento e la risposta sono due elementi che caratterizzano la definizione classica di recettore, i recettori "esca" (*decoy receptors* in inglese) costituiscono una deviazione da questo paradigma classico. In forma solubile o associata alla membrana, un recettore esca lega il ligando senza però che vi sia una conseguente risposta biologica. Il paradigma dei recettori esca fu formulato in origine per il recettore di tipo II di interleuchina-1 (IL-1) grazie al lavoro pionieristico dell'immunologo Alberto Mantovani. Il recettore esca IL-1, in forma associata alla membrana o in forma solubile, da solo o complessato con una proteina accessoria nota come *Accessory Protein* (AcP), lega i ligandi IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  impedendo loro di riconoscere il recettore IL-1 di membrana, che trasdu-

ce il segnale. Il paradigma dei recettori esca, successivamente esteso ad altri membri della famiglia delle interleuchine, a citochine e a fattori di crescita, ha consentito di sviluppare una nuova classe di farmaci che prende il nome di "farmaci esca", utili per trattamento delle malattie da infiammazione cronica.

### Generazione e funzioni

I meccanismi fisiologici alla base della generazione dei recettori esca comprendono lo splicing alternativo dell'mRNA e il taglio proteolitico del recettore di membrana. Lo splicing alternativo dà luogo a forme solubili dei recettori esca attraverso l'esclusione dell'esone che codifica per la porzione transmembrana del recettore, oppure prevede l'inclusione nel trascritto maturo di un "esone solubile", che causa l'arresto della catena peptidica prima dell'esone transmembrana. Tra gli enzimi proteolitici più comuni implicati nella generazione di recettori esca in forma libera si annoverano la disintegrina e la metalloproteasi 17 (ADAM17), le metalloproteasi di matrice (MMP) e la fosfolipasi C. Quest'ultimo enzima produce recettori esca esercitando attività proteolitica sul dominio proteico contenente glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI), che ancora il recettore alla membrana plasmatica.

La maggior parte dei recettori esca per citochine e chemochine si trova in forma solubile e lega l'agonista, impedendone l'interazione con il recettore di membrana funzionale. I recettori solubili, perciò, agiscono fisiologicamente come regolatori negativi dei processi infiammatori. Anche i co-recettori in forma solubile possono funzionare da esche. I co-recettori non traducono direttamente il segnale, ma collaborano con i recettori di membrana per facilitare l'interazione con il ligando e promuovere l'attivazione della segnalazione. In forma solubile, i co-recettori possono agire come esche, competendo con quelli di membrana per il legame al recettore. Inoltre, possono sequestrare complessi solubili di recettori associati a ligandi, impedendo la formazione del complesso funzionale con il co-recettore di membrana.

Il risultato finale è sempre il blocco dell'attività del recettore di membrana.

Anche se, in generale, i recettori esca si comportano come inibitori, vi sono però eccezioni importanti. Recettori solubili appartenenti alla famiglia dei recettori per l'IL-6 legano l'agonista e lo presentano al recettore IL-6 di membrana, partecipando al processo di segnalazione (fenomeno di *trans-signaling*). Possono, inoltre, prolungare l'emivita dell'agonista e proteggerlo dalla digestione da parte di enzimi proteolitici. In conclusione, la funzione dei recettori solubili può essere illustrata ricorrendo all'immagine di una bilancia: da una parte possono comportarsi da dominanti negativi bloccando la segnalazione, dall'altra possono aumentare la stabilità e prolungare l'emivita degli agonisti favorendo la trasduzione del

segnale. In generale, l'effetto prevalente è quello di tipo inibitorio.

### Recettori esca come farmaci

Come fattori neutralizzanti, i recettori esca sono altamente specifici e legano il loro bersaglio con elevata affinità. La loro natura solubile, inoltre, consente il raggiungimento dei tessuti bersaglio dopo una semplice iniezione anche in un sito distante dal loro *target* d'azione. Queste caratteristiche, unite al fatto di non essere riconosciuti come estranei dal sistema immunitario, li rende ottimi candidati a rivestire il ruolo di farmaci. I principali problemi legati al loro utilizzo sono la rapida clearance e la breve emivita nel sangue (poche ore), entrambi tuttavia superabili mediante l'accoppiamento con la porzione Fc delle immunoglobuline di classe IgG (spesso IgG1). In questo modo il recettore esca acquisisce un'emivita che è dell'ordine di molti giorni, paragonabile a quella degli anticorpi monoclonali.

