

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

**Anticorpi farmaco-coniugati (ADCs) nella terapia antineoplastica: il caso di
sacituzumab govitecan**

Relatore

Prof. Fabrizio Condorelli

Candidato

Daniela Semeraro

SESSIONE STRAORDINARIA A.A. 2024/2025

Abbreviazioni

- AAC: Antibody-Antibiotic Conjugate
- ABC: ATP-binding cassette
- ADA: Anti-Drug Antibodies
- ADC: Antibody-Drug Conjugate
- ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
- ADCP: Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis
- AML: Acute myeloid leukemia
- APCs: Antigen-Presenting Cells
- BCMA: B-cell maturation antigen
- BCR: B-cell Receptor
- BICR: Blinded, Independent, Centralised Review
- BMNeg: Brain Metastasis Negative
- CDRs: Complementarity Determining Regions
- CR: risposta completa
- DAR: Drug-to-Antibody Ratio
- DFI: Disease-Free Interval
- DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma
- DOR: Duration Of Response
- EGFR: Epidermal growth factor receptor
- EMA: European Medicines Agency
- Fab: Antigen-binding fragment
- Fc: Crystallizable fragment
- FcR: Fc Receptor
- Fc γ R: Fc gamma Receptors
- FcRn: Neonatal Fc Receptor
- FDA: Food and Drug Administration
- FR α : Folate Receptor alpha
- gBRCAm: mutazioni germinali dei geni BRCA1 e BRCA2
- HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
- HR: Hormone receptor

- IC: intervallo di confidenza
- Ig: Immunoglobulin
- ISACs o iADCs: Immune-stimulating antibody conjugates
- mAb: Monoclonal Antibody
- mTNBC: metastatic Triple-negative Breast Cancer
- ORR: Objective Response Rate
- OS: Overall Survival
- PARPi: inibitori della poli(ADP-ribosio) polimerasi
- PFS: Progression-Free Survival
- PR: risposta parziale
- PROTACs: Proteolysis Targeting Chimeras
- PRR: Pattern Recognition Receptors
- RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
- scFv: Single-chain Variable Fragment
- STING: Stimulator of Interferon Genes
- TAA: Tumor-associated Antigen
- TAM: Tumor-associated Macrophage
- TF: Tissue Factor
- TMAs: TME-associated antigens
- TME: Tumor Microenvironment
- TNBC: Triple-negative Breast Cancer
- TLR: Toll-like receptor
- TPC: Treatment of Physician's Choice
- TOPO-1: Topoisomerase 1
- TROP2: Trophoblast Cell Surface Antigen 2

1 Indice

2	Introduzione	1
3	Struttura degli ADCs e opzioni tecnologiche	4
3.1	Struttura di un ADC	4
3.1.1	Struttura anticorpale	4
3.1.1.1	Frammento legante l'antigene	5
3.1.1.2	Frammento cristallizzabile	6
3.1.1.3	Isotipo IgG e sottoclassi negli ADCs	7
3.1.1.4	ADC a struttura anticorpale ridotta	8
3.1.1.5	Ingegnerizzazione della regione Fc	9
3.1.2	Linker	10
3.1.2.1	Linker scindibili	10
3.1.2.2	Linker non scindibili	13
3.1.2.3	Linker innovativi	14
3.1.3	Payload	15
3.1.3.1	Induttori del danno al DNA	16
3.1.3.2	Inibitori del fuso mitotico	18
3.1.3.3	Payload innovativi	20
3.2	Sviluppo degli ADC	22
3.2.1	Selezione dell'antigene associato al tumore	22
3.2.1.1	TAA degli ADC attualmente approvati	23
3.2.1.2	TAA degli ADC in via di sviluppo	25
3.2.1.3	Nuovi potenziali target all'interno del TME	26
3.2.2	Sviluppo dell'anticorpo monoclonale	27
3.2.2.1	Sviluppo di mAb chimerici	28
3.2.2.2	Sviluppo di mAb umanizzati	28

3.2.2.3	Sviluppo di mAb umani	29
3.2.3	Coniugazione farmaco-anticorpo	31
3.2.3.1	Coniugazione stocastica	32
3.2.3.2	Coniugazione sito-specifica	33
3.2.4	Generazioni di ADC	34
3.2.4.1	ADC di prima generazione	34
3.2.4.2	ADC di seconda generazione	35
3.2.4.3	ADC di terza generazione	36
4	Farmacologia degli ADCs	38
4.1	Meccanismo d'azione	38
4.1.1	Funzioni effettrici dell'IgG	38
4.1.2	Azione citotossica del payload	40
4.1.2.1	Internalizzazione del complesso ADC/TAA e rilascio del payload	41
4.1.2.2	Riciclo dell'ADC mediato dal recettore Fc neonatale	41
4.1.2.3	Bystander effect	42
4.2	Meccanismi di resistenza agli ADC	43
4.2.1	Resistenza associata al TAA	43
4.2.2	Resistenza associata alle vie di internalizzazione del complesso ADC/TAA	44
4.2.3	Resistenza associata al payload	44
4.3	Profilo farmacocinetico	45
4.3.1	Assorbimento	45
4.3.2	Distribuzione	46
4.3.3	Metabolismo ed escrezione	47

4.4	Usi terapeutici	48
4.4.1	Indicazioni terapeutiche degli ADC attualmente approvati	48
4.4.1.1	Indicazioni terapeutiche nelle neoplasie ematologiche	49
4.4.1.2	Indicazioni terapeutiche nelle neoplasie solide	50
4.4.2	Applicazioni non oncologiche degli ADC	52
4.5	Effetti indesiderati	53
4.5.1	Tossicità off-target	53
4.5.1.1	Meccanismi di tossicità off-target	54
4.5.2	Tossicità on-target	55
5	Sacituzumab govitecan	57
5.1	Carcinoma mammario TNBC	57
5.1.1	Trattamento farmacologico del TNBC in fase precoce	58
5.1.2	Trattamento farmacologico del TNBC in fase avanzata	58
5.2	Target terapeutico e struttura del sacituzumab govitecan	60
5.2.1	Trophoblast Cell Surface Antigen 2	60
5.2.2	Struttura del sacituzumab govitecan	61
5.3	Farmacologia del sacituzumab govitecan	62
5.3.1	Meccanismo d'azione	62
5.3.2	Efficacia e sicurezza clinica nel TNBC: lo studio ASCENT	63
5.3.2.1	Disegno dello studio	63
5.3.2.2	Risultati di efficacia nella popolazione BMNeg	66
5.3.2.3	Risultati di efficacia nella popolazione complessiva	67
5.3.2.4	Risultati relativi al profilo di sicurezza	68

5.3.2.5	Discussione sui risultati dello studio	69
6	Conclusioni e sviluppi futuri	70
7	Bibliografia	71
8	Sitografia	78

2 Introduzione

Agli inizi del Novecento, il microbiologo tedesco Paul Ehrlich, nel gettare le basi della chemioterapia moderna, aveva enunciato il concetto di “proiettile magico” (*magic bullet*) secondo il quale un farmaco citotossico ideale avrebbe dovuto colpire selettivamente le cellule patologiche (dunque anche quelle tumorali) risparmiando quelle sane (1) (2). Tale principio, però, fu in buona parte disatteso già a partire dalla prima classe di farmaci antineoplastici ad essere stata scoperta, le mostarde azotate, una classe di agenti alchilanti. Tali farmaci, infatti, sviluppati negli anni '40 del secolo scorso in seguito alla scoperta dell'iprite (un gas vescicante impiegato a scopo bellico durante la Seconda Guerra Mondiale), determinavano mielotossicità. Similmente, anche le altre classi di antineoplastici, scoperte e sintetizzate successivamente e che, insieme alle mostarde azotate, costituiscono ancora oggi un pilastro della cosiddetta chemioterapia classica, si caratterizzano per il basso indice terapeutico, dunque per un limitato successo nella pratica clinica (3) (1).

Tuttavia, la ricerca della selettività ideale enunciata da Ehrlich ha, sin dagli esordi, continuato a guidare l'evoluzione delle farmacoterapie, soprattutto nell'ambito delle malattie oncologiche, raggiungendo un compimento a partire dagli inizi degli anni '80. In tale epoca, infatti, si cominciò a identificare e caratterizzare le vie di segnalazione molecolari e le mutazioni geniche alla base della trasformazione neoplastica, gettando le basi per la nascita delle terapie citotossiche mirate (*target therapy*). A differenza della chemioterapia classica, che induce la morte di tutte le cellule in rapida proliferazione, la terapia mirata nasce per garantire una maggiore selettività verso il tessuto neoplastico, e quindi una minore tossicità *off-target*. Ciò è possibile grazie all'azione su specifici enzimi o recettori sovraespressi o costitutivamente attivi nelle cellule tumorali. A tal proposito, una delle strategie più efficaci nel colpire selettivamente questi bersagli si è rivelata essere la progettazione di anticorpi monoclonali specifici per il target di interesse (3) (4).

Tuttavia, a fronte di un vantaggio di selettività, gli anticorpi monoclonali hanno spesso mostrato un minore effetto citotossico al confronto con i farmaci chemioterapici classici, risultando meno efficaci nell'indurre la morte delle cellule tumorali (1) (5).

Nel 2000, l'approvazione da parte di FDA del primo anticorpo farmaco-coniugato, il gemtuzumab ozogamicin, fa emergere una nuova classe farmacologica capace di impersonare, ad un nuovo livello, il concetto di "proiettile magico" enunciato da Ehrlich (6).

Gli anticorpi farmaco-coniugati (ADCs, *Antibody-Drug Conjugates*), infatti, sono molecole complesse composte da un anticorpo monoclonale (mAb) diretto contro uno specifico antigene di superficie della cellula tumorale, coniugato, mediante un *linker*, a una piccola molecola citotossica definita *payload*. L'antigene, espresso esclusivamente o prevalentemente dalle cellule neoplastiche, consente all'ADC di essere internalizzato e di rilasciare il *payload* principalmente in queste cellule. Ciò si traduce in un'elevata selettività e, di conseguenza, in una ridotta tossicità *off-target*. Pertanto, a differenza di un classico anticorpo monoclonale, l'ADC ha un potente effetto citotossico mediato dal *payload* (1).

Con gli ADC inizia dunque una nuova era della terapia mirata, in cui al targeting di precisione, utile a migliorare l'indice terapeutico rispetto alla chemioterapia convenzionale, si associa un'elevata efficacia nell'indurre la morte delle cellule tumorali (1).

Lo scopo di questa tesi è quello di fornire una trattazione aggiornata sugli ADC, oggi considerati farmaci promettenti e di successo nella terapia antineoplastica. A tale scopo verranno analizzate approfonditamente le varie componenti strutturali di un ADC e le opzioni tecnologiche per la coniugazione del mAb al *payload*.

Successivamente saranno discussi gli aspetti generali di farmacodinamica, farmacocinetica, effetti avversi e meccanismi di resistenza comuni agli ADC.

Infine, verrà trattato nel dettaglio il farmaco sacituzumab govitecan, primo ADC anti-TROP2 (*Trophoblast Cell Surface Antigen 2*) ad essere stato approvato dalla autorità regolatoria europea e statunitense, che rappresenta sia un'innovazione tecnologica nello sviluppo degli ADC che una svolta clinica nel trattamento del carcinoma mammario triplo negativo (TNBC, *Triple-negative Breast Cancer*) (7).

3 Struttura degli ADCs e opzioni tecnologiche

3.1 Struttura di un ADC

Un ADC è costituito da un mAb coniugato, mediante un *linker*, a una piccola molecola citotossica definita *payload*.

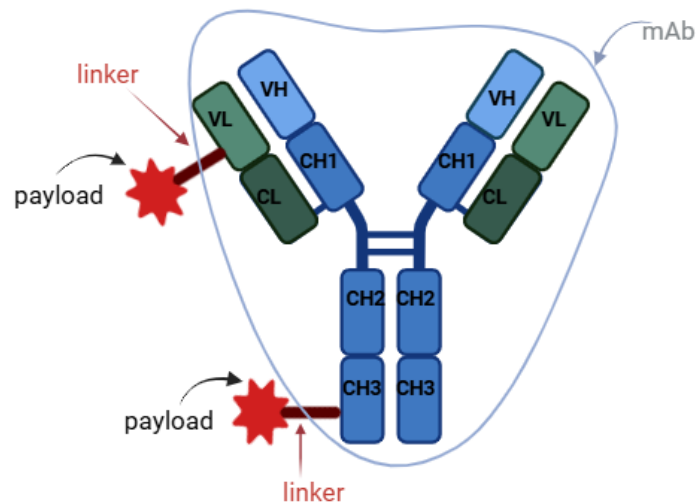


Figura 1. Struttura di un ADC. Creata con BioRender.

3.1.1 Struttura anticorpale

Un'immunoglobulina (Ig, *Immunoglobulin*) è una glicoproteina con un peso molecolare di circa 150 kDa, la cui struttura a forma di Y è composta da due catene polipeptidiche leggere ("L", in verde, *Figura 2*) e da due catene polipeptidiche pesanti ("H", in blu, *Figura 2*). Sia le catene leggere che quelle pesanti sono costituite da domini costanti e da domini variabili; ogni catena pesante è formata da un dominio variabile (VH) e da tre domini costanti (CH₁, CH₂, CH₃), mentre ogni catena leggera è formata da un dominio costante (CL) e da un dominio variabile (VL) (8). Nell'Ig si distinguono due regioni fondamentali per le sue funzioni effettrici: il frammento legante l'antigene (Fab, *Antigen-binding fragment*), composto essenzialmente dalle regioni variabili delle catene leggere e pesanti, e il frammento cristallizzabile (Fc, *Crystallizable fragment*), composto dai domini costanti (*Figura 2*). Le catene polipeptidiche leggere e pesanti sono connesse tra loro da ponti disolfuro e da legami non covalenti. All'interno di ogni

catena pesante si identifica una catena polipeptidica che connette le regioni Fab alla regione Fc, andando a costituire la cosiddetta regione a cerniera (*Figura 2*) che conferisce una certa flessibilità all'Ig (7).

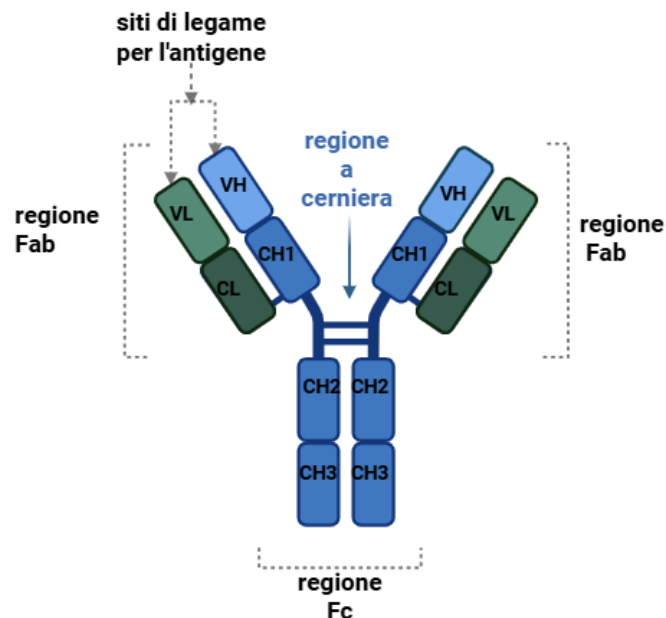


Figura 2. Struttura di una immunoglobulina. Creata con BioRender

3.1.1.1 Frammento legante l'antigene

Ogni Ig possiede due Fabs formati da VH, CH₁, VL e CL (*Figura 2*) (8). L'isotipo IgG, che rappresenta la classe di immunoglobuline utilizzata negli ADCs, possiede, sui domini VH e VL, dei siti di glicosilazione che aumentano l'affinità dell'anticorpo per l'antigene (9). Attraverso i Fab, il mAb riconosce l'antigene di superficie associato al tumore (TAA, *Tumor-associated Antigen*) e lo lega. Questo legame porta all'internalizzazione dell'anticorpo e con esso, del farmaco coniugato, mediante endocitosi. È importante che l'affinità tra i Fabs e il TAA sia tale da garantire una rapida internalizzazione dell'ADC nella cellula e al contempo un'omogenea distribuzione in tutto il tessuto tumorale, anche quello più lontano dai vasi sanguigni. Tuttavia, a influenzare la penetrazione dell'ADC nei tumori solidi concorrono anche le dimensioni dell'anticorpo stesso (5).