Oggi è disponibile per uso clinico una proteina di fusione costituita dalla parte extracellulare del recettore 2 del fattore di necrosi tumorale (TNFR2) umano e della porzione Fc di una catena pesante di IgG1 umana. Questa molecola, chiamata etanercept, si è dimostrata efficace nel trattamento di forme moderate-gravi di spondilite anchilosante, artrite giovanile, psoriasi a placche, artrite reumatoide e artrite psoriasica. Dal 1991, l'FDA e l'EMA hanno approvato più di 30 recettori solubili per uso clinico, nella maggior parte dei casi in grado di riconoscere citochine (TNF, interleuchine) e fattori di crescita (VEGF). Tra i recettori solubili usati come farmaci si annovera il riloncept, una proteina di fusione dimerica che, legandosi a IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$ , inibisce IL-1. Riloncept è indicato per il trattamento delle sindromi periodiche associate alla criopirina (CAPS). Un altro farmaco biologico basato sui recettori esca, con ampio utilizzo clinico, è aflibercept, una proteina di fusione ricombinante costituita da porzioni leganti i domini extracellulari dei recettori di VEGF umani 1 e 2 fusi con la Fc di una IgG1 umana. Il VEGF è una proteina che partecipa alla regolazione dello sviluppo e della permeabilità dei vasi sanguigni sia in condizioni fisiologiche sia in condizioni patologiche. È implicato nello sviluppo e nella progressione della degenerazione maculare neovascolare (essudativa) correlata all'età ed è, inoltre, uno dei fattori responsabili dell'angiogenesi tumorale. Aflibercept è stato approvato nel 2011 per il trattamento della degenerazione maculare neovascolare ed è utilizzato da diversi anni anche in oncologia, in combinazione con i chemioterapici.

### Farmaci a RNA

Nel 1998, con una pubblicazione sulla rivista Nature, gli scienziati americani Andrew Fire e Craig Mello rivelarono alla comunità scientifica la scoperta di un meccanismo cellulare progettato per inibire la sintesi di proteine

specifiche basate sui piccoli RNA chiamati RNA interferenti (RNAi). In breve, l'*RNA interference* prevede che piccole molecole di RNA a filamento singolo si leghino con elevata specificità a molecole di RNA messaggero con sequenza complementare e ne inducano la degradazione. La scoperta dell'interferenza dell'RNA ha permesso di sviluppare farmaci efficaci nel contrastare malattie genetiche incurabili. Nel 2001 Thomas Tuschl per primo utilizzò gli RNAi per silenziare i geni nelle cellule di mammifero. Negli ultimi anni sono stati sviluppati altri farmaci a RNA attivi sulle proteine (aptameri) e sul genoma (RNA guida del sistema CRISPR/Cas9). In questa classe di farmaci rientrano, inoltre, i vaccini a RNA. Alcuni dei farmaci a RNA il cui uso è approvato da FDA ed EMA sono riportati nella Tabella 4.1.