3.1.1.2 Frammento cristallizzabile

L'Fc dell'anticorpo è formato da due segmenti CH₂ e CH₃ (*Figura 2*). L'isotipo IgG possiede, sul dominio CH₂, una glicosilazione in posizione Asn297. Questa modifica post-traduzionale è importante per la stabilità dell'Ig e per il legame ai recettori Fc (FcRs, *Fc Receptors*) e alla proteina C1q del complemento (8) (10) (9). Gli FcR costituiscono una famiglia di recettori in grado di riconoscere gli anticorpi attraverso la loro porzione Fc. Nel caso specifico delle IgG, gli FcR si dividono in recettori Fc di tipo gamma (Fc γ R, *Fc gamma receptors*) e recettore Fc neonatale (FcRn, *Neonatal Fc receptor*).

Gli Fc γ R sono recettori di membrana e comprendono l'Fc γ RI, l'Fc γ RIIa, l'Fc γ RIIIa, espressi da monociti, macrofagi e cellule natural killer. Una volta ingaggiato il corrispettivo Fc anticorpale, questi recettori attivano i meccanismi di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*) e di fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente (ADCP, *Antibody-dependent cellular phagocytosis*). L'attivazione di tali meccanismi nel tessuto tumorale contribuisce all'efficacia dell'ADC nell'indurre la morte della cellula tumorale (5) (11). Tuttavia, il legame di Fc agli Fc γ R espressi dalle cellule del sistema immunitario circolanti può determinare sequestro dell'ADC, causando tossicità *off-target* e riducendo la concentrazione di farmaco che raggiunge il tessuto bersaglio (11).

Un altro effetto che può contribuire all'efficacia dell'ADC è il *bystander effect*, che prevede l'uccisione, all'interno del tessuto tumorale, delle cellule tumorali che non esprimono il TAA per cui l'ADC è stato progettato. Studi preclinici hanno dimostrato che, in seguito all'interazione di Fc con gli Fc γ R espressi dai macrofagi associati al tumore (TAMs, *Tumor-Associated Macrophages*), l'ADC viene internalizzato e processato da queste cellule, e il *payload* rilasciato può diffondere andando ad agire sulle cellule cancerose all'interno del microambiente tumorale (TME, *Tumor Microenvironment*) (11) (12).

L'ultima funzione effettrice che l'anticorpo può esercitare tramite il suo Fc è il meccanismo di citotossicità dipendente dal complemento (CDC, *Complement-*

dependent cytotoxicity), che si verifica in seguito al legame con la proteina C1q della cascata del complemento (12).

L'IgG presenta sul proprio Fc un sito di legame per un altro FcR, diverso dagli Fc γ R classici per localizzazione, struttura e funzioni mediate: si tratta del recettore FcRn. Questo recettore è espresso a livello dell'epitelio placentare, intestinale, renale ed epatico, dell'endotelio vasale e da cellule di origine ematopoietica, quali monociti, macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche e linfociti B. Le cellule che esprimono FcRn sono in grado di legare l'IgG ed esercitare due funzioni principali: il riciclo e la transitosi dell'anticorpo. La transitosi permette all'IgG di attraversare diversi strati cellulari, come la barriera placentare. Il riciclo, invece, consiste nel rilascio dell'anticorpo in circolo dopo la sua internalizzazione per pinocitosi; questo meccanismo protegge l'IgG dalla degradazione lisosomiale e ne prolunga l'emivita plasmatica. Tale processo avviene nelle cellule endoteliali tramite l'interazione Fc/FcRn e influisce sull'efficacia terapeutica degli ADC, soprattutto in termini di farmacocinetica (5) (10).

3.1.1.3 Isotipo IgG e sottoclassi negli ADCs

IgG rappresenta l'isotipo più comunemente impiegato per la produzione degli ADC. Esso si divide in quattro sottoclassi, denominate IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, che differiscono per solubilità, emivita plasmatica e interazione con C1q e Fc γ R (12).

Quasi tutti gli ADCs approvati finora, così come quelli attualmente in sperimentazione clinica, presentano l'isotipo IgG1, caratterizzato da un'emivita plasmatica di circa 21 giorni, elevata solubilità e alta affinità per C1q e Fc γ R, conferendo quindi una notevole capacità di attivare le funzioni effettrici CDC, ADCC e ADCP (11).

Anche l'isotipo IgG4 è stato usato per la produzione degli ADC, ma, a differenza di IgG1, ha una minore capacità di attivare il sistema immunitario tramite la regione Fc; pertanto, viene scelto quando non si ricerca il coinvolgimento dei meccanismi CDC, ADCC e ADCP (11).

IgG2 condivide caratteristiche simili a IgG4, ma ad oggi non esistono ADC basati su questo isotipo (11).

Infine, l'isotipo IgG3 possiede, come IgG1, un'elevata capacità di attivare le funzioni effettrici CDC, ADCC e ADCP, ma presenta un'emivita plasmatica molto più breve, di circa 7 giorni, motivo per cui attualmente non viene impiegato nella produzione di ADC (11).

3.1.1.4 ADC a struttura anticorpale ridotta

Per ovviare alla difficoltà di penetrazione degli ADC nei tumori solidi, dovuta alle loro dimensioni superiori a 150 kDa, e per ridurre l'internalizzazione e la tossicità *off-target* nelle cellule immunitarie circolanti, mediate dalla regione Fc, sono stati progettati coniugati di farmaci in formati di dimensioni inferiori e privi della regione Fc. Due esempi in via di sviluppo sono costituiti dai Fab e dai frammenti variabili a catena singola (scFv, *Single-chain variable Fragment*) (13).

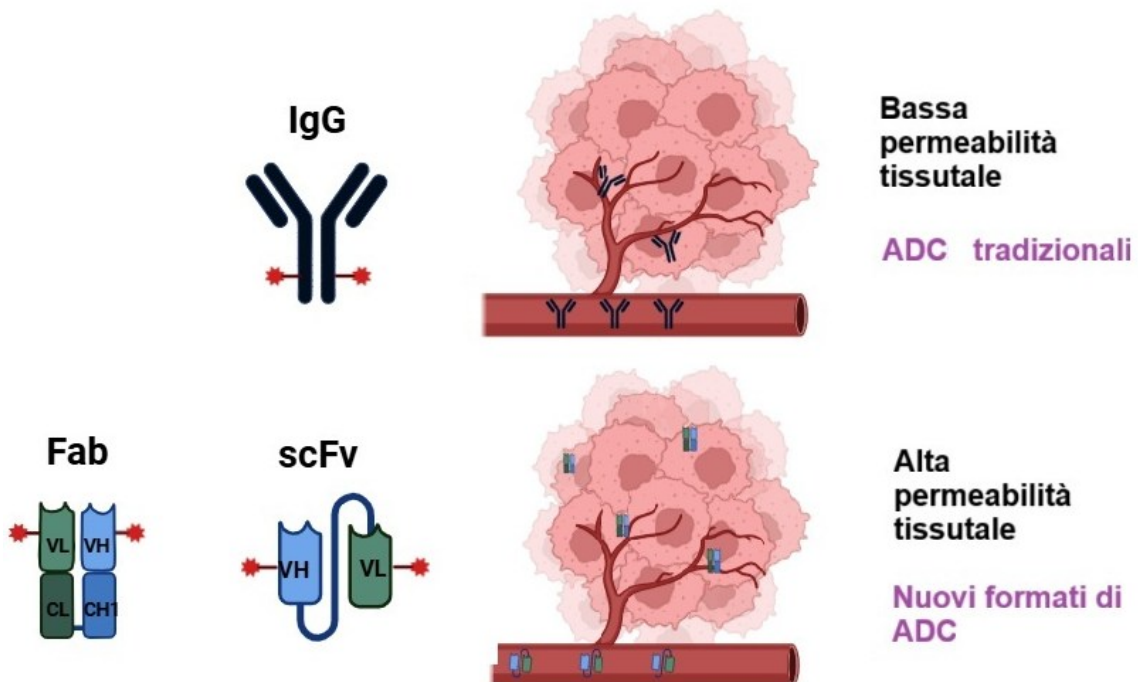


Figura 3. IgG, Fab e scFv coniugati con payload si distribuiscono diversamente all'interno del tumore solido. Creata con BioRender.

I Fab sono il prodotto della rimozione della regione Fc dall'Ig, quindi sono costituiti esclusivamente dai domini variabili e dai domini costanti della regione legante

l'antigene (*Figura 3*). Questa struttura anticorpale ridotta ha consentito di ottenere un frammento con peso molecolare di circa 50 kDa. I Fab coniugati a un *payload* prendono il nome di farmaci coniugati con Fab (*Fab-drug conjugates*) e un esempio è costituito da trastuzumab-MMAE (Fab), attualmente in sperimentazione pre-clinica (14) (15). Anche gli scFv sono privi della regione Fc, ma a differenza dei Fab consistono in un singolo polipeptide. Esso è dato dall'unione, tramite sequenze amminoacidiche di 15-20 unità, dei domini VH e VL, che coincidono con il sito di legame per l'antigene (*Figura 3*). Anche in questo caso il peso molecolare è inferiore alle IgG ed è di circa 30 kDa (8). Ad oggi un esempio di scFv applicato agli ADC è rappresentato da un scFv coniugato all'agente citotossico auristatina F, attualmente in sperimentazione preclinica (15).

Come prevedibile, la rimozione della regione Fc comporta una riduzione dell'emivita plasmatica del farmaco, dovuta alla perdita dell'interazione con il recettore FcRn (13).

3.1.1.5 Ingegnerizzazione della regione Fc

Per ridurre l'internalizzazione e la tossicità *off-target* degli ADCs nelle cellule immunitarie circolanti, mediate dalla regione Fc dell'anticorpo, è possibile ricorrere all'ingegnerizzazione di questo frammento senza doverlo rimuovere. L'ingegnerizzazione può consistere nell'introduzione di singole mutazioni puntiformi o multiple mutazioni su specifici residui amminoacidici, in grado di ridurre o aumentare l'affinità per gli Fc γ R e C1q, con il fine di definire a priori il grado di coinvolgimento dei meccanismi di ADCC, ADCP e CDC. Inoltre, opportune modifiche amminoacidiche sul sito di legame per FcRn possono determinare un aumento dell'emivita plasmatica dell'ADC.

Un'altra strategia di ingegnerizzazione applicata alla regione Fc è l'afucosilazione, cioè la rimozione di un fucosio presente nella struttura del glicano sul residuo amminoacidico Asn297. Questa modifica aumenta l'affinità dell'anticorpo per Fc γ RIII, incrementando le funzioni effettrici ADCC e ADCP. Tuttavia, è stato osservato che l'ingegnerizzazione di Fc può, in alcuni casi, alterare l'affinità della regione Fab per l'antigene (11) (15) (9).

3.1.2 Linker

La scelta del *linker* rappresenta un passaggio cruciale nella progettazione degli ADC. Il *linker* ideale deve consentire un rilascio efficiente del *payload* nel tessuto tumorale, garantendo al contempo la stabilità dell'ADC nella circolazione sistemica. Il rilascio prematuro dell'agente citotossico, infatti, comprometterebbe il funzionamento dell'ADC e aumenterebbe il rischio di tossicità *off-target*. Un'altra caratteristica fondamentale che il *linker* deve possedere è un'adeguata idrofilia, importante per ottenere un ADC idrosolubile. Una scarsa solubilità in acqua può determinare una breve emivita e la formazione di aggregati di ADC. Infine, la scelta del *linker* può influenzare il verificarsi del *bystander effect*, ovvero l'azione citotossica esercitata sulle cellule circostanti le cellule target, ma prive dell'antigene riconosciuto dall'ADC. È chiaro, quindi, come la selezione del *linker* possa incidere sull'efficacia, sul profilo di tossicità, sulla farmacocinetica e sulla farmacodinamica della terapia con ADC (5) (7) (16) (17).

I *linker* possono essere classificati in due categorie: *linker* scindibili e *linker* non scindibili.

3.1.2.1 Linker scindibili

I *linker* scindibili possiedono nella loro struttura chimica specifici gruppi funzionali che, all'interno delle cellule tumorali, vanno incontro a reazioni di idrolisi chimica, idrolisi enzimatica o ossidoriduzione. Questi processi rappresentano il meccanismo attraverso il quale il *linker* viene scisso, consentendo il rilascio controllato del *payload*. La scissione avviene preferenzialmente nelle cellule maligne sfruttando le differenze, tra il microambiente tumorale e la circolazione sistemica, in termini di pH o di espressione di specifici enzimi. Tra gli ADC approvati, i *linker* scindibili risultano essere i più utilizzati. Il motivo risiede nella loro capacità di determinare il cosiddetto *bystander effect*, in quanto il *payload* viene rilasciato in forma intatta. Questo aspetto, insieme ad un'opportuna lipofilia del farmaco, consente la sua diffusione verso le cellule tumorali adiacenti. Tuttavia, rispetto ai *linker* non scindibili, questa categoria può comportare un maggior rischio di tossicità *off-target* (5) (15) (16).

I *linker* scindibili, a loro volta, si dividono in due principali categorie; i *linker* a scissione chimica e i *linker* a scissione enzimatica:

- *Linker* a scissione chimica, che comprendono:
 - linker sensibili al pH. Un esempio è rappresentato dai linker contenenti il gruppo funzionale idrazone (*Figura 4*), che vengono idrolizzati in condizioni di pH acido, tipicamente comprese tra 4.8 e 6.2, come quelle presenti nei lisosomi e negli endosomi delle cellule tumorali. Occasionalmente, l'idrazone può subire idrolisi anche nel plasma, dove il pH è pari a 7.4; per questa ragione, il suo impiego risulta limitato (1).

Un esempio di ADC contenente un *linker* a base di idrazone è rappresentato dal primo ADC approvato dalla FDA, il gemtuzumab ozogamicin, diretto verso l'antigene CD33 altamente espresso dalle cellule di leucemia mieloide acuta. Esso fu ritirato dal commercio nel 2010 a causa di un'elevata tossicità *off-target*, attribuita proprio al *linker*, che determinava il rilascio prematuro del *payload* nella circolazione sistemica (5).

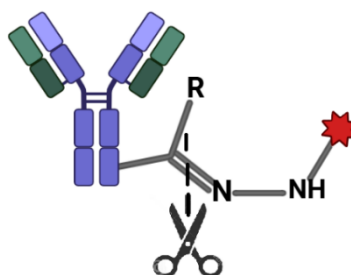


Figura 4. Gruppo idrazone. Creata con BioRender.

- *linker* sensibili al glutathione (GSH). Questi *linker* contengono un ponte disolfuro (*Figura 5*) che viene ridotto dal GSH, presente in elevate concentrazioni nel citoplasma delle cellule in rapida proliferazione, come quelle tumorali. Sfruttando questa differenza di concentrazione, il *linker* riducibile viene scisso prevalentemente nelle cellule tumorali, risultando più stabile rispetto ai *linker* a base di idrazone (7).

Un esempio di ADC contenente un *linker* sensibile al glutathione è il mirvetuximab soravtansine, un mAb anti-FR α (*Folate Receptor*

alpha), approvato dalla autorità regolatoria europea e statunitense per il carcinoma epiteliale dell'ovaio, della tuba di Falloppio e del peritoneo (5).

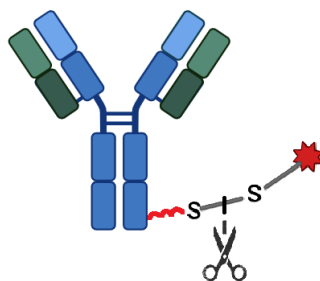


Figura 5. Gruppo disolfuro. Creata con BioRender.

- *Linker* a scissione enzimatica, comprendono:
 - *Linker* sensibili alla catepsina B. Questi *linker* sono di natura peptidica e generalmente contengono i dipeptidi valina-alanina, valina-citrullina o fenilalanina-lisina (Figura 6), che vengono riconosciuti e idrolizzati dalla catepsina B all'interno dei lisosomi delle cellule tumorali. La sovraespressione di questa idrolasi nelle cellule neoplastiche, insieme alla presenza di inibitori plasmatici delle proteasi, garantisce un rilascio selettivo del *payload* nel tessuto tumorale e un'elevata stabilità dell'ADC in circolo. Inoltre, la loro capacità di rilasciare rapidamente il farmaco citotossico dopo l'internalizzazione contribuisce a renderli tra i *linker* più utilizzati negli ADC. Il primo ADC approvato contenente un *linker* peptidico è stato il brentuximab vedotin, un anticorpo anti-CD30 impiegato nel trattamento del linfoma di Hodgkin e del linfoma non Hodgkin (1) (7).