### Tipologie di farmaci a RNA e applicazioni terapeutiche

#### RNA terapeutici implicati nella regolazione della traduzione: siRNA e miRNA

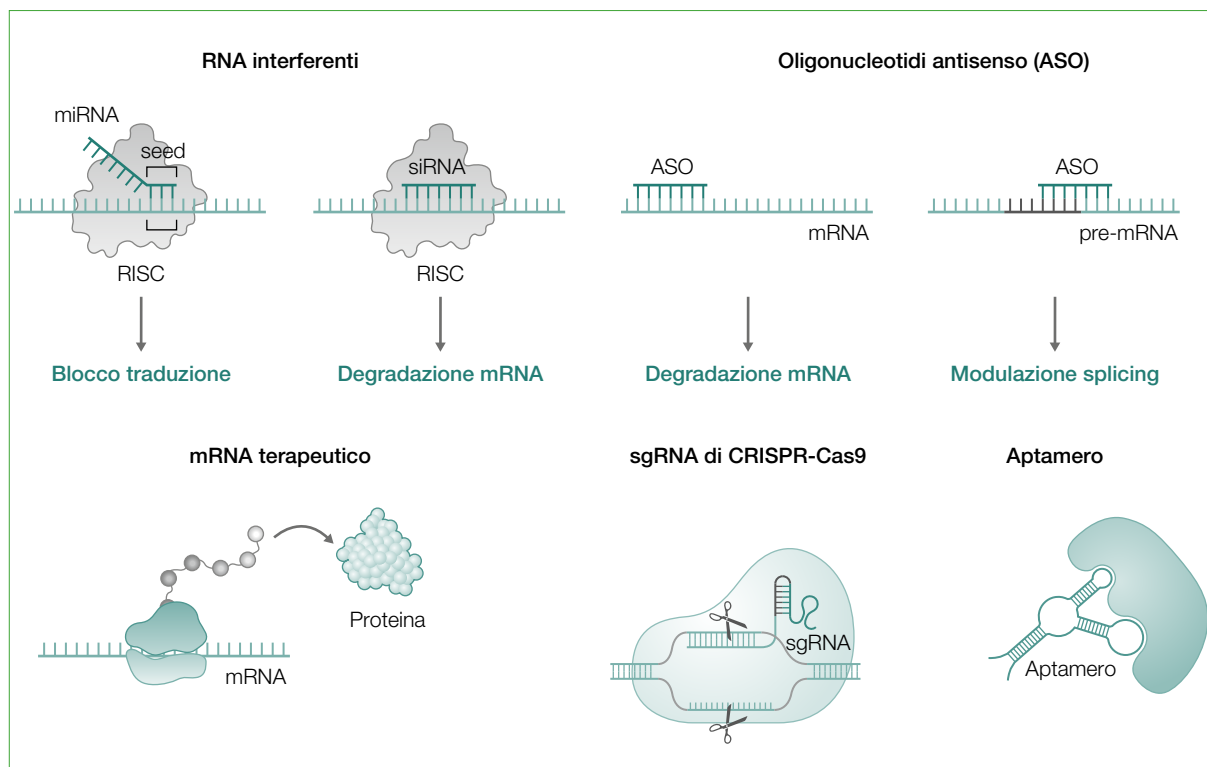
Gli *small interfering RNA* (siRNA) e micro-RNA (miRNA) sono oligonucleotidi a RNA a doppio filamento che riconoscono la loro sequenza bersaglio sull'mRNA nel citosol attraverso la complementarità fra basi. A livello fisiologico, sono implicati nella regolazione della

traduzione. I siRNA e miRNA vengono processati dalla nucleasi Dicer in piccoli frammenti di 22 nucleotidi. Una volta prodotti, questi frammenti di RNA vengono incorporati nel complesso RISC, che degrada uno dei due filamenti. A questo punto, il filamento conservato si lega alla molecola di RNA messaggero a esso complementare, inducendone la degradazione (nel caso dei siRNA) o il blocco della traduzione (con i miRNA). A differenza dei siRNA, che funzionano per perfetta complementarità con l'RNA bersaglio, i miRNA presentano una sequenza *seed*, sede di appaiamenti non canonici, che rendono ogni miRNA capace di legare potenzialmente molti mRNA differenti. I miRNA sono pertanto meno specifici dei siRNA. Infatti, a differenza dei siRNA, i miRNA non inducono l'immediato taglio endonucleolitico e la degradazione dell'RNA bersaglio, ma, piuttosto, ne inibiscono la traduzione e, in alcuni casi, ne diminuiscono la stabilità.

Lo spettro dei possibili oligonucleotidi terapeutici (Figura 4.3) comprende anche sequenze oligonucleotidiche antisense (ASO), molecole di RNA o DNA a singolo filamento costruite in laboratorio con lo scopo di legare e bloccare un determinato RNA messaggero. Il loro vantaggio rispetto ai siRNA e miRNA consiste nel fatto che non necessitano del macchinario cellulare che ne permette la maturazione, in quanto già pronte per appaiarsi alle molecole

TABELLA 4.1 Farmaci a RNA approvati per l'uso clinico da FDA ed EMA.

Categoria	Nome del farmaco	Sviluppato da	Anno di approvazione EMA/FDA	Indicazione terapeutica
ASO	fomivirsen	Ionis Pharmaceuticals	1998	retinite da CMV in pazienti affetti da AIDS
	mipomersen	Ionis Pharmaceuticals	2013	ipercolesterolemia familiare
	etepirsen	Sarepta Therapeutics	2016	distrofia muscolare di Duchenne
	nusinersen	Ionis Pharmaceuticals/Biogen	2016	atrofia muscolare spinale
	defibrotide	Jazz Pharmaceuticals	2016	malattia veno-occlusiva epatica
	inotersen	Akcea Therapeutics and Ionis Pharmaceuticals	2018	danno neuronale in adulti con amiloidosi ereditaria da transtiretina
	volanesorsen	Ionis Pharmaceuticals/Akcea	2019	sindrome da chilomicronemia familiare
	golodirsen	Sarepta Therapeutics	2019	distrofia muscolare di Duchenne
	viltolarsen	NS pharma	2020	distrofia muscolare di Duchenne
casimersen	Sarepta Therapeutics	2021	distrofia muscolare di Duchenne	
siRNA	patisiran	Alnylam Pharmaceuticals	2018	amiloidosi ereditaria da transtiretina
	givosiran	Alnylam Pharmaceuticals	2019	porfiria epatica acuta
	inclisiran	Alnylam Pharmaceuticals/Novartis	2021	ipercolesterolemia
	lumasiran	Alnylam Pharmaceuticals	2020	iperossaluria primaria di tipo 1
	vutrisiran	Alnylam Pharmaceuticals	2022	amiloidosi ereditaria da transtiretina
Aptamero	pegaptanib	OSI Pharmaceuticals	2004	degenerazione maculare neovascolare legata all'età



**FIGURA 4.3** Tipologie di farmaci a RNA.

bersaglio. A differenza di miRNA e siRNA, una volta entrati nel nucleo gli ASO si legano sia a regioni esoniche sia a regioni introniche dei precursori di mRNA. Risultano in questo modo molto più selettivi e specifici nel riconoscimento del bersaglio. Possono, inoltre, intervenire durante il processo di maturazione dell'mRNA chiamato splicing. Tra i nuovi farmaci interferenti che sfruttano questa proprietà, nel 2017 viene approvato il nusinersen per l'utilizzo in pratica clinica nei bambini affetti da Atrofia Muscolare Spinale (SMA), una malattia genetica recessiva causata da mutazione in entrambi gli alleli del gene SMN1, che produce la proteina *Survival Motor Neuron* (SMN) necessaria per la sopravvivenza dei motoneuroni. I pazienti affetti da SMA hanno un numero variabile di copie di un secondo gene, SMN2, che codifica per una forma tronca della proteina SMN, a causa di un fenomeno di *exon skipping* che porta all'esclusione dell'esone 7 nel mRNA di SMN2. La proteina tronca SMN2 è quindi dotata di una funzionalità ridotta rispetto alla proteina SMN1 completa. Nusinersen è un oligonucleotide antisenso disegnato per legarsi al sito ISS-N1 (*Intronic Splice Silencing*) presente nell'introne 7 del pre-mRNA di SMN2. Attraverso il legame, l'ASO sposta i fattori di splicing, che normalmente nel paziente con mutazione in SMN2 reprimono lo splicing, permettendo l'inclusione dell'esone 7 nell'mRNA di SMN2 con produzione di una proteina SMN2 intera funzionante. Il farmaco, prima somministrato per via

intratecale, è disponibile dal 2022 anche come formulazione orale da somministrare giornalmente. Dal 2021 i malati SMA hanno a disposizione un'ulteriore possibilità di trattamento con singola somministrazione di una terapia genica che prevede la somministrazione del gene SMN1 mediante vettori virali.