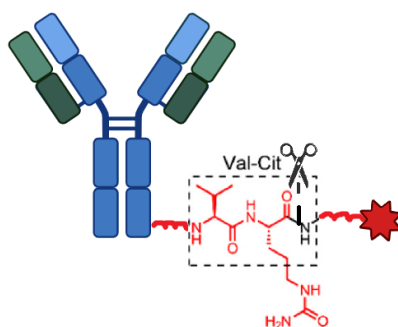


Figura 6. Dipeptide valina-citrullina. Adattata da (17).

- *Linker* sensibili alla β -glucuronidasi. Questi *linker* contengono nella loro struttura chimica una molecola di acido glucuronico (*Figura 7*), che conferisce suscettibilità all'idrolisi enzimatica da parte della β -glucuronidasi. Poiché la β -glucuronidasi è presente in concentrazioni più elevate nelle cellule neoplastiche, in particolare all'interno dei lisosomi, tale meccanismo garantisce un'elevata stabilità dell'ADC in circolo (1) (7).

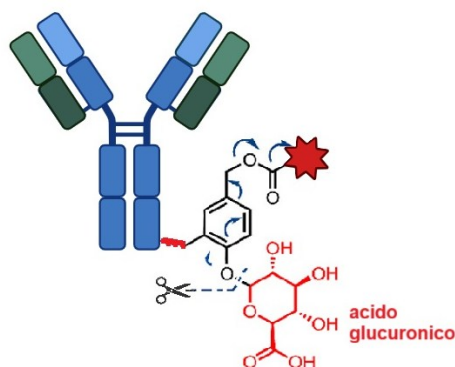


Figura 7. Linker a base di acido glucuronico. Adattata da (17).

3.1.2.2 Linker non scindibili

Rispetto ai *linker* scindibili, quelli non scindibili risultano insensibili al pH e alle altre reazioni di scissione precedentemente descritte; per tale ragione sono più stabili in circolo, determinando una minore tossicità *off-target* (1). In seguito all'internalizzazione nelle cellule tumorali, la componente anticorpale dell'ADC viene degradata nei lisosomi; le proteasi lisosomiali riducono il mAb ad amminoacidi, determinando così il rilascio del *payload* e del *linker*.

Negli ADC con un *linker* non scindibile, la velocità di rilascio dell'agente citotossico è inferiore rispetto a quella osservata nei *linker* scindibili, poiché avviene soltanto dopo la completa degradazione del mAb (5) (7). Inoltre, questo meccanismo di rilascio genera un *payload* legato a residui amminoacidi che ne impediscono la diffusione attraverso la membrana plasmatica; di conseguenza, il *bystander effect* non è realizzabile con questa categoria di *linker*.

Alcuni esempi di *linker* non scindibili includono il tioetere (*Figura 8*), il maleimidocaproile (MC; *Figura 8*) e il succinimidil 4-(N-maleimidometil)cicloesano-1-carbossilato (SMCC) (16).

Il trastuzumab emtansine, il primo ADC approvato dalla FDA per un tumore solido, il carcinoma mammario HER2+ (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), contiene proprio il *linker* SMCC (5).

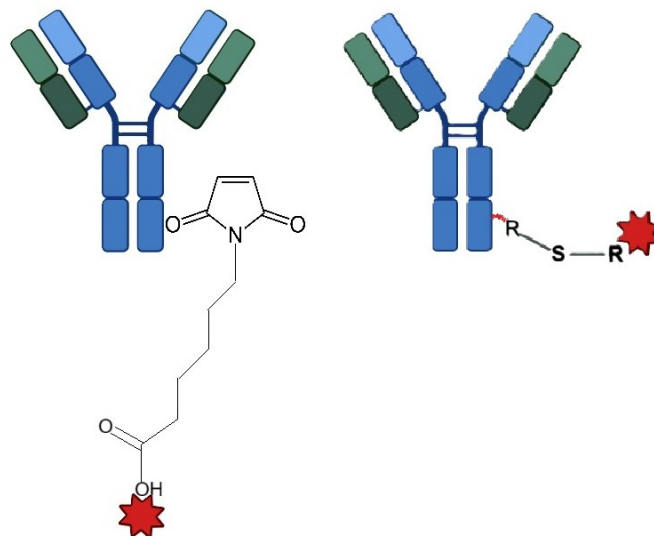


Figura 8. A sinistra il linker maleimidocaproile, a destra il linker tioetere. Creata con BioRender.

3.1.2.3 Linker innovativi

I *linker* precedentemente descritti sono quelli attualmente in uso negli ADC presenti in commercio. Esistono però dei *linker* di ultima generazione, progettati per superare alcuni dei limiti tipici dei *linker* già in uso. Tra questi, vi sono quelli a base di fosfato, che comprendono i monofosfati, i difosfati e i trifosfati. Si tratta di *linker* scindibili che, rispetto agli altri di questa stessa categoria, sono caratterizzati da una maggiore stabilità in circolo e da un'elevata idrofilia. Quest'ultima determina un'emivita plasmatica più lunga, un minor rischio di formazione di aggregati di ADC e la possibilità di coniugare al mAb un *payload* dotato di un'elevata lipofilia. Il rilascio del *payload*, che probabilmente avviene mediante l'azione delle fosfatasi, è più rapido per i pirofosfati e i trifosfati diesteri, rispetto ai monofosfati (7) (17).

I *linker* scindibili fotoresponsivi costituiscono un'altra categoria di *linker* innovativi, caratterizzati da un rilascio del *payload* rapido e selettivo nel tessuto tumorale. La selettività per il tessuto tumorale è resa possibile tramite l'irradiazione, sito-specifica, con luce del vicino infrarosso (NIR, lunghezza d'onda compresa tra 650

e 900 nm) o luce ultravioletta (UV, lunghezza d'onda pari a 365 nm). Ciò determina una minore tossicità *off-target* rispetto ai *linker* scindibili di comune impiego. Tuttavia, la formazione di aggregati di ADC e l'instabilità alla luce naturale, rappresentano dei limiti nell'applicazione dei *linker* scindibili con luce NIR. Nonostante la minore foto-instabilità dei *linker* scindibili con luce UV, anche questi presentano alcune problematiche connesse alle radiazioni UV, che comportano un aumento dello stress ossidativo nelle cellule irradiate e la scarsa capacità di raggiungere un tessuto in profondità (17).

Sulla base del riscontro di elevati livelli di ioni ferro nel microambiente tumorale, è stato proposto di utilizzare un *linker* scindibile, l'1,2,4-triossolano (TRX), che, grazie alla sua struttura chimica, può rilasciare il *payload* a seguito di una reazione di Fenton (15) (17).

Infine, per superare i limiti di stabilità ed idrofilia che caratterizzano il *linker* SMCC, è stato progettato un analogo strutturale, anch'esso non scindibile, ossia il 2-(maleimidometil)-1,3-diossano (MD (15) (17).

3.1.3 Payload

Il *payload* influisce sull'efficacia terapeutica e sul profilo di sicurezza degli ADC, pertanto, la sua scelta deve tenere conto di determinate caratteristiche.

Innanzitutto, occorre selezionare un agente citotossico con un valore di IC₅₀ (concentrazione inibente 50) molto basso, nell'ordine del nanomolare o picomolare, e quindi dotato di un'elevata potenza. Questa necessità deriva dal fatto che la bassa permeabilità tissutale degli ADC, il ridotto numero di TAA di superficie e la scarsa attività di internalizzazione dell'ADC fanno sì che solo una minima percentuale della dose somministrata riesca a raggiungere il citosol delle cellule tumorali. Ne consegue che la maggior parte dei chemioterapici classici, caratterizzati da una potenza inferiore, risulta inadeguata ad essere impiegata come *payload* (1) (16) (17).

La seconda caratteristica che il *payload* deve possedere è un'elevata stabilità sia nella circolazione sistemica, dove l'ADC può permanere a lungo, sia all'interno

dei lisosomi delle cellule target, sede del suo rilascio. L'instabilità nel plasma o a pH acido dei lisosomi ne causerebbe la degradazione e, di conseguenza, una riduzione dell'efficacia terapeutica (17).

È inoltre fondamentale che il *payload* sia sufficientemente idrofilo per risultare solubile nei fluidi acquosi e al contempo abbastanza lipofilo da attraversare le membrane biologiche. La solubilità in acqua è necessaria sia per facilitare il processo di coniugazione, sia per ridurre il rischio di aggregazione e precipitazione degli ADC in circolo, fenomeni che possono indurre immunogenicità e alterare i parametri farmacocinetici (18) (19). La lipofilia, invece, influisce sulla capacità del *payload* di attraversare le membrane cellulari e di determinare il *bystander effect* (17).

Infine, l'agente citotossico deve essere una molecola dotata di gruppi funzionali disponibili per il processo di coniugazione (20).

Tenendo conto di queste caratteristiche, gli agenti citotossici impiegati come *payload* negli ADC approvati e in quelli in fase avanzata di sperimentazione clinica, appartengono a due categorie: gli induttori del danno al DNA e gli inibitori del fuso mitotico (20).

3.1.3.1 Induttori del danno al DNA

Gli induttori del danno al DNA comprendono diverse classi di agenti citotossici in grado di agire in ogni fase del ciclo cellulare. Rispetto agli inibitori del fuso mitotico, sono dotati di una potenza maggiore, con un valore di IC₅₀ fino all'ordine del picomolare, e consentono la realizzazione del *bystander effect* (1).

I meccanismi d'azione con cui questi farmaci inducono danno al DNA comprendono:

- Rottura a doppio filamento del DNA
- Alchilazione del DNA
- Inibizione della topoisomerasi-1 (TOPO-1)

Le enediyne sono agenti citotossici isolati da vari ceppi batterici, tra cui *Streptomyces*, che, legandosi al solco minore del DNA, ne provocano la rottura a doppio filamento, portando così a morte cellulare. Grazie al loro basso peso molecolare e alla loro elevata potenza (IC₅₀ compreso tra 0.1 e 1 nM) sono ottimi agenti citotossici da impiegare come *payload* negli ADC. La **calicheamicina-γ1**, appartenente alla classe delle enediyne, nella sua forma N-acetilata costituisce il *payload* di due ADC attualmente in commercio, il gemtuzumab ozogamicin e l'inotuzumab ozogamicin (1) (17) (21).

Le duocarmicine sono agenti citotossici isolati da colture di *Streptomyces* e dotati di elevata potenza (IC₅₀ compreso tra 1 e 10 pM). Esse si legano al solco minore del DNA e alchilano l'azoto in posizione 3 dell'adenina (1). Il trastuzumab duocarmazine, un ADC che ha concluso la fase III di sperimentazione clinica, è stato sviluppato per il trattamento del carcinoma della mammella HER2+/HER2-low e incorpora il *payload* **seco-DUBA**, un derivato delle duocarmicine (5).

Le **pirrolobenzodiazepine (PBD)** costituiscono un'altra classe di agenti citotossici isolati da colture di *Streptomyces*, anch'essi caratterizzati da elevata potenza (IC₅₀ compreso tra 0.1 e 1 pM) e in grado di alchilare il DNA. Nello specifico le PBD si legano al solco minore della doppia elica alchilando l'azoto in posizione 2 della guanina e inducendo la formazione di legami crociati tra i due filamenti opposti del DNA. Le PBD sono generalmente utilizzate come *payload* in forma di dimeri. Un esempio è rappresentato dal loncastuximab tesirine, ADC approvato dalla FDA e dall'EMA per il trattamento del linfoma diffuso a grandi cellule B recidivante e refrattario (1) (17) (21).

Gli inibitori della TOPO-1 impiegati come *payload* negli ADC comprendono i derivati della camptotecina, un agente citotossico di origine vegetale isolato dalla *Camptotheca acuminata*. Tali derivati consistono in SN-38, exatecan e Dxd, i quali, legando la TOPO-1, impediscono la trascrizione del DNA e, durante la fase S del ciclo cellulare, la sua replicazione, conducendo a morte cellulare (5) (21).

SN-38, il metabolita attivo di irinotecan, costituisce il *payload* del sacituzumab govitecan, il primo ADC anti-TROP-2 approvato nel 2020 dalla FDA e nel 2021

dall'EMA per il trattamento del TNBC metastatico. **Dxd** è un derivato di exatecan, presente nel trastuzumab deruxtecan, ADC anti-HER2 approvato dalla autorità regolatoria europea e statunitense per il trattamento del carcinoma della mammella, del polmone “non a piccole cellule” e gastrico, HER2+. Dxd è presente anche in diversi ADC in fase avanzata di sperimentazione clinica (5).

3.1.3.2 Inibitori del fuso mitotico

Il fuso mitotico rappresenta una struttura citoscheletrica essenziale per lo svolgimento della mitosi. Esso è formato dai microtubuli, polimeri di α e β tubulina che, durante la fase M del ciclo cellulare, vanno incontro prima a una fase di polimerizzazione e successivamente a una fase di depolimerizzazione. Gli inibitori del fuso mitotico interferiscono con questa dinamicità dei microtubuli, impedendo il superamento del *checkpoint* di fase M e conducendo quindi la cellula tumorale ad apoptosi. Ne consegue che, a differenza degli induttori del danno al DNA, questi agenti non sono in grado di agire in ogni fase del ciclo cellulare, ma soltanto in fase G2/M (17).

Gli inibitori del fuso mitotico, sia quelli impiegati negli ADC approvati sia in quelli in fase avanzata di sperimentazione clinica, appartengono a due principali famiglie:

- **Maytansinoidi.** Si tratta di composti derivati dalla maytansina aventi un'IC₅₀ compresa tra 0.05 e 0.1 nM. La maytansina, isolata per la prima volta dalla corteccia di *Maytenus ovatus*, agisce da inibitore del fuso mitotico poiché, legandosi alla β tubulina, impedisce la formazione degli eterodimeri di α , β tubulina ostacolando quindi la fase di polimerizzazione dei microtubuli. La maytansina non può essere impiegata direttamente come *payload* poiché è priva di gruppi funzionali idonei al processo di coniugazione. Negli ADC sono quindi utilizzati i suoi derivati **DM1** e **DM4**, i quali, grazie alla presenza di un atomo di zolfo nella loro struttura chimica, sono in grado di formare un legame disolfuro con il *linker* (1) (16) (17). Un esempio di ADC contenente un maytansinoide come *payload* è rappresentato dal trastuzumab emtansine, che incorpora DM1 (5).

- Auristatine. Esse consistono in derivati sintetici della dolastatina 10, un agente citotossico isolato da un mollusco marino. A causa di una scarsa solubilità in acqua e di un'inefficienza nel processo di coniugazione, essa non è impiegabile direttamente come *payload*. I derivati monometil auristatina E (**MMAE**) e monometil auristatina F (**MMAF**) sono stati sintetizzati per superare questi limiti (17) (21). Questi inibitori della polimerizzazione dei microtubuli, dotati di un valore di IC₅₀ compreso tra 0.05 e 0.1 nM, sono presenti in numerosi ADC in commercio e in fase avanzata di sperimentazione clinica. Esempio ne è brentuximab vedotin, primo ADC approvato dalla FDA e dall'EMA ad incorporare come *payload* un'auristatina, nello specifico MMAE (1).

Oltre agli inibitori del fuso mitotico di uso consolidato, negli ADC attualmente in sperimentazione clinica sono stati impiegati altri agenti citotossici con meccanismo d'azione analogo, quali l'eribulina e le tubulisine.

Eribulina è un analogo sintetico dell'alicondrina B, un inibitore della polimerizzazione dei microtubuli isolato da *Halichondria okadai*, una spugna marina (17). Un esempio di ADC che incorpora l'eribulina come *payload* è rappresentato dal farletuzumab ecteribulin, un ADC anti-FR α attualmente in fase II di sperimentazione clinica per valutarne l'efficacia in pazienti affetti da TNBC, carcinoma del polmone "non a piccole cellule", carcinoma dell'ovario e carcinoma dell'endometrio (6) (22).

Le **tubulisine** rappresentano un'altra classe di inibitori del fuso mitotico, interessanti per l'elevata potenza e per l'efficacia nei confronti delle cellule tumorali affette da resistenza multifarmaco (23). Si tratta di una famiglia di tetrapeptidi isolati dai batteri *Archangium gephyra* e *Angiococcus disciformis*, in grado di inibire il processo di polimerizzazione dei microtubuli (17) (21). Un esempio di ADC avente come *payload* una tubulisina è costituito dal DX126-262, un ADC anti-HER2 indicato per il carcinoma della mammella HER2⁺, attualmente in fase II di sperimentazione clinica. Questo ADC usa come *payload* Tub114, un analogo più idrosolubile della tubulisina B (6) (23).