### RNA terapeutici attivi come inibitori diretti di proteine (aptameri)

Gli aptameri sono piccole molecole di RNA a struttura terziaria, capaci di legare bersagli molecolari intracellulari – tipicamente proteine – con un'affinità paragonabile a quella degli anticorpi. Nonostante il vantaggio di essere più piccoli e meno immunogenici degli anticorpi, l'utilizzo clinico degli aptameri è ostacolato dalle scarse proprietà farmacocinetiche perché sono altamente sensibili alle nucleasi e velocemente escreti dai reni. Uno degli aptameri attualmente in commercio è pegaptanib, un farmaco anti-angiogenico usato per curare la degenerazione maculare legata all'età (AMD). Inoltre, gli aptameri sono spesso impiegati contro batteri e virus. Sono inoltre disponibili aptameri che legano la trombina e pertanto in grado di esplicare attività anticoagulante all'interno dell'organismo. Gli aptameri trovano, infine, molte applicazioni in campo diagnostico e biotecnologico per la loro specificità e rapidità nelle reazioni di riconoscimento.

## RNA terapeutici attivi sul DNA genomico

Alcuni microrganismi, in particolare archaea e batteri, possiedono particolari endonucleasi CAS associate al loro sistema immune adattivo, dette *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR). Il sistema CRISPR-Cas permette loro di riconoscere, mediante una breve sequenza di RNA complementare (RNA guida, o sgRNA), DNA "invasori" di origine virale e degradarli. A differenza delle endonucleasi già note, in cui il motivo di riconoscimento della sequenza bersaglio è codificato nella catena polipeptidica, nella endonucleasi Cas9 il riconoscimento della sequenza di DNA è affidato a una sequenza modificabile di sgRNA associata all'endonucleasi stessa. Tramite il sistema CRISPR-Cas9 è quindi possibile individuare con precisione qualsiasi sequenza di DNA genomico da tagliare, semplicemente associando alla Cas9 una sequenza di sgRNA complementare alla sequenza del DNA bersaglio. La scoperta, nel 2012, di questa nuova famiglia di DNA endonucleasi con guida a RNA ha determinato una rivoluzione nel campo dei farmaci a RNA. Tale strategia rende infatti possibili inserzioni o delezioni del DNA genomico nel locus genetico desiderato in modo efficiente e preciso. Da anni il sistema CRISPR-Cas9 è allo studio in ambito medico (diagnostico e terapeutico), a cominciare dalle malattie genetiche fino ad arrivare, anno dopo anno, alle malattie infettive come l'AIDS e a particolari tipologie di tumori. Il sistema CRISPR-Cas9 ha di fatto già trovato applicazioni terapeutiche nella generazione delle cellule CAR-T. Nel 2024 è stata approvata la prima terapia genica basata sulla tecnica CRISPR per il trattamento dell'anemia falciforme e della beta-talassemia. Sono disponibili anche forme inattive della Cas9 fuse ad enzimi che, veicolate in prossimità di un promotore, attivano o reprimono la trascrizione genica. Da alcuni anni è nota una variante di Cas9 – ovvero Cas13 – che può veicolare gli sgRNA sull'mRNA piuttosto che sul genoma, offrendo alla comunità scientifica un nuovo e preciso approccio di modulazione della traduzione basato sul sistema CRISPR.

Nel 2020, per le loro scoperte rivoluzionarie sul sistema CRISPR-Cas9, Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna sono state insignite del Premio Nobel per la Chimica.

## Vaccini a mRNA

Sono tra i farmaci a RNA più noti perché hanno trovato ampio utilizzo durante la pandemia da Sars-Cov2. I vaccini a mRNA contengono, incapsulato in liposomi, l'mRNA codificante per una determinata proteina virale che, riconosciuta come estranea dal sistema immunitario, scatenerà la produzione di anticorpi specifici in grado di aggredire il virus. Per quanto riguarda i vaccini a mRNA, un aspetto di cruciale importanza è la modifica della struttura dell'mRNA per migliorarne la stabilità e ridurre i processi infiammatori.