3.1.3.3 Payload innovativi

I *payload* precedentemente descritti rappresentano quelli più utilizzati negli ADC attualmente in commercio o in fase avanzata di sperimentazione clinica. Tuttavia, tali composti presentano alcuni limiti, quali lo sviluppo da parte del tumore di meccanismi di resistenza, la comparsa di effetti avversi (talvolta comparabili con quelli degli stessi *payload* impiegati come molecole libere) e la scarsa efficacia verso determinati tipi di tumori (17). Al fine di migliorare l'efficacia e la sicurezza degli ADC, sono stati sviluppati *payload* con meccanismi d'azione differenti rispetto a quelli degli agenti citotossici di comune impiego. Tra questi, quelli più promettenti comprendono molecole immunostimolanti, tossine batteriche, degradatori proteici mirati e radionuclidi (24).

Le molecole immunostimolanti impiegate come *payload* comprendono gli agonisti dei **Toll-like receptor** (TLR), nello specifico gli agonisti di TLR7, TLR8 e TLR9, e gli agonisti dello **Stimulator of Interferon Genes** (STING). I TLR citati e gli STING appartengono alla famiglia dei *Pattern Recognition Receptors* (PRR), localizzati rispettivamente negli endosomi e nel reticolo endoplasmatico delle cellule dell'immunità innata. Si tratta di recettori che, se stimolati, conducono all'attivazione delle *Antigen-Presenting Cells* (APCs) e al reclutamento dei linfociti T citotossici. Pertanto, veicolando questi agonisti mediante anticorpi specifici per un antigene tumorale, è possibile stimolare una risposta immunitaria antitumorale all'interno del TME. Questi coniugati, denominati *Immune-stimulating antibody conjugates* (ISACs o iADCs), legano lo specifico antigene di superficie della cellula tumorale e, una volta formato il complesso ISAC-antigene, vengono internalizzati dalle APC tramite endocitosi mediata da Fc γ R. Ad oggi, diversi ISAC che veicolano sia agonisti dei TLR, sia agonisti di STING, sono in fase di sperimentazione preclinica e clinica di fase I/II. Nonostante l'efficacia antitumorale dimostrata sia in studi *in vitro* che *in vivo*, tali molecole sono accomunate da una significativa tossicità sistemica, tra cui la sindrome da rilascio di citochine, che ne complica l'impiego nell'uomo (6) (24).

Tossine batteriche, quali la **tossina difterica (DT)** e l'**esotossina A di *Pseudomonas aeruginosa* (PEA)**, rappresentano altri *payload* innovativi impiegabili negli ADC, dando luogo a coniugati denominati immunotossine.

DT e PEA sono molecole di natura proteica dotate di una tossicità non compatibile con la somministrazione sistemica, poiché determinano la morte delle cellule bersaglio per l'interferenza con la sintesi proteica e l'attivazione di proteine pro-apoptotiche. Viceversa, un loro rilascio selettivo all'interno delle cellule tumorali, allorché inserite in un ADC, si caratterizza per un'elevata efficacia nell'indurre la morte solo di queste cellule. Un esempio di immunotossina di questo tipo è moxetumomab pasudotox, un ADC anti-CD22 che incorpora la tossina batterica PE38, una forma tronca di PEA, approvata dalla autorità regolatoria europea e statunitense per i pazienti adulti affetti da leucemia a cellule capellute recidivante o refrattaria. Attualmente moxetumomab pasudotox è stato ritirato dal mercato europeo e statunitense su richiesta dell'azienda produttrice per ragioni commerciali (5) (24) (25).

Un'altra tossina studiata come *payload* è l' **α -amanitina**, un optapeptide ciclico isolato dal fungo *Amanita phalloides*. Si tratta di un inibitore dell'RNA polimerasi I e II che, bloccando la trascrizione del DNA e quindi la sintesi proteica, induce apoptosi. Agendo sia sulle cellule in attiva proliferazione sia su quelle quiescenti, questa tossina risulta particolarmente interessante per l'impiego in ADC destinati a tumori resistenti e recidivanti (5) (24).

Un'altra famiglia di *payload* innovativi è rappresentata dalle ***Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs)***, molecole bifunzionali costituite da una porzione legante le ligasi E3 (enzimi responsabili del riconoscimento specifico del substrato a cui vengono agganciate le molecole di ubiquitina) e da una porzione legante una proteina di interesse. La veicolazione di una PROTAC mediante un ADC consente il rilascio di tale degradatore proteico specificatamente nelle cellule tumorali, inducendo così la degradazione via proteasoma della proteina intracellulare oncogenica di interesse. Tali ADC, denominati ***Degrader-Antibody Conjugate (DAC)***, mostrano una selettività superiore rispetto agli ADC tradizionali

in quanto alla specificità del mAb si aggiunge quella del *payload* nei confronti della proteina bersaglio (24).

Infine, una famiglia di *payload* in rapida espansione è costituita dai **radionuclidi**, isotopi radioattivi che, mediante l'emissione di particelle α , β o γ , inducono danno al DNA portando a morte cellulare. Gli ADC che veicolano questi *payload*, denominati radioimmunoconiugati, consentono non solo di realizzare una radioterapia mirata a livello cellulare, ma anche di mappare le cellule tumorali mediante scintigrafia. Tra i radionuclidi più studiati a tale scopo figurano l'ittrio-90 (^{90}Y) e lo iodio-131 (^{131}I) (24).

3.2 Sviluppo degli ADC

Il processo di sviluppo di un ADC inizia con la selezione del TAA (*Tumor-associated Antigen*), prosegue con lo sviluppo del mAb e si conclude con la coniugazione di quest'ultimo al complesso *linker/payload* (11) (20).

3.2.1 Selezione dell'antigene associato al tumore

La prima caratteristica che un TAA deve possedere è una localizzazione selettiva o prevalente sulla superficie delle cellule tumorali. Questa specifica espressione, insieme alla capacità del TAA di mediare l'endocitosi del complesso antigene/ADC, permettono il rilascio mirato del *payload* all'interno delle cellule tumorali (5).

Oltre all'espressione selettiva e alla capacità di internalizzazione, un ulteriore aspetto da considerare nella selezione del TAA è rappresentato dallo *shedding* dell'antigene. Questo termine indica il rilascio nel fluido extracellulare di proteine di superficie, generalmente mediato dal taglio proteolitico operato da specifici enzimi (26).

Tale fenomeno interessa i domini extracellulari di alcuni TAA impiegati nello sviluppo degli ADC e presenta un'incidenza variabile a seconda dell'antigene considerato. Tra i TAA maggiormente soggetti a *shedding* figurano HER2, nectina-4, CD25, TROP2 e FR α , mentre antigeni quali CD19 e CD22 sono caratterizzati da un tasso di *shedding* inferiore (26) (27).

Il rilascio del TAA di superficie nella circolazione sistemica può determinare un aumento del legame con gli ADC circolanti, con conseguente aumento del rischio di reazioni avverse e riduzione della quota di farmaco nel tessuto tumorale (5).

Infine, nel caso dei tumori solidi, è auspicabile che il TAA sia espresso omogeneamente all'interno della massa tumorale, così da consentire il legame e l'internalizzazione dell'ADC da parte di tutte le cellule neoplastiche. Tuttavia, quando tale condizione non è raggiungibile, all'efficacia della terapia può contribuire il *bystander effect*. Tale meccanismo, tuttavia, non è tipico di tutti gli ADC, ma dipende dalla lipofilia del *payload*, in grado di determinare se esso possa diffondere passivamente attraverso le membrane biologiche, e dalla tipologia di *linker*, che deve essere necessariamente scindibile (5) (11) (16) (17).

3.2.1.1 TAA degli ADC attualmente approvati

I TAA selezionati per lo sviluppo degli ADC presenti in commercio comprendono:

- **CD33** (target del gemtuzumab ozogamicin) e **CD22** (target dell'inotuzumab ozogamicin), due recettori appartenenti alla famiglia delle *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs)* sovraespressi, rispettivamente, sulla superficie delle cellule di leucemia mieloide acuta e sulla superficie delle cellule di leucemia linfoblastica acuta (5)
- **CD79b**, una glicoproteina di superficie, componente dei BCR, sovraespressa nelle cellule di linfoma a linfociti B. Costituisce il target del polatuzumab vedotin (5).
- **CD19**, un'altra glicoproteina di superficie e di *signaling* dei linfociti B sovraespressa nelle cellule di linfoma a linfociti B. È il bersaglio del loncastuximab tesirine (5)
- **CD30** (target del brentuximab vedotin) e **BCMA** (*B-cell maturation antigen*, target del belantamab mafodotin), due membri della superfamiglia dei recettori per il fattore di necrosi tumorale, sovraespressi, rispettivamente, sulla superficie delle cellule di diversi tipi di linfoma e sulla superficie delle cellule di mieloma multiplo (5)
- **HER2**, recettore tirosin-chinasico appartenente alla famiglia dei recettori per il fattore di crescita epidermico (EGFR, *Epidermal growth factor*

- receptor*), sovraespresso o mutato in diversi tipi di tumori solidi. Costituisce il target del trastuzumab emtansine e del trastuzumab deruxtecan (5)
- **TF** (*Tissue Factor*), glicoproteina di superficie coinvolta nei processi di coagulazione, di degradazione della matrice extracellulare e di attivazione e adesione piastrinica. TF è sovraespresso in diversi tipi di tumori solidi e rappresenta il target del tisotumab vedotin (5)
 - **FR α** , glicoproteina di superficie implicata nel trasporto intracellulare dei folati e sovraespressa in diversi tipi di tumori solidi. Costituisce il target del mirvetuximab soravtansine (5)
 - **nectina-4**, molecola di adesione sovraespressa in diversi tipi di tumori solidi e in grado di attivare la via di trasduzione del segnale PI3K/AKT, frequentemente deregolata nei tumori. Costituisce il target dell'enfortumab vedotin (5)
 - **TROP2**, glicoproteina di superficie sovraespressa in diversi tipi di tumori solidi e coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare. Costituisce il target del sacituzumab govitecan e dell'ADC di più recente approvazione datopotamab deruxtecan. Quest'ultimo ha ricevuto l'autorizzazione all'immissione in commercio da parte di FDA il 17 gennaio 2025 e di EMA il 4 aprile 2025. L'indicazione riguarda il trattamento del carcinoma alla mammella metastatico o non resecabile. Il farmaco è indicato in pazienti adulti con positività al recettore ormonale (HR, *Hormone receptor*), ma negativi a HER2, precedentemente trattati con una terapia ormonale e chemioterapia ([Datroway | European Medicines Agency \(EMA\)](#), [Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs](#)) (5)
 - **c-MET** (*c-mesenchymal-epithelial transition factor*), recettore tirosin-chinasico per il fattore di crescita degli epatociti, localizzato sulla superficie di cellule di origine epiteliale e sovraespresso o mutato in diversi tipi di tumori solidi. Telisotuzumab vedotin rappresenta il primo ADC anti-c-MET ad aver ricevuto l'approvazione da parte di FDA (14 maggio 2025). È indicato nei pazienti adulti con carcinoma al polmone "non a piccole cellule" localmente avanzato o metastatico. Attualmente non ha ancora

ricevuto l'approvazione da parte di EMA (6) (28) ([Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs](#)).

3.2.1.2 TAA degli ADC in via di sviluppo

Tra i target antigenici attualmente selezionati per gli ADC in via di sviluppo figurano sia TAA già approvati sia nuovi TAA promettenti.

HER2 e TROP2 rappresentano due TAA già validati verso i quali è attualmente concentrata un'elevata attività di sviluppo clinico con numerosi nuovi ADC in studi di fase avanzata (5) (6).

Il disitamab vedotin rappresenta un ADC anti-HER2 che ha già ottenuto l'approvazione da parte dell'autorità regolatoria cinese ed è attualmente oggetto di numerosi studi clinici di fase II e III negli Stati Uniti, volti a valutarne l'efficacia in molteplici neoplasie solide (5) ([Search ClinicalTrials.gov for: Cancer, Other terms: Disitamab vedotin, In USA | Card Results | ClinicalTrials.gov](#)).

Un esempio di ADC anti-TROP2 in via di sviluppo è costituito dal sacituzumab tirumotecan, per il quale sono in corso diversi studi clinici di fase II e III volti a valutarne l'efficacia, in monoterapia e in varie combinazioni, in diversi tumori solidi (5) ([Search ClinicalTrials.gov for: Cancer, Other terms: sacituzumab tirumotecan | Card Results | ClinicalTrials.gov](#)).

Per quanto concerne gli ADC diretti verso nuovi TAA, tra i nuovi antigeni promettenti risultano:

- **ROR1** (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1), recettore tirosin-chinasico transmembrana espresso a bassi livelli negli adulti, ma sovraespresso in diversi tipi di tumori, verso il quale è stato progettato l'ADC zilovetamab vedotin, attualmente in fase III di sperimentazione clinica ed indicato per il linfoma diffuso a grandi linfociti B (6).
- **HER3**, membro della famiglia EGFR, ma privo del dominio chinasico. È un recettore in grado di formare eterodimeri con altri recettori di questa famiglia promuovendo la proliferazione cellulare. Il patritumab deruxtecan rappresenta un ADC anti-HER3 attualmente sperimentato in studi clinici di fase I, II e III, in monoterapia e in combinazione, in diversi tumori solidi,

anche di età pediatrica (6) ([Search ClinicalTrials.gov for: Cancer, Other terms: patritumab deruxtecan | Card Results | ClinicalTrials.gov](#)).

- **NaPi2b** (sodium dependent phosphate transport protein 2B), trasportatore per i fosfati sovraespresso in diversi tumori solidi, in particolare nel carcinoma ovarico. L'upifitamab rilsodotin rappresenta il primo ADC anti-NaPi2b ad essere stato sviluppato e giunto ad una fase avanzata di sviluppo clinico; tuttavia, il suo sviluppo è stato successivamente interrotto a causa del mancato raggiungimento dell'*endpoint* primario di efficacia (29) ([Search ClinicalTrials.gov for: Cancer, Other terms: upifitamab rilsodotin | Card Results | ClinicalTrials.gov](#)).
- **EpCAM** (epithelial cell adhesion molecule), molecola sovraespressa sulla superficie delle cellule tumorali di origine epiteliale, costituisce il target dell'oportuzumab monotox, un ADC che ha concluso la fase III di sperimentazione clinica per il trattamento del tumore alla vescica "non-muscolo-invasivo" (5) (30).

3.2.1.3 Nuovi potenziali target all'interno del TME

Finora, lo sviluppo degli ADC si è basato su antigeni espressi esclusivamente o prevalentemente dalle cellule neoplastiche. Tuttavia, per quanto riguarda i tumori solidi, evidenze precliniche e cliniche suggeriscono che nuovi potenziali antigeni siano da ricercare all'interno del microambiente tumorale (TME, *Tumor Microenvironment*) (6) (20).

Gli antigeni associati al TME (TMAs, *TME-associated antigens*) comprendono molecole sovraesprese nella matrice extracellulare del TME o dai diversi tipi cellulari che abitano tale microambiente, tra cui i fibroblasti, le cellule endoteliali dei vasi sanguigni di nuova formazione e le cellule del sistema immunitario. Il legame degli ADC ai TMAs consentirebbe di superare la necessità di internalizzazione del complesso antigene/ADC da parte delle cellule neoplastiche e di favorire il rilascio del *payload* a livello extracellulare. Ne consegue che alcuni dei limiti tipici degli ADC già in uso, tra cui le variazioni nei livelli di espressione degli antigeni da parte delle cellule maligne, possano essere superati. Inoltre, il rilascio extracellulare del *payload*, che possiede un peso molecolare inferiore

rispetto all'ADC integro, facilita la penetrazione del farmaco nel tessuto tumorale, permettendo di raggiungere anche le cellule maligne lontane dai vasi sanguigni (20) (31).

In generale, il meccanismo d'azione degli ADC diretti verso TMAs si basa sul *bystander effect* (31).

L'F16-PNU159682 è un ADC attualmente in fase di sviluppo preclinico, costituito dall'immunoglobulina F16 coniugata al *payload* PNU159682. Questo ADC è diretto verso la tenascina-C, una proteina sovraespressa nella matrice extracellulare di diversi tumori solidi, nei linfomi e nel midollo osseo di pazienti affetti da leucemie acute. Studi preclinici *in vivo* hanno dimostrato un potente effetto antitumorale di F16-PNU159682 (6) (32).