Un contributo fondamentale in questo ambito è stato apportato da Katalin Karikó e Drew Weissman che, nel 2023, hanno ricevuto il Premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina per la scoperta di come modificare le molecole di mRNA, rendendo possibile lo sviluppo dei vaccini a mRNA, come quelli contro SARS-CoV-2. Dopo il clamoroso successo di questi vaccini, sono stati proposti o sono in fase di studio altri vaccini a mRNA per il trattamento di diverse patologie infettive. Di particolare interesse, inoltre, è lo sviluppo di vaccini a mRNA come strategia di immunoterapia in ambito oncologico.

## Formulazione, veicolazione, uptake e distribuzione intracellulare di RNA terapeutici

La natura polianionica e le dimensioni degli RNA terapeutici ne rendono difficile la diffusione attraverso le membrane cellulari. Esonucleasi ed endonucleasi, inoltre, contribuiscono a diminuirne la biodisponibilità. È quindi necessario modificarne la struttura chimica, per conferire loro un'adeguata stabilità biologica senza alterarne la capacità di ibridizzare le strutture bersaglio. Per aumentare la stabilità degli RNA terapeutici sono state introdotte diverse modifiche ai gruppi ossidrilici del fosforo e dell'ossidrilico 2' del ribosio e in minor misura alle basi stesse. Nonostante ciò, gli RNA terapeutici mantengono grandi dimensioni e raggiungere il bersaglio d'azione non è semplice. Gli studi farmacocinetici nell'uomo hanno confermato che gli ASO e i siRNA, quando iniettati per via endovenosa, si distribuiscono in tutti gli organi salvo il Sistema Nervoso Centrale, e si concentrano in maggiore quantità nel fegato, nel rene e proporzionalmente nel midollo osseo. In generale, tutti i derivati oligonucleotidici interagiscono con le proteine plasmatiche e ciò diminuisce l'elevata clearance renale, rendendone la farmacocinetica sufficientemente favorevole. Non attraversando la barriera emato-encefalica, quando utilizzati nel trattamento di malattie del Sistema Nervoso Centrale gli RNA terapeutici richiedono metodi di somministrazione invasivi come le vie intratecali o intraventricolari. La veicolazione di RNA terapeutici, tra cui anche i vaccini a mRNA, avviene quindi per lo più tramite l'uso di nanoparticelle lipidiche, le cui formulazioni sono in continua evoluzione per permettere l'attraversamento della barriera emato-encefalica, oltre a migliorarne l'assorbimento, la stabilità biologica e la veicolazione su specifici bersagli cellulari o sub-cellulari.

Per le grandi dimensioni molecolari e la natura idrofila, l'uptake cellulare degli RNA terapeutici è molto limitato. Per aumentare l'uptake cellulare, che avviene in genere per endocitosi o pinocitosi, è frequente la bio-coniugazione dell'RNA terapeutico con ligandi per recettori localizzati su specifiche popolazioni cel-

lulari. Anche l'endosoma rappresenta una barriera, in quanto trattiene al suo interno circa il 99% dell'RNA terapeutico, poi degradato a seguito della fusione con i lisosomi. Da anni si studiano strategie per favorire la fuga degli RNA terapeutici dagli endosomi in modo da aumentarne la biodisponibilità, purtroppo con scarsi risultati e con il problema della tossicità dei sistemi usati. Una volta rilasciati nel citoplasma, l'emivita degli RNA terapeutici è influenzata dalla natura chimica dell'oligonucleotide: alcuni vengono catabolizzati in pochi minuti, mentre altri resistono per alcune ore. A differenza delle *small molecules*, che richiedono da 100.000 a 500.000 molecole intracellulari per raggiungere l'attività terapeutica, uno dei vantaggi dei siRNA e degli ASO è che per la massima attività sembrano richiedere, rispettivamente, solo circa 2000 o 50.000 molecole citoplasmatiche.

### Tossicità cellulare e mutagenicità

Gli RNA terapeutici o i loro cataboliti possono interferire con proteine cellulari.