3.2.2 Sviluppo dell'anticorpo monoclonale

Gli anticorpi monoclonali (mAb, *Monoclonal Antibody*) sono anticorpi diretti contro uno specifico epitopo dell'antigene di interesse, prodotti a partire da un singolo clone di linfociti B espanso in laboratorio (8) (33).

I primi mAb impiegati nella progettazione degli ADC furono ottenuti con la tecnica dell'ibridoma, messa a punto nel 1975 da Köhler e Milstein (1). La metodica prevede l'inoculazione dell'antigene bersaglio in un topo immunocompetente, al fine di indurre una risposta immunitaria specifica. Successivamente si procede con l'estrazione della milza dell'animale, con l'isolamento dei linfociti B in essa accumulati, successivamente fusi con cellule di mieloma. Tali cellule saranno poi sottoposte ad un processo di fusione con linee cellulari di mieloma, creando i cosiddetti ibridomi, al fine di poterle propagare indefinitamente in coltura. Ciò consentirà di selezionare e propagare solo i cloni di ibridoma capaci di produrre il solo anticorpo di interesse (33).

Nonostante tale tecnica abbia rappresentato una svolta nella produzione dei mAb, essa consente la produzione di anticorpi murini, dunque associati ad un elevato rischio di immunogenicità (produzione di anticorpi anti-farmaco ed insorgenza di reazioni avverse immuno-mediate) (26) (34).

3.2.2.1 Sviluppo di mAb chimerici

A partire dagli anni '80, con l'avvento delle tecnologie di ingegneria genetica, fu possibile ottenere mAb caratterizzati da un ridotto rischio di immunogenicità, permettendone l'impiego clinico (8).

I primi mAb ad essere stati sviluppati con una quantità ridotta di informazione genetica murina furono gli anticorpi chimerici, ottenuti combinando le regioni variabili di anticorpi murini con le regioni costanti di anticorpi di origine umana (Figura 9) (33) (34).

Tra gli ADC attualmente approvati il brentuximab vedotin è l'unico ad incorporare un anticorpo chimerico (34).

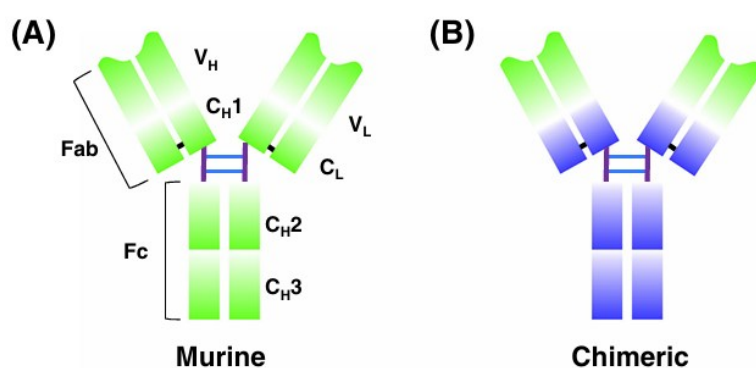


Figura 9. (A) anticorpo murino, (B) anticorpo chimerico. Adattata da (34).

3.2.2.2 Sviluppo di mAb umanizzati

L'isotipo IgG, che rappresenta la classe di immunoglobuline utilizzata negli ADC, possiede, sui domini variabili della regione Fab, sei anse ipervariabili denominate regioni determinanti la complementarità (CDRs, *Complementarity Determining Regions*). Queste sequenze amminoacidiche sono responsabili del riconoscimento e dell'interazione tra l'IgG e l'antigene (9).

Con la tecnologia del *CDR grafting*, che prevede la sostituzione delle CDR di un'IgG umana con le CDR di origine murina, è stato possibile ottenere mAb umanizzati in cui la quantità di informazione genetica umana è pari al 90% dell'intera sequenza anticorpale. Ne consegue che, a differenza dei mAb chimerici, il rischio di immunogenicità è ulteriormente ridotto (Figura 10) (33) (34).

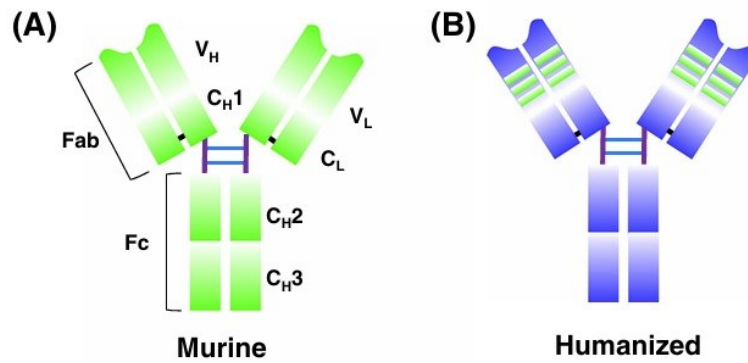


Figura 10. (A) anticorpo murino, (B) anticorpo umanizzato. Adattata da (34).

Tra gli ADC umanizzati attualmente approvati ricordiamo: gemtuzumab ozogamicin, inotuzumab ozogamicin, polatuzumab vedotin, belantamab mafodotin, trastuzumab emtansine, trastuzumab deruxtecan, sacituzumab govitecan, datopotamab deruxtecan e telisotuzumab vedotin incorporano un anticorpo umanizzato (1) (35).

3.2.2.3 Sviluppo di mAb umani

Il processo di umanizzazione dei mAb murini si è spinto fino all'ottenimento di mAb completamente umani in cui la quantità di informazione genetica umana è pari al 100% dell'intera sequenza anticorpale (Figura 11). Ne consegue che, rispetto ai mAb umanizzati al 90%, il rischio di immunogenicità sia ulteriormente ridotto (33).

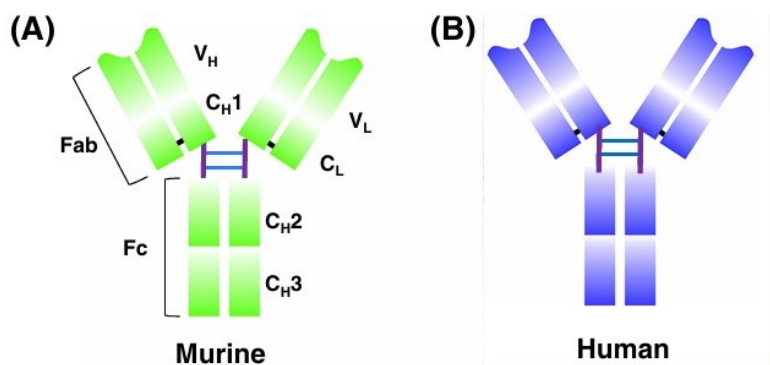


Figura 11. (A) anticorpo murino, (B) anticorpo umano. Adattata da (34).

I mAb umani possono essere ottenuti principalmente attraverso tre modalità:

1. *Phage display*
2. *Animali transgenici*
3. *Single B-cell*

La tecnica del *phage display*, messa a punto negli anni '90 da Sir Gregory P. Winter e George P. Smith, consente l'identificazione, *in vitro*, di anticorpi umani. Tale metodo si basa sulla creazione di una libreria di batteriofagi che esprimono sulla propria superficie frammenti anticorpali di dimensioni ridotte, costituiti esclusivamente dai domini variabili. Queste librerie derivano dall'incorporazione, all'interno del genoma dei batteriofagi, di geni codificanti per scFv o Fab esogeni (*Figura 3*, pagina 8), generalmente ottenuti mediante trascrizione inversa dell'mRNA di linfociti B di donatori umani.

La metodica prevede l'esposizione dell'antigene di interesse alla libreria di batteriofagi e la successiva selezione del fago che esprime l'scFv o il Fab in grado di riconoscere l'epitopo desiderato. Infine, a partire dal frammento anticorpale selezionato, si procede alla costruzione dell'anticorpo intero (34).

L'utilizzo di animali transgenici rappresenta un'ulteriore modalità per lo sviluppo di mAb umani. Tale tecnica si basa sull'impiego di topi geneticamente modificati mediante la sostituzione dei geni che codificano per le immunoglobuline murine con geni codificanti per le immunoglobuline umane (34).

Questa metodica, analogamente alla tecnica dell'ibridoma, prevede l'inoculazione dell'antigene bersaglio nel topo transgenico al fine di indurre una risposta immunitaria specifica. Successivamente, dall'isolamento dei linfociti B, è possibile ottenere il mAb umano di interesse (33) (34).

La tecnica della *single B-cell* viene impiegata per lo sviluppo di mAb umani, in particolare nell'ambito della terapia di malattie infettive, in cui l'antigene d'interesse può risultare difficile da ottenere *in vitro*.

Tale metodica prevede il prelievo di cellule B dal sangue periferico o dai tessuti linfoidei di individui umani precedentemente infettati o vaccinati. Successivamente si procede con l'identificazione delle cellule B specifiche per l'antigene. Infine, i geni codificanti i domini variabili della catena leggera e della catena pesante dell'immunoglobulina vengono amplificati ed espressi in linee cellulari di mammifero, consentendo la produzione del mAb umano (34) (36).

Tra gli ADC attualmente approvati, l'enfortumab vedotin e il tisotumab vedotin sono gli unici ad incorporare un anticorpo umano (1).

3.2.3 Coniugazione farmaco-anticorpo

La scelta del metodo di coniugazione del mAb al complesso *linker/payload*, che costituisce l'ultimo step del processo di sviluppo di un ADC, influisce sull'efficacia terapeutica, sul profilo di sicurezza e sul profilo farmacocinetico del coniugato (7).

Un parametro fondamentale da definire in questa fase è il *Drug-to-Antibody Ratio* (DAR), che indica il numero di molecole di *payload* legate al mAb (Figura 12) (7).

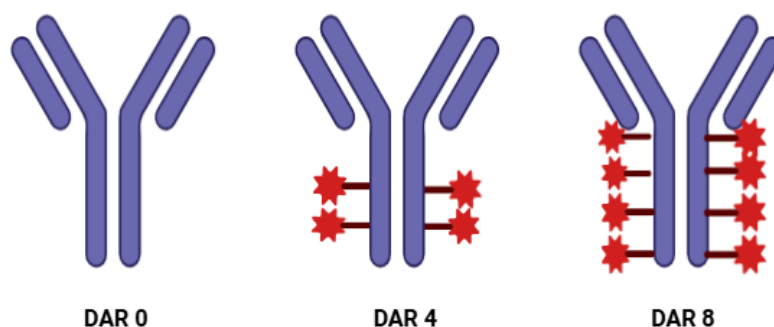


Figura 12. Rappresentazione del Drug-to-Antibody Ratio (DAR). Creata con BioRender.

Il valore di questo parametro, che dipende dal metodo di coniugazione adottato e dalla tipologia di *payload* incorporato, negli ADC attualmente approvati risulta compreso tra 2 e 8 (5).

Valori elevati di DAR sono associati ad un aumento dell'idrofobicità dell'ADC, con conseguente incremento del rischio di aggregazione e precipitazione, nonché a una riduzione dell'emivita plasmatica dovuta ad una più rapida *clearance*. D'altra parte, lo sviluppo di ADC caratterizzati da valori più bassi di DAR comporta il trasporto di un numero inferiore di molecole di *payload* al sito d'azione, con possibile riduzione della potenza (5).

L'ottenimento di un farmaco-coniugato con un adeguato profilo di sicurezza ed efficacia terapeutica richiede pertanto un compromesso tra potenza e proprietà farmacocinetiche. Il profilo farmacocinetico dell'ADC, tuttavia, non dipende esclusivamente dal valore medio di DAR, ma dalla sua idrofobicità complessiva, influenzata sia dalla natura del *linker* e del *payload*, sia dalla distribuzione del DAR all'interno della miscela di ADC. Una scarsa solubilità in acqua del *linker* e/o del *payload*, così come la presenza, nella stessa miscela, di specie caratterizzate

da valori elevati di DAR è infatti associata ad un aumento della tendenza all'aggregazione. È stato recentemente dimostrato che l'impiego di *linker* più idrofili consente di sviluppare ADC con un buon profilo di sicurezza ed efficacia anche in presenza di DAR più elevati, permettendo di mantenere un'adeguata stabilità sistemica e garantendo al contempo una maggiore concentrazione di agente citotossico al sito d'azione (5) (7).

I metodi di coniugazione impiegati nello sviluppo degli ADC appartengono a due categorie: metodi di coniugazione stocastica e metodi di coniugazione sito-specifica (7).

3.2.3.1 Coniugazione stocastica

Per coniugazione stocastica si intende l'insieme dei metodi di accoppiamento farmaco-anticorpo in cui i siti di coniugazione sul mAb non possono essere predetti con certezza. Conseguentemente, il *payload* può legarsi anche a siti dell'anticorpo che potrebbero ostacolare l'interazione tra il target e l'anticorpo stesso. Inoltre, un ulteriore effetto inevitabile di questa tecnica è la produzione di miscele eterogenee di ADC, costituite da coniugati caratterizzati da valori di DAR diversi, talvolta anche pari a zero (1) (7) (37).

I metodi di coniugazione stocastica comprendono la coniugazione a residui di lisina e la coniugazione a residui di cisteina (7).

Nella coniugazione a residui di lisina i gruppi amminici delle lisine presenti nelle catene polipeptidiche dell'anticorpo reagiscono con un gruppo estereo del *linker*. Questo metodo, che può coinvolgere fino a quaranta residui di lisina, dà luogo a miscele eterogenee di ADC con valori di DAR compresi tra 0 e 8.

Tra gli ADC attualmente approvati da parte di FDA e di EMA, quelli ottenuti mediante questo metodo di coniugazione sono stati il gemtuzumab ozogamicin, il trastuzumab emtansine, l'inotuzumab ozogamicin e il mirvetuximab soravtansine (1) (5).

Nella coniugazione a residui di cisteina, che rappresenta la tecnica più comunemente impiegata nello sviluppo degli ADC, i residui dei legami disolfuro dell'anticorpo reagiscono con i gruppi tiolici del complesso *linker/payload* (1).

Questo metodo impiega gli otto residui di cisteina derivanti dalla riduzione dei quattro ponti disolfuro intercatena, ossia quelli che collegano le catene polipeptidiche leggere e pesanti dell'anticorpo. Ne consegue che, essendo implicato un numero inferiore di siti di coniugazione rispetto all'accoppiamento ammidico, le miscele di ADC ottenute risultano più omogenee e presentano valori di DAR compresi tra 4 e 8.

Tra gli ADC attualmente approvati da parte di FDA e di EMA, il primo ad essere stato prodotto mediante questo tipo di accoppiamento è stato il brentuximab vedotin (1) (7) (37).

3.2.3.2 Coniugazione sito-specifica

Per superare i limiti della coniugazione stocastica sono stati sviluppati metodi di coniugazione sito-specifica che, oltre a consentire l'accoppiamento su posizioni specifiche dell'anticorpo, danno luogo a miscele omogenee di ADC (7) (15).

Tali tecniche, che si basano o sull'ingegnerizzazione della struttura anticorpale oppure su modifiche post-traduzionali della componente glucidica dell'anticorpo, comprendono l'introduzione di residui di cisteina (THIOMAB™), l'introduzione di amminoacidi non naturali e modifiche del glicano in posizione Asn297 della regione Fc dell'anticorpo (1) (16).

THIOMAB™ rappresenta una tecnica di ingegneria genetica volta all'inserimento di residui di cisteina in posizioni specifiche dell'anticorpo, consentendo la coniugazione unicamente su questi siti. Rispetto al metodo di coniugazione stocastica condotto sui medesimi residui amminoacidici, THIOMAB™ non prevede la rottura dei ponti disolfuro intercatena. Di conseguenza, la struttura quaternaria dell'anticorpo rimane invariata e non vi è il rischio di una riduzione dell'affinità tra anticorpo e antigene (1) (15).

L'introduzione di amminoacidi non naturali consiste in una tecnica di ingegnerizzazione in cui, in posizioni specifiche della regione Fc dell'anticorpo, è possibile inserire amminoacidi non presenti nei sistemi biologici; tra questi figurano la para-azidofenilalanina e l'azido lisina.

Nonostante tale tecnica consenta l'accoppiamento esclusivamente sui siti modificati, la presenza di amminoacidi non naturali può determinare un aumento del rischio di immunogenicità e di aggregazione degli ADC (1) (15).

Il glicano in posizione Asn297 del dominio CH₂ delle IgG può essere oggetto, attraverso una reazione di glicosilazione con il complesso *linker/payload*, di un accoppiamento sito-specifico. Affinché tale processo possa avvenire, è necessaria una fase preliminare in cui il glicano viene modificato per esporre i siti reattivi. Queste modifiche possono essere ottenute mediante l'ingegnerizzazione del glicano stesso oppure tramite modifiche enzimatiche effettuate attraverso glicosiltransferasi o β-galattosidasi (1) (16).

3.2.4 Generazioni di ADC

In base all'evoluzione delle tecnologie di sviluppo e alla scoperta di nuovi *payload*, gli ADC attualmente approvati possono essere suddivisi in tre generazioni (1).

3.2.4.1 ADC di prima generazione

Gli ADC di prima generazione, ottenuti mediante la tecnologia di accoppiamento basata sulla coniugazione a residui di lisina, sono costituiti da una IgG4 umanizzata coniugata, mediante un *linker* idrazone, all'agente citotossico calicheamicina-γ1 (1) (5) (7).

A questa generazione appartengono:

- gemtuzumab ozogamicin, approvato da parte di FDA il 17 maggio 2000 (successivamente ritirato dal commercio nel 2010 e riapprovato il 1° settembre 2017) e da parte di EMA il 19 aprile 2018
- inotuzumab ozogamicin, approvato da parte di FDA il 17 agosto 2017 e da parte di EMA il 29 giugno 2017

(<https://www.ema.europa.eu/en/homepage>) (<https://www.fda.gov/>).

Nonostante tali ADC abbiano costituito un progresso nel targeting di precisione e siano caratterizzati da una maggiore efficacia nell'indurre la morte delle cellule tumorali rispetto ad un classico anticorpo monoclonale, sono caratterizzati da un

indice terapeutico ristretto e da una minore efficacia terapeutica rispetto agli ADC di generazioni successive.

Innanzitutto, l'insufficiente selettività nell'espressione del TAA di questi ADC è responsabile di un indice terapeutico ristretto.

L'instabilità del *linker* idrazone, inoltre, può comportare il rilascio prematuro del *payload* nel plasma, compromettendo il funzionamento dell'ADC e aumentando il rischio di tossicità *off-target*. A tal proposito, nel 2010 vi fu il ritiro dal commercio di gemtuzumab ozogamicin a causa di un elevato numero di casi di epatotossicità grave, talvolta fatale, attribuito proprio al *linker*, che determinava un rilascio prematuro di calicheamicina- γ 1 nella circolazione sistemica. Successivamente, nel 2017, l'ADC fu riapprovato in seguito ad una revisione del regime posologico, che prevedeva la somministrazione di dosi inferiori.

Infine, al confronto con gli ADC sviluppati con metodi di coniugazione sito-specifica, il gemtuzumab ozogamicin e l'inotuzumab ozogamicin sono caratterizzati da un'elevata eterogeneità delle miscele prodotte (1) (5) (7).

3.2.4.2 ADC di seconda generazione

Gli ADC di seconda generazione sono costituiti da un IgG1 coniugata, mediante un *linker*, ad un inibitore del fuso mitotico, quali il maytansinoide DM1 e l'auristatina MMAE.

A questa generazione appartengono:

- brentuximab vedotin, approvato da parte di FDA il 19 agosto 2011 e da parte di EMA il 25 ottobre 2012
- trastuzumab emtansine, approvato da parte di FDA il 22 febbraio 2013 e da parte di EMA il 15 novembre 2013 (1)
(<https://www.ema.europa.eu/en/homepage>) (<https://www.fda.gov/>).

Con gli ADC di seconda generazione, grazie all'impiego di un *payload* e di un *linker* maggiormente idrosolubili, è stato possibile incrementare l'efficienza del processo di coniugazione, consentendo il raggiungimento di valori di DAR maggiori, senza incorrere in un aumento del rischio di aggregazione e precipitazione degli ADC in circolo.

Inoltre, il *linker* non scindibile SMCC del trastuzumab emtansine e il *linker* peptidico a scissione enzimatica del brentuximab vedotin, dotati di una maggiore stabilità in circolo al confronto con il *linker* idrazone, hanno apportato un aumento della stabilità degli ADC nella circolazione sistemica.

Infine, con il brentuximab vedotin, che è stato il primo ADC ad essere stato prodotto mediante la coniugazione a residui di cisteina del mAb, si è ottenuta una riduzione dell'eterogeneità della miscela di ADC, in cui soltanto il 5% risulta non coniugato, al confronto con il 50% del gemtuzumab ozogamicin (1) (7).

3.2.4.3 ADC di terza generazione

Con gli ADC di terza generazione sono stati migliorati ulteriormente il profilo di efficacia e di sicurezza di questa classe di farmaci (1).

A questa generazione appartengono:

- polatuzumab vedotin, approvato da parte di FDA il 10 giugno 2019 e da parte di EMA il 16 gennaio 2020
- enfortumab vedotin, approvato da parte di FDA il 18 dicembre 2019 e da parte di EMA il 13 aprile 2022
- trastuzumab deruxtecan, approvato da parte di FDA il 20 dicembre 2019 e da parte di EMA il 18 gennaio 2021
- sacituzumab govitecan, approvato da parte di FDA il 22 aprile 2020 e da parte di EMA il 22 novembre 2021
- loncastuximab tesirine, approvato da parte di FDA il 23 aprile 2021 e da parte di EMA il 20 dicembre 2022
- belantamab mafodotin, approvato dall'autorità regolatoria europea e statunitense nel 2020, fu successivamente ritirato dal commercio e riapprovato, da parte di FDA il 23 ottobre 2025 e da parte di EMA il 23 luglio 2025
- mirvetuximab soravtansine, approvato da parte di FDA il 14 novembre 2020 e da parte di EMA il 14 novembre 2024
- tisotumab vedotin, approvato da parte di FDA il 20 settembre 2021 e da parte di EMA il 28 marzo 2025

- datopotamab deruxtecan, approvato da parte di FDA il 17 gennaio 2025 e da parte di EMA il 4 aprile 2025
- telisotuzumab vedotin, approvato da parte di FDA il 14 maggio 2025. Attualmente non ha ricevuto l'autorizzazione all'immissione in commercio da parte di EMA (1) (<https://www.ema.europa.eu/en/homepage>) (<https://www.fda.gov/>).

Il progresso di questa generazione di ADC risiede sia nell'evoluzione delle tecnologie di sviluppo, sia nella scoperta di nuovi *payload*.

Con l'introduzione della coniugazione sito-specifica, infatti, si è potuto ottenere tanto un miglioramento nell'omogeneità dei valori di DAR quanto l'accoppiamento a siti del mAb definiti a priori.

Inoltre, l'efficacia terapeutica è stata implementata anche grazie all'utilizzo di *payload* più potenti, quali le pirrolobenzodiazepine (PBD).

Per quanto concerne i *linker*, è da segnalare che l'aggiunta di molecole di polietilenglicole (PEG) è una tecnica utilizzata per aumentarne l'idrofilia di due ADC di questa generazione. Ad esempio, in sacituzumab govitecan, la pegilazione del *linker* CL2A ha consentito l'ottenimento di un DAR pari a 7.6 senza compromettere il profilo di sicurezza ed efficacia. Questa stessa strategia è stata applicata anche al *linker* di loncastuximab tesirine, al fine di contrastare l'elevata lipofilia del *payload* PBD (1) (5).

4 Farmacologia degli ADCs

4.1 Meccanismo d'azione

Gli ADC sono farmaci che agiscono con un meccanismo farmacodinamico complesso che somma due componenti principali:

1. le funzioni effettrici dell'IgG
2. l'azione citotossica del *payload* (20).

4.1.1 Funzioni effettrici dell'IgG

Le IgG, che rappresentano l'isotipo impiegato negli ADC attualmente in commercio, possono agire sul TAA attraverso i seguenti meccanismi farmacodinamici: blocco delle vie di trasduzione del segnale sostenute dal TAA e attivazione delle funzioni effettrici ADCC, ADCP e CDC (12).

In primo luogo, mediante il sito di riconoscimento dell'antigene localizzato nella regione Fab, il mAb interagisce con il TAA. Questo legame può determinare l'inibizione delle vie di trasduzione del segnale coinvolte nella trasformazione neoplastica e sostenute dallo stesso TAA.

Un esempio è rappresentato dal trastuzumab emtansine nel quale la porzione anticorpale, che lega uno specifico epitopo del recettore tirosin-chinasico HER2, inibisce la dimerizzazione con gli altri membri della famiglia EGFR, quali HER1, HER3 e HER4. Questo legame determina il blocco dell'attivazione di una delle principali vie di trasduzione del segnale oncogeniche, ossia PI3K/AKT (Figura 13) (5) (9) (20).

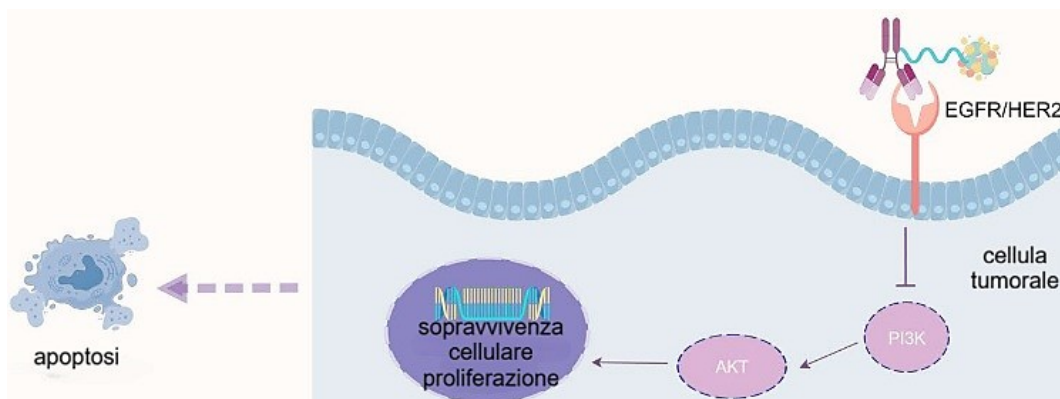


Figura 13. **Meccanismo d'azione di un ADC.** Blocco della via di trasduzione del segnale PI3K/AKT, frequentemente deregolata nei tumori HER2+. Adattata da (5).

In secondo luogo, mediante la regione Fc, il mAb è in grado di riconoscere e legare i recettori Fc γ R espressi dalle cellule natural killer e dai macrofagi.

Una volta ingaggiato il corrispettivo Fc anticorpale, gli Fc γ R espressi dalle cellule natural killer possono attivare il meccanismo di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*). Analogamente, gli Fc γ R espressi dai macrofagi possono attivare il meccanismo di fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente (ADCP, *Antibody-dependent cellular phagocytosis*) (5) (20).

L'ultima funzione effettrice che l'anticorpo può esercitare tramite il suo Fc è rappresentata dal meccanismo di citotossicità dipendente dal complemento (CDC, *Complement-dependent cytotoxicity*), che si verifica in seguito al legame con la proteina C1q della cascata del complemento (12).

L'attivazione dei meccanismi ADCC, ADCP e CDC nel tessuto tumorale promuove l'attività citotossica mediata dall'immunità innata, contribuendo all'efficacia dell'ADC nell'indurre la morte della cellula neoplastica (*Figura 14*) (20).

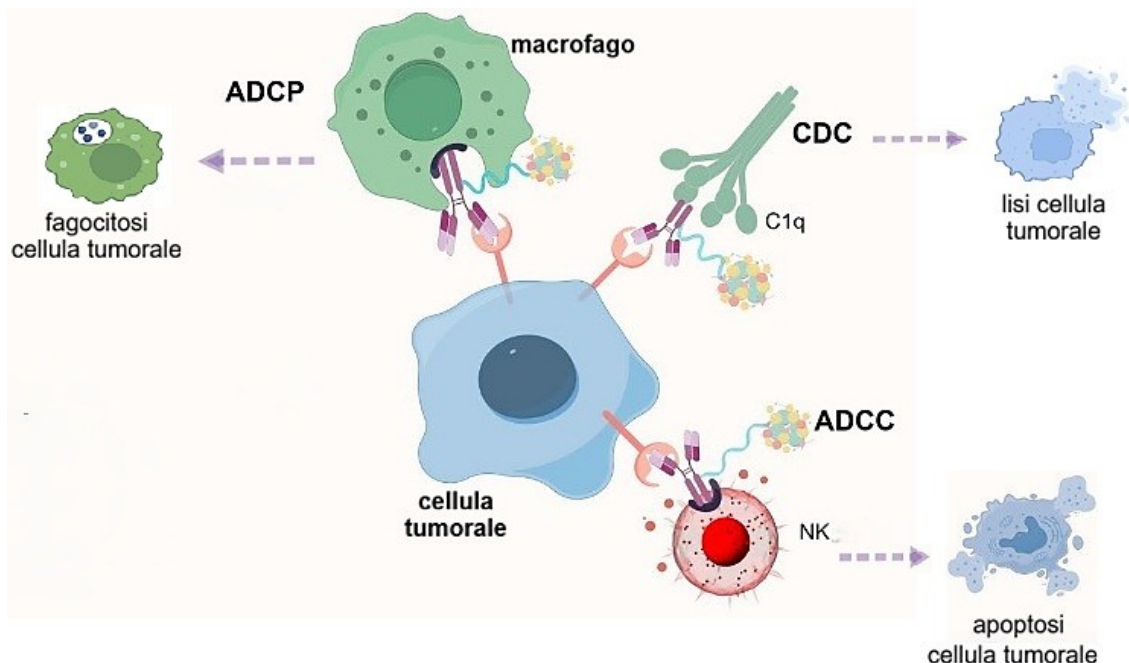


Figura 14. Meccanismo d'azione di un ADC. L'attivazione dei meccanismi ADCC, ADCP e CDC induce morte della cellula tumorale. Adattata da (5).

Ricordiamo che, a seconda della sottoclasse di IgG incorporata nell'ADC, il grado di attivazione delle funzioni effettrici CDC, ADCC e ADPC può variare. Per quanto concerne gli ADC attualmente autorizzati, quelli che incorporano l'isotipo IgG1 possiedono una maggiore capacità di attivare il sistema immunitario tramite la loro regione Fc (11).

4.1.2 Azione citotossica del payload

Il *payload* può esercitare la propria azione citotossica nella cellula target solo in seguito al suo rilascio dall'ADC. Il processo che conduce a tale liberazione comprende l'interazione tra l'anticorpo e l'antigene, l'internalizzazione del complesso ADC/TAA e il suo successivo trasporto ai lisosomi (*Figura 16*) (20).

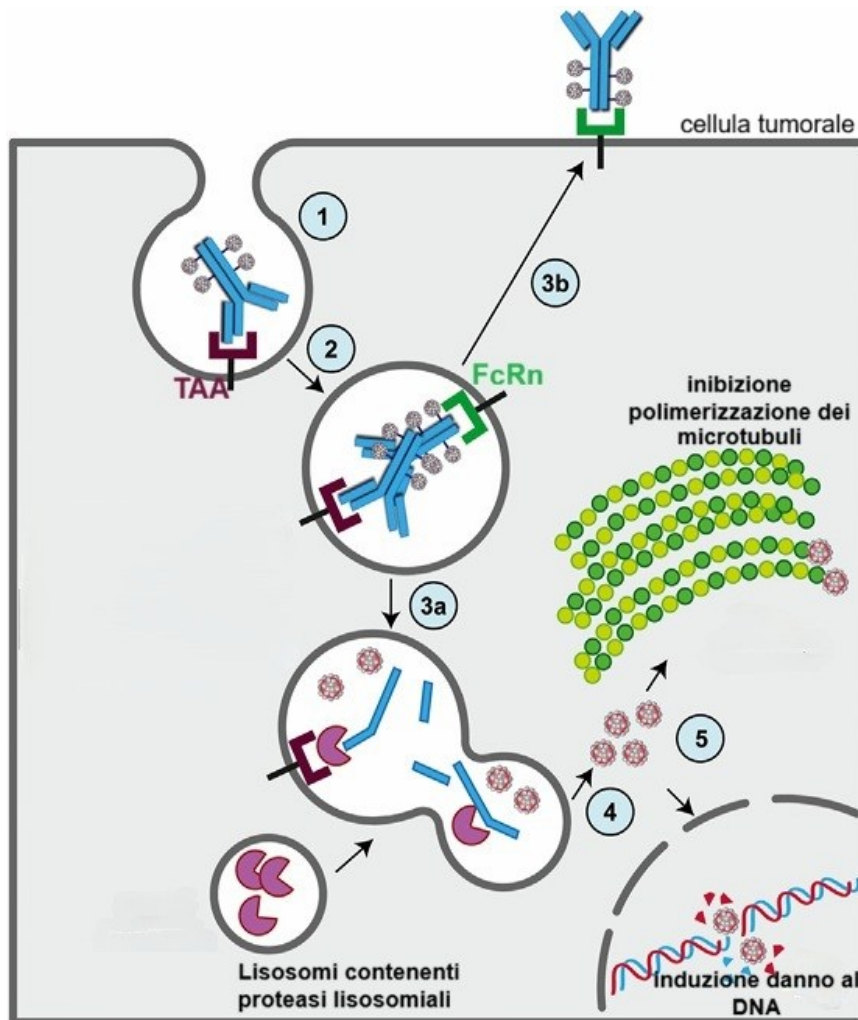


Figura 15. Meccanismo d'azione di un ADC. Interazione tra ADC e TAA (1). Internalizzazione del complesso ADC/TAA (2). Trasporto del complesso ADC/TAA al lisosoma e successiva fusione endosoma-lisosoma (3a). Riciclo dell'ADC in seguito all'interazione tra IgG e FcRn (3b). Rilascio del payload (4) e sua azione citotossica a livello del DNA o dei microtubuli in attiva polimerizzazione (5). Adattata da (20).