In particolare, gli oligonucleotidi fosforotioati si legano alle proteine plasmatiche e a quelle cellulari anche in modo sequenza-ascpecifico, comportandosi come composti di tipo eparinico. I residui nucleotidici liberati nel processo catabolico degli oligonucleotidi possono determinare sovraccarico all'interno della cellula e interferire con funzioni metaboliche vitali. Inoltre, gli sgRNA possono causare effetti *off target*, andando a riconoscere sequenze non perfettamente complementari a quella d'interesse e determinando l'azione del sistema di CRISPR su altri geni oltre a quelli voluti. Per superare questo limite sono state prodotte nuove forme dell'endonucleasi Cas9, con attività più specifica. Il campo è in continua evoluzione perché gli effetti *off target* rappresentano l'ostacolo più importante da superare per l'utilizzo del sistema CRISPR nella pratica clinica.

### Medicinali per Terapie Avanzate (ATMP)

I medicinali per terapie avanzate (ATMP, Advanced Therapy Medicinal Products) sono medicinali biologici per uso umano basati su geni, tessuti o cellule. Sono classificati in tre gruppi principali: medicinali di terapia genica (GTP), medicinali di terapia cellulare somatica (SCP) e medicinali di ingegneria tissutale (TEP). I GTP contengono o consistono di un acido nucleico ricombinante in grado di indurre un effetto terapeutico, profilattico o diagnostico. I medicinali di terapia genica permettono di regolare, riparare, sostituire, aggiungere o eliminare una sequenza genetica. Generalmente, il materiale genetico può essere trasferito in due modi, *ex vivo* o *in vivo*. Nell'approccio *ex vivo*, il trasferimento del gene terapeutico nelle cellule di un paziente o di un donatore sano avviene durante la coltura *in vitro*, al termine della quale le cellule

sono somministrate al paziente. Il vantaggio dell'approccio *ex vivo* è rappresentato dalla possibilità di selezionare, espandere e, se necessario, differenziare le cellule bersaglio. Nell'approccio *in vivo* invece, il gene viene trasferito direttamente nelle cellule o nel tessuto bersaglio per via sistemica (endovenosa) o locale (per es. intracerebrale o intramuscolare). Gli SCP e i TEP comprendono cellule o tessuti che sono stati modificati in modo rilevante, così da variarne le caratteristiche biologiche, le funzioni fisiologiche o le proprietà strutturali, o che non sono destinati a essere utilizzati per le stesse funzioni originarie nell'organismo. Lo scopo è trattare, prevenire o diagnosticare le malattie. Le cellule o i tessuti possono essere di origine autologa (derivati dal paziente stesso), allogenica (ottenuti da un donatore) o xenogenica (derivati da un donatore di una specie animale differente dall'uomo).

Da quanto descritto si può dedurre facilmente come il grado di eterogeneità e complessità degli ATMP sia molto alto. Ciò dipende dalla tipologia di cellula usata, dal suo stadio di maturazione, dalla capacità di differenziamento. Le cellule, inoltre, possono essere isolate dallo stesso paziente da trattare (terapia cellulare autologa), oppure possono provenire da un donatore. I prodotti usati possono essere modificati per ottenere la stessa funzione del tessuto di origine (uso clinico omologo) o utilizzati per uso non omologo, se applicati nel ricevente per esercitare una funzione diversa. A ciò si uniscono i metodi che introducono geni terapeutici nelle cellule (metodi virali e non virali; *genome editing*), e i sistemi di delivery. Alcuni ATMP, definiti medicinali per terapie avanzate combinate, contengono uno o più dispositivi medici, substrati, scaffold e matrici biodegradabili come parte integrante del medicinale a base di cellule o tessuti. Rientrando nella definizione tecnica di farmaco, gli ATMP devono rispettare i requisiti di Good Manufacturing Practice (GMP), di cui all'articolo direttiva 2003/94/CE. A livello europeo l'ente di riferimento è l'EMA. Il CAT, Comitato per le Terapie Avanzate, è l'organo che ha il compito di valutare qualità, sicurezza ed efficacia degli ATMP, poi sottoposti anche a valutazione dal Comitato per i Medicinali ad Uso Umano. L'EMA emette un'unica licenza valida in tutti i Paesi appartenenti alla UE e, con essa, un nome e un documento contenente le informazioni riguardanti il farmaco. Ciascun Paese prosegue poi con le procedure per l'autorizzazione all'immissione in commercio a livello nazionale.

A oggi sono stati approvati dall'EMA 25 ATMP. In particolare, sono stati autorizzati 17 GTP, tra cui alcuni precedentemente citati. Le cellule CAR-T sono classificate come prodotti medicali di terapia genica. Come spiegato nella sezione dedicata agli anticorpi, sono stati approvati 7 trattamenti con CAR-T. L'EMA ha, inoltre, approvato 5 trattamenti medicali a base di cellule somatiche (SCP). Tre sono i medicinali di

ingegneria tissutale (TEP) approvati, alcuni dei quali già citati nelle sezioni precedenti. Tra di essi vi sono farmaci orfani utilizzati per la diagnosi, la prevenzione e il trattamento delle malattie rare. Una enorme

sfida che l'intero pianeta si troverà ad affrontare sarà la sostenibilità per i sistemi sanitari delle terapie avanzate, trattandosi di farmaci molto innovativi dai prezzi spesso elevati.

### TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Grazie alla possibilità di modificare il genoma con precisione e alle conoscenze sempre più approfondite di biologia cellulare e tissutale, sono disponibili prodotti medicali a base biologica sempre più innovativi
- ▶ Anticorpi monoclonali, recettori e vaccini a mRNA sono oggi di uso comune nella pratica clinica
- ▶ I farmaci a RNA sono una strategia emergente per il trattamento delle malattie genetiche di base monogenica
- ▶ La generazione dei farmaci biologici o dei più complessi ATMP ha indotto una rivalutazione e un approfondimento della normativa, al fine di garantirne la produzione e la somministrazione in condizioni di sicurezza

### Bibliografia essenziale

- ▶ Bellino S, La Salvia A, Cometa MF, Botta R. Cell-based medicinal products approved in the European Union: current evidence and perspectives. *Front Pharmacol* 2023;14:1200808.
- ▶ Bonecchi R, Garlanda C, Mantovani A, Riva F. Cytokine decoy and scavenger receptors as key regulators of immunity and inflammation. *Cytokine* 2016;87:37-45.
- ▶ Booth C, Aiuti A. Realizing the Potential of Gene Therapies for Rare and Ultra-Rare Inherited Diseases. *Hum Gene Ther* 2023;34(17-18):776-781.
- ▶ De Luca M, Aiuti A, Cossu G et al. Advances in stem cell research and therapeutic development. *Nat Cell Biol* 2019;21(7):801-811.
- ▶ Ferrari S, Valeri E, Conti A et al. Genetic engineering meets hematopoietic stem cell biology for next-generation gene therapy. *Cell Stem Cell* 2023;30(5):549-570.
- ▶ Kim Y. Drug Discovery Perspectives of Antisense Oligonucleotides. *Biomol Ther (Seoul)* 2023;31(3):241-252.
- ▶ Majumder A. Evolving CAR-T-Cell Therapy for Cancer Treatment: From Scientific Discovery to Cures. *Cancers (Basel)* 2023;16(1):39.
- ▶ Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol* 2021;42(12):1143-1158.
- ▶ Sparmann A, Vogel J. RNA-based medicine: from molecular mechanisms to therapy. *EMBO J* 2023;42(21):e114760.
- ▶ Stone CA Jr, Spiller BW, Smith SA. Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 2024;153(3):539-548.
- ▶ Wang YS, Kumari M, Chen GH et al. mRNA-based vaccines and therapeutics: an in-depth survey of current and upcoming clinical applications. *J Biomed Sci* 2023;30(1):84.
- ▶ Zhang B, Yang M, Zhang W et al. Chimeric antigen receptor-based natural killer cell immunotherapy in cancer: from bench to bedside. *Cell Death Dis* 2024;15(1):50.