4.1.2.1 Internalizzazione del complesso ADC/TAA e rilascio del payload

Nel processo che conduce al rilascio del *payload*, un passaggio fondamentale è rappresentato dall'internalizzazione del complesso ADC/TAA (*Figura 16*) (20).

La modalità di internalizzazione maggiormente sfruttata dagli ADC è l'endocitosi mediata da clatrina, un meccanismo di endocitosi recettore-dipendente. Tale processo porta alla formazione di una vescicola endocitica che successivamente evolve a endosoma precoce. Quest'ultimo, può seguire due vie differenti: da un lato può maturare a endosoma tardivo ed integrarsi nei lisosomi, dall'altro può integrarsi nella membrana plasmatica, rilasciando l'ADC nuovamente in circolo (*Figura 16*) (16).

Oltre all'endocitosi mediata da clatrina, gli ADC possono sfruttare anche altre modalità di internalizzazione, quali l'endocitosi mediata da caveolina, anch'essa recettore-dipendente, e la macropinocitosi, un meccanismo di endocitosi non strettamente dipendente dall'interazione tra l'anticorpo e il recettore antigenico (16).

In seguito alla fusione dell'endosoma tardivo con il lisosoma, l'ambiente acido e la presenza di proteasi lisosomiali determinano il rilascio del *payload*.

Il principio attivo liberato può quindi diffondere nella cellula target e raggiungere il proprio sito d'azione, permettendo l'azione citotossica (*Figura 16*) (20).

4.1.2.2 Riciclo dell'ADC mediato dal recettore Fc neonatale

Come detto in precedenza, una parte degli ADC internalizzati può essere rilasciata nuovamente in circolo mediante un meccanismo definito "riciclo dell'ADC" che consegue all'interazione, ad un pH compreso tra 5.0 e 6.5, tra la regione Fc dell'IgG e il recettore Fc neonatale (FcRn, *Neonatal Fc receptor*), espresso sulla membrana endosomiale. Il successivo rilascio extracellulare dell'anticorpo avviene in un ambiente a pH fisiologico, pari a 7.4.

Come intuibile, la deviazione di una percentuale di ADC internalizzati dalla via endosomiale/lisosomiale comporta una riduzione dell'azione citotossica mediata dal *payload* (*Figura 16*) (9) (10) (20).

4.1.2.3 Bystander effect

L'ultimo meccanismo mediante il quale un ADC può determinare la citotossicità delle cellule tumorali è rappresentato dal *bystander effect*, ossia l'azione del *payload* esercitata sulle cellule circostanti la cellula target, ma prive dell'antigene riconosciuto dall'ADC (5) (20).

In seguito all'internalizzazione del complesso ADC/TAA, il *payload*, una volta rilasciato, può diffondere a livello extracellulare ed esercitare un'azione citotossica sulle cellule tumorali prive del TAA. Tale effetto può interessare anche cellule non tumorali del microambiente tumorale, tra cui fibroblasti e cellule endoteliali. Nel complesso, il *bystander effect* contribuisce ad aumentare l'efficacia terapeutica degli ADC nei tumori solidi caratterizzati da un'espressione eterogenea del TAA e può concorrere alla modulazione del microambiente tumorale (5) (20).

Studi preclinici hanno inoltre dimostrato che il *bystander effect* può verificarsi anche a seguito dell'interazione della regione Fc dell'anticorpo con gli Fc γ R espressi dai macrofagi associati al tumore (TAMs, *Tumor-Associated Macrophages*). L'internalizzazione dell'ADC all'interno di tali cellule, infatti, determina il rilascio del *payload* che può diffondere a livello extracellulare e agire sulle cellule circostanti (12).

Ricordiamo che il *bystander effect* è influenzato sia dalla natura del *payload* sia dalla tipologia di *linker* incorporati nell'ADC (37).

Per quanto concerne i *payload*, soltanto quelli sufficientemente lipofili, quindi in grado di diffondere passivamente attraverso le membrane biologiche, risultano potenzialmente in grado di determinare il *bystander effect* (5) (17).

Tra gli agenti citotossici impiegati come *payload* negli ADC attualmente approvati, quelli in grado di determinare tale effetto comprendono gli inibitori della TOPO-1 (es: SN-38 e Dxd), gli induttori del danno al DNA (es: PBD e N-acetil- γ -calicheamicina), nonché gli inibitori del fuso mitotico come DM1, DM4 e MMAE (5) (37).

Per quanto riguarda i *linker*, invece, soltanto quelli scindibili sono in grado di determinare il *bystander effect*, in quanto sono gli unici a garantire il rilascio del *payload* in forma intatta, ossia priva di residui amminoacidici che ne impedirebbero la diffusione passiva (16).

4.2 Meccanismi di resistenza agli ADC

In seguito ad una terapia prolungata con ADC, le cellule tumorali possono sviluppare meccanismi di resistenza al trattamento. Attualmente, tali meccanismi sono riconducibili a tre principali categorie:

- Resistenza associata al TAA
- Resistenza associata alle vie di internalizzazione del complesso ADC/TAA
- Resistenza associata al *payload* (13).

4.2.1 Resistenza associata al TAA

Per quanto riguarda il TAA, i principali meccanismi di resistenza sviluppati dalla cellula tumorale includono le mutazioni a carico dell'epitopo riconosciuto dal mAb, la *downregulation* del target oppure un aumento del suo rilascio in circolo (20) (38).

Una riduzione dell'espressione dell'antigene è in grado di compromettere la fase iniziale dell'azione citotossica dell'ADC, ossia l'interazione tra l'anticorpo e l'antigene bersaglio e la successiva internalizzazione.

Un esempio di resistenza acquisita mediata da tale meccanismo è rappresentato dalla mutazione T256R a carico di TROP2 che, durante il trattamento con sacituzumab govitecan, determina la *downregulation* del target (13) (15).

Un ulteriore meccanismo di resistenza cellulare agli ADC è rappresentato da un aumento del rilascio del TAA nella circolazione sistemica. L'interazione dell'ADC con l'antigene in forma solubile può, infatti, determinare una riduzione della sua internalizzazione nella cellula target.

Un esempio è rappresentato dall'aumentato *shedding* di HER2, che costituisce uno dei meccanismi di resistenza al trattamento con trastuzumab emtansine (15) (20).

4.2.2 Resistenza associata alle vie di internalizzazione del complesso ADC/TAA

Per quanto riguarda le vie di internalizzazione del complesso ADC/TAA, i meccanismi di resistenza sviluppati dalla cellula tumorale includono l'alterazione della via endo-lisosomiale oppure l'aumento del pH lisosomiale, entrambi in grado di compromettere il corretto rilascio del *payload* (13).

In relazione all'alterazione della via endo-lisosomiale, la sovraespressione della caveolina-1, proteina coinvolta nell'internalizzazione recettore-dipendente degli ADC, è stata associata al riciclo del complesso trastuzumab emtansine/HER2. Tale meccanismo favorisce la rapida fusione della caveola con la membrana plasmatica, impedendo il trasporto dell'ADC al compartimento lisosomiale, sede del rilascio del *payload* (13) (38).

Poiché il processo di rilascio del *payload* richiede la presenza di un ambiente acido, un aumento del pH lisosomiale può rappresentare un ulteriore meccanismo di resistenza agli ADC.

È stato osservato come tale meccanismo sia in grado di ostacolare la degradazione del *linker* di sacituzumab govitecan, compromettendo il rilascio di SN-38 (15) (20).

4.2.3 Resistenza associata al payload

Tra i meccanismi di resistenza cellulare agli ADC rientrano, infine, un aumento dell'efflusso del *payload*, le alterazioni del target terapeutico e dei *pathway* che sostengono la sopravvivenza e la proliferazione cellulare (13) (38).

Il *payload*, in seguito al suo rilascio intracellulare, può subire il trasporto attivo extracellulare delle proteine appartenenti alla famiglia *ATP-binding cassette* (ABC). La sovraespressione di questi trasportatori comporta un aumento dell'efflusso del *payload* dalla cellula tumorale, determinando una forma di resistenza multifarmaco, ossia trasversale a più classi farmacologiche.

DM1, DM4, MMAE, MMAF, Dxd, SN-38 e N-acetil- γ -calicheamicina, seppure con un livello di affinità differente nell'interazione con le proteine ABC, sono soggetti a tale meccanismo di resistenza (13) (20) (38).

Le alterazioni a carico del target terapeutico possono ridurre l'affinità di legame tra il *payload* e il target stesso. Questo fenomeno rappresenta un ulteriore meccanismo di resistenza cellulare agli ADC di cui un esempio è rappresentato dalla mutazione genica E418K a carico della TOPO-1, riscontrata in seguito al trattamento con sacituzumab govitecan.

Un ulteriore esempio di alterazione del target terapeutico con impatto sulla resistenza farmacologica è costituito dall'aumento di espressione delle isoforme β II e β III della β tubulina o l'abnorme acetilazione di questa proteina strutturale. Tali alterazioni sono state osservate in seguito al trattamento con trastuzumab emtansine (13) (15).

Infine, un ulteriore meccanismo di resistenza agli ADC è rappresentato dall'alterazione dei *pathway* intracellulari che sostengono la sopravvivenza e la proliferazione cellulare.

In particolare, in seguito al trattamento con gemtuzumab ozogamicin, è stata osservata l'iperattivazione della via di trasduzione del segnale PI3K/AKT e la sovraespressione delle molecole anti-apoptotiche BCL-2 e BCL-X_L.

Questo tipo di resistenza, che non dipende dall'interazione tra il *payload* e il target terapeutico, ma dagli eventi molecolari successivi all'azione citotossica, può consentire la sopravvivenza delle cellule tumorali al trattamento con gemtuzumab ozogamicin (20) (38).

4.3 Profilo farmacocinetico

Il profilo farmacocinetico degli ADC è dettato essenzialmente dalla componente anticorpale. Tuttavia, anche il *linker* e il *payload* concorrono a determinarne alcuni aspetti (16).

4.3.1 Assorbimento

Data la loro natura glicoproteica e le dimensioni, l'assorbimento sistemico di un ADC dopo somministrazione orale sarebbe nullo. Tali farmaci sono dunque utilizzati mediante infusione endovenosa, che va ripetuta ogni 1-4 settimane. La ragione di questa dilazione nel tempo risiede nella lunga emivita plasmatica del mAb (15) (16).

4.3.2 Distribuzione

L'elevato peso molecolare degli ADC, determinato dalla componente anticorpale, è associato a un ridotto volume di distribuzione, che coincide essenzialmente con il volume del liquido interstiziale degli organi maggiormente vascolarizzati. Tra questi, il fegato rappresenta una delle principali sedi di sequestro degli ADC.

L'internalizzazione degli ADC nelle cellule epatiche avviene prevalentemente attraverso un meccanismo di endocitosi recettore-dipendente. I recettori coinvolti in questo processo includono l' $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$, i recettori del mannosio e alcuni TAA. Un esempio di TAA espresso dalle cellule epatiche sane è rappresentato dal CD33 (16) (39).

L'elevato peso molecolare degli ADC costituisce, inoltre, un ostacolo all'attraversamento delle principali barriere biologiche, tra cui quelle ematoencefalica ed emato-testicolare (16).

Il mAb contribuisce al ridotto volume di distribuzione degli ADC anche attraverso le funzioni mediate dalla regione Fc. Il legame di questa regione ai recettori $\text{Fc}\gamma\text{R}$, espressi dalle cellule circolanti del sistema immunitario, può favorire l'internalizzazione di una quota di ADC in queste cellule.

Inoltre, l'interazione tra Fc e il recettore FcRn , espresso dalle cellule endoteliali, è in grado di promuovere il riciclo dell'ADC verso il compartimento plasmatico. Nelle neoplasie solide questo meccanismo limita ulteriormente la quantità di farmaco in grado di raggiungere il tessuto bersaglio (10) (11) (15) (40).

Il DAR rappresenta un ulteriore fattore in grado di contribuire al ridotto volume di distribuzione degli ADC.

Uno studio *in vivo* ha dimostrato che gli ADC caratterizzati da valori elevati di questo parametro, e quindi da un'elevata idrofobicità, tendono ad accumularsi preferenzialmente a livello epatico. Tale internalizzazione è probabilmente mediata dai recettori $\text{Fc}\gamma\text{R}$ e dai recettori del mannosio espressi dalle cellule di Kupffer e dalle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici. Di conseguenza, questo accumulo determina una riduzione della quantità di farmaco in grado di distribuirsi al tessuto tumorale (15) (41).

Per quanto concerne i tumori ematologici, il legame tra gli ADC e le cellule target avviene direttamente in circolo. Nelle neoplasie solide, invece, tale interazione è preceduta da ulteriori fasi. Innanzitutto, l'ADC deve lasciare il compartimento plasmatico attraversando l'endotelio dei vasi sanguigni tumorali. Sebbene tali vasi presentino una struttura anatomica alterata, che predispone all'attraversamento di molecole di grandi dimensioni, la distribuzione dell'ADC può essere ostacolata. In particolare, i fenomeni di ostruzione vascolare e l'elevata pressione interstiziale della matrice extracellulare possono opporsi all'extravasazione dell'ADC.

La densità dei vasi sanguigni all'interno della massa tumorale rappresenta un ulteriore fattore determinante che condiziona la distribuzione degli ADC nel tessuto solido (5) (13) (16) (42).

4.3.3 Metabolismo ed escrezione

Il metabolismo degli ADC comprende la "deconiugazione" del farmaco-coniugato, seguita dalla proteolisi della componente anticorpale, a cui seguirà l'escrezione del *payload* attraverso la *clearance* epatica o renale (15) (37).

La fase di "deconiugazione" degli ADC determina il rilascio del *payload* dal mAb e avviene, generalmente, all'interno dei lisosomi delle cellule in cui sono stati internalizzati. Tuttavia, in presenza di un *linker* instabile, l'ADC può andare incontro al rilascio prematuro del *payload* nella circolazione sistemica (15) (40). Successivamente, il mAb viene degradato ad amminoacidi mediante l'azione di proteasi che, a seconda di dove sia stato rilasciato il *payload*, agiranno nella circolazione sistemica oppure nei lisosomi (15).

Il *payload*, invece, può subire metabolismo epatico inattivante di fase I e/o di fase II ed essere successivamente escreto per via renale o biliare (15) (16).

Gli ADC, generalmente, presentano un'emivita plasmatica piuttosto lunga, quantificabile nell'ordine di circa tre settimane. Questo prolungato tempo di dimezzamento è attribuibile all'interazione tra la regione Fc dell'anticorpo e il recettore FcRn espresso dalle cellule endoteliali. Il legame con tale recettore consente il ricircolo dell'ADC verso il compartimento plasmatico, proteggendolo dal catabolismo proteolitico lisosomiale (15).

Tuttavia, tanto le proprietà del *linker* e del *payload* quanto la distribuzione del DAR possono influenzare direttamente l'emivita plasmatica degli ADC.

In particolare, una scarsa solubilità in acqua del *linker* e/o del *payload* può favorire la formazione di aggregati di ADC (5). Inoltre, all'interno della stessa miscela di ADC, la presenza di specie caratterizzate da valori elevati di DAR, e quindi da una maggiore idrofobicità, è associata ad un aumento del rischio di aggregazione (15).

Anche l'attività immunologica dell'organismo può impattare sull'emivita dell'ADC a causa della produzione di anticorpi anti-farmaco (ADA, *Anti-Drug Antibodies*) in grado di riconoscere e legare gli aggregati di ADC. Ciò è tanto più frequente in rapporto alla natura del mAb: gli anticorpi chimerici, ad esempio, si caratterizzano per un aumentato rischio di immunogenicità data la presenza di una percentuale maggiore di sequenze murine nella loro struttura (18). In definitiva, la formazione degli immunocomplessi ADC/ADA determina un'accelerazione della *clearance* degli ADC e comporta, di conseguenza, una riduzione della loro emivita plasmatica (5) (15).

4.4 Usi terapeutici

4.4.1 Indicazioni terapeutiche degli ADC attualmente approvati

Come di consueto in ambito oncologico, la registrazione degli ADC ne ha visto una collocazione, in monoterapia, nelle seconde e terze linee di trattamento per le forme tumorali chemoresistenti e/o metastatiche. Successivi studi clinici post-marketing ne hanno valutato l'uso anche in associazione con altri agenti terapeutici antineoplastici, dimostrando un profilo di efficacia e sicurezza tale da consentire il loro impiego in linee di trattamento più precoci. Ad oggi, infatti, alcuni ADC risultano approvati in prima linea, come descritto di seguito (6).

Tra le indicazioni terapeutiche degli ADC attualmente approvati è possibile distinguere tra quelle relative alle neoplasie ematologiche e quelle relative alle neoplasie solide. Le indicazioni riportate nel presente elaborato si riferiscono

esclusivamente a quelle autorizzate nel territorio europeo che, in alcuni casi, differiscono da quelle nel territorio statunitense.

(<https://www.ema.europa.eu/en/homepage>) (<https://www.fda.gov/>)

4.4.1.1 Indicazioni terapeutiche nelle neoplasie ematologiche

Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®) ha ottenuto la designazione di farmaco orfano ed è indicato per il trattamento della leucemia mieloide acuta (AML, *Acute myeloid leukemia*), una patologia rara. Rappresenta la prima linea di trattamento nei pazienti di età pari o superiore a quindici anni con AML positiva a CD33. Il farmaco viene somministrato in associazione ai chemioterapici daunorubicina e citarabina ([Mylotarg | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Inotuzumab ozogamicin (Besponsa®) è indicato in monoterapia nei pazienti adulti con leucemia linfoblastica acuta, positiva a CD22, recidivante o refrattaria. I pazienti con positività al cromosoma Philadelphia devono essere refrattari ad almeno un inibitore delle tirosinchinasi ([Besponsa | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Brentuximab vedotin (Adcetris®) è impiegato nei pazienti adulti secondo le seguenti indicazioni:

- Linfoma di Hodgkin, CD30⁺ e precedentemente non trattato. Negli stadi III e IV, il farmaco viene somministrato in associazione a doxorubicina, vinblastina e dacarbazina. Nello stadio IIB, la somministrazione avviene in associazione a etoposide, ciclofosfamide, doxorubicina, dacarbazina e desametasone. Tuttavia, quest'ultima associazione può essere adottata anche negli stadi III e IV.
- Linfoma di Hodgkin, CD30⁺, in seguito a trapianto autologo di cellule staminali, nei pazienti ad alto rischio di recidiva o progressione oppure con malattia recidivante o refrattaria
- Linfoma di Hodgkin, CD30⁺ e precedentemente trattato con almeno due terapie, quando il trapianto autologo di cellule staminali o la polichemioterapia non siano indicati

- Linfoma anaplastico sistemico a grandi cellule, precedentemente non trattato. Il farmaco viene somministrato in associazione a ciclofosfamide, doxorubicina e prednisone, rimpiazzando la vincristina nello schema polichemioterapico CHOP (6)
- Linfoma anaplastico sistemico a grandi cellule, recidivante o refrattario
- Linfoma cutaneo a cellule T, CD30⁺ e precedentemente trattato con almeno una terapia sistemica ([Adcetris | European Medicines Agency \(EMA\)](#))

Polatuzumab vedotin (Polivy®) ha ottenuto la designazione di farmaco orfano ed è indicato per il trattamento del linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL, *Diffuse large B-cell lymphoma*), una patologia rara. Nei pazienti adulti precedentemente non trattati, il suo impiego è autorizzato in associazione a rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina e prednisone. Nei pazienti adulti con DLBCL, recidivante o refrattaria, l'impiego è invece autorizzato in associazione a bendamustina e rituximab, nei casi in cui non si possa ricorrere al trapianto di cellule staminali ematopoietiche ([Polivy | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Belantamab mafodotin (Blenrep®) è indicato per il trattamento di pazienti adulti con mieloma multiplo, recidivante o refrattario. Il suo impiego è autorizzato in associazione a bortezomib e desametasone oppure, nel caso specifico di malattia refrattaria a lenalidomide, in associazione a pomalidomide e desametasone ([Blenrep | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Loncastuximab tesirine (Zynlonta®) è indicato in monoterapia per il trattamento di pazienti adulti con DLBCL o linfoma a cellule B di alto grado, recidivanti o refrattari a due o più linee di terapia sistemica ([Zynlonta | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

4.4.1.2 Indicazioni terapeutiche nelle neoplasie solide

Trastuzumab emtansine (Kadcyla®) è indicato, in monoterapia, per il trattamento adiuvante di pazienti adulti con carcinoma alla mammella in stadio iniziale, HER2⁺. Nello specifico, viene somministrato nei casi di malattia invasiva

e residua a livello della mammella e/o dei linfonodi dopo una terapia neoadiuvante a base di taxani e *target therapy* anti-HER2.

Trastuzumab emtansine è altresì indicato, in monoterapia, per i pazienti adulti con carcinoma alla mammella, HER2⁺, localmente avanzato o metastatico, precedentemente trattato con trastuzumab e un taxano ([Kadcyla | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Trastuzumab deruxtecan (Enhertu®) è indicato, in monoterapia, per i pazienti adulti con una delle seguenti neoplasie solide, HER2⁺:

- Carcinoma alla mammella, metastatico o localmente avanzato, precedentemente trattato con una o più linee di terapia anti-HER2
- Carcinoma alla mammella, metastatico o localmente avanzato, HR⁺, HER2-*low* o HER2-*ultralow*, precedentemente trattato con almeno una terapia ormonale
- Carcinoma alla mammella, metastatico o localmente avanzato, HER2-*low*, precedentemente trattato con un farmaco chemioterapico o recidivante entro sei mesi dal completamento di una chemioterapia adiuvante
- Tumore al polmone “non a piccole cellule”, avanzato, positivo per mutazioni attivanti HER2. È indicato nei pazienti precedentemente trattati con un composto di coordinazione del platino
- Adenocarcinoma gastrico o della giunzione gastroesofagea, in fase avanzata, nei pazienti precedentemente trattati con trastuzumab ([Enhertu | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Datopotamab deruxtecan (Datroway®) è indicato, in monoterapia, per il trattamento di pazienti adulti con carcinoma mammario HR⁺ e HER2⁻, non resecabile o metastatico, precedentemente trattato con una terapia ormonale e almeno una linea di chemioterapia nella malattia avanzata ([Datroway | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Sacituzumab govitecan (Trodelvy®) è indicato, in monoterapia, per il trattamento di pazienti adulti con TNBC localmente avanzato o metastatico, precedentemente trattato con due o più linee di terapia sistemica.

È inoltre indicato per il trattamento del carcinoma mammario HR⁺ e HER2⁻, localmente avanzato o metastatico, nei pazienti adulti precedentemente trattati con una terapia ormonale e due o più linee di terapia sistemica ([Trodelvy | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Enfortumab vedotin (Padcev®), in associazione a pembrolizumab, rappresenta la prima linea di trattamento nei pazienti adulti con carcinoma uroteliale, localmente avanzato o metastatico. È anche indicato, in monoterapia, nei pazienti precedentemente trattati con un composto di coordinazione del platino e un agente anti-PD-L1 (Ligando di Morte Programmata 1) o anti-PD-1 (Recettore di Morte Programmata 1) ([Padcev | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Mirvetuximab soravtansine (Elahere®), poiché è stato sviluppato per il carcinoma dell'ovario, che è considerato una patologia rara, ha ottenuto la designazione di farmaco orfano. È indicato, in monoterapia, nelle pazienti adulte con carcinoma epiteliale dell'ovaio, della tuba di Falloppio e del peritoneo, FRα⁺. Tali neoplasie devono essere state precedentemente trattate con una-tre linee di terapia sistemica e risultare resistenti alla terapia con un composto di coordinazione del platino ([Elahere | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

Tisotumab vedotin (Tivdak®) è indicato, in monoterapia, nelle pazienti adulte con carcinoma della cervice uterina, recidivante o metastatico dopo precedente terapia sistemica ([Tivdak | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

4.4.2 Applicazioni non oncologiche degli ADC

Lo sviluppo degli ADC non si limita all'ambito oncologico, ma si sta estendendo anche a patologie non oncologiche. In particolare, la ricerca attuale è concentrata sull'impiego degli ADC nel trattamento di alcune malattie autoimmuni e infettive (43).

Nell'ambito delle malattie autoimmuni, l'ABBV-3373, un *Antibody-steroid conjugate*, è attualmente in fase di sviluppo clinico. Tale ADC è costituito dal mAb

adalimumab, anticorpo anti-TNF, coniugato ad un modulatore del recettore dei glucocorticoidi. Sviluppato per il trattamento di pazienti con artrite reumatoide da moderata a grave, ABBV-3373 è stato valutato in uno studio clinico di fase II (NCT03823391), nel quale ha mostrato un beneficio clinico rispetto a adalimumab (6) (43).

Per quanto concerne le malattie infettive citiamo il DSTA4637S, un *Antibody-Antibiotic Conjugate* (AAC) che ha raggiunto la fase di sviluppo clinico (NCT02596399, NCT03162250). Tale ADC è costituito da una IgG1 umana diretta verso un antigene della parete cellulare di *Staphylococcus aureus*, la β -N-acetilglucosammina dell'acido teicoico. L'antibiotico coniugato al mAb è costituito da un derivato della rifamicina (6) (43).

4.5 Effetti indesiderati

Gli effetti indesiderati degli ADC possono essere riconducibili a meccanismi di tossicità *off-target*, quando non dipendono dall'interazione con il TAA, oppure a meccanismi di tossicità *on-target*, quando dipendono dall'interazione con il TAA espresso dalle cellule dei tessuti sani (41).

4.5.1 Tossicità off-target

Le evidenze precliniche e cliniche attualmente disponibili indicano che la tossicità dose-limitante degli ADC è attribuibile prevalentemente a meccanismi *off-target*. In particolare, il profilo di sicurezza degli ADC risulta influenzato dalla specifica combinazione *linker/payload*. È stato infatti osservato che ADC diretti verso differenti TAA, ma che incorporano lo stesso *linker* e lo stesso *payload*, tendono a manifestare i medesimi effetti indesiderati. Un esempio è costituito dalla combinazione valina-citrullina/MMAE, incorporata dal brentuximab vedotin, polatuzumab vedotin, enfortumab vedotin, tisotumab vedotin e telisotuzumab vedotin (al momento approvato, con modalità accelerata, solo da FDA) che è frequentemente associata a mielotossicità, sepsi e neuropatie periferiche (41).

Le evidenze cliniche mostrano che, indipendentemente dalla natura del *linker*, il profilo di tossicità degli ADC è attribuibile al profilo farmacodinamico del solo *payload*. Ne è un esempio il caso di due ADC, mirvetuximab soravtansine e

belantamab mafodotin, caratterizzati per avere il *linker*, il target ed indicazioni cliniche distinte, ma che incorporano un inibitore del fuso mitotico (rispettivamente DM4 e MMAF). Nonostante tali differenze, infatti, i due ADC condividono specifiche reazioni avverse, ossia visione offuscata, secchezza oculare e riduzione dell'acuità visiva. In definitiva, tale tossicità oculare, di cui attualmente non si conosce il meccanismo di insorgenza, sembra essere un potenziale effetto di classe condiviso dagli ADC che incorporano come *payload* un agente anti-tubulina (6) (41).

4.5.1.1 Meccanismi di tossicità off-target

L'esposizione dei tessuti *off-target* al *payload* può avvenire attraverso diversi meccanismi.

In presenza di un *linker* instabile, il *payload* può essere rilasciato prematuramente nella circolazione sistemica e diffondere attraverso le membrane biologiche, esercitando così la propria azione citotossica anche nelle cellule prive del TAA. Questo meccanismo di tossicità *off-target* è tipico degli ADC che incorporano un *linker* scindibile associato a un *payload* lipofilo.

Un esempio è rappresentato dagli ADC che incorporano le combinazioni *linker/payload* valina-citrullina/MMAE e SPBD/DM4, frequentemente associati a neuropatie periferiche. La neurotossicità osservata è attribuibile al rilascio sistemico di tali agenti anti-tubulina che, una volta internalizzati nei nervi periferici, sono in grado di interferire con la dinamicità dei microtubuli e quindi con la movimentazione delle vescicole sinaptiche dal soma al terminale assonale (41).

L'internalizzazione cellulare degli ADC mediata dal legame tra la regione Fc del mAb e gli Fc γ R rappresenta un ulteriore meccanismo di tossicità *off-target* (11). Tale meccanismo risulta particolarmente rilevante in presenza di aggregati di ADC. Ricordiamo che, all'interno della stessa miscela di ADC, la presenza di specie caratterizzate da valori elevati di DAR, e quindi da una maggiore idrofobicità, è associata ad un aumento del rischio di aggregazione (15) (41).

Un primo esempio di tossicità *off-target* mediata da questo meccanismo è rappresentato dalla trombocitopenia associata al trastuzumab emtansine. Studi

in vivo hanno dimostrato che tale ADC viene internalizzato nei megacariociti attraverso un processo di endocitosi mediata dal recettore Fc γ RIIa (41). È stato tuttavia evidenziato come l'internalizzazione del trastuzumab emtansine nei megacariociti possa avvenire anche tramite un meccanismo Fc γ R-indipendente, in particolare attraverso la macropinosi (16) (41).

Un ulteriore esempio è costituito dalla tossicità polmonare associata agli ADC anti-HER2. Il trastuzumab emtansine, così come il trastuzumab deruxtecan, è infatti frequentemente associato allo sviluppo di malattia polmonare interstiziale e/o polmonite. Sebbene il meccanismo patogenetico non sia ancora pienamente compreso, le evidenze disponibili suggeriscono il ruolo dell'internalizzazione di tali ADC nei macrofagi alveolari mediante gli Fc γ R. Studi *in vivo* hanno dimostrato che queste cellule esprimono elevati livelli di Fc γ R, a fronte di una bassa espressione di HER2 (41).

Ulteriori recettori in grado di mediare l'internalizzazione degli ADC nei tessuti *off-target* sono rappresentati dai recettori del mannosio, espressi dalle cellule di Kupffer e dalle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici. Tali recettori potrebbero contribuire a spiegare l'epatotossicità associata al trastuzumab emtansine (41).

Infine, un altro meccanismo di tossicità *off-target* degli ADC è rappresentato dalla loro immunogenicità. L'attivazione del sistema immunitario può indurre la produzione di ADA in grado di riconoscere e legare ciascun costituente dell'ADC, inclusi il *linker* e il *payload* (15). In tal senso valgono le medesime considerazioni fatte in precedenza (vedi paragrafo 4.3.3) in relazione all'impatto che la natura del mAb ed il DAR hanno sull'attivazione della risposta immunitaria adattativa (19) (15) (20). Qualora gli immunocomplessi ADC/ADA non vengano internalizzati dalle cellule del sistema immunitario, ma siano captati da cellule non bersaglio, può verificarsi tossicità *off-target* (15).

4.5.2 Tossicità on-target

Oltre ai meccanismi di tossicità *off-target*, la tossicità degli ADC può dipendere, sebbene in misura minore, anche da meccanismi di tossicità *on-target*, legati all'interazione dell'ADC con il proprio TAA espresso, a basso livello, anche da cellule di tessuti sani (41).

Un esempio è rappresentato dall'epatotossicità osservata con trastuzumab emtansine, il cui meccanismo appare in parte indipendente dall'internalizzazione mediata dagli Fc γ R e dai recettori del mannosio espressi dagli epatociti. È stato dimostrato, infatti, che il recettore HER2 è espresso anche dagli epatociti sani e che, in modelli *in vitro*, l'internalizzazione del trastuzumab emtansine mediata da HER2 è in grado di indurre morte cellulare, dimostrando il contributo di questo meccanismo *on-target* (41).

5 Sacituzumab govitecan

Sacituzumab govitecan costituisce il primo ADC anti-TROP2 ad essere stato approvato dalla autorità regolatoria europea e statunitense e rappresenta sia un'innovazione tecnologica nello sviluppo degli ADC, che una svolta clinica nel trattamento del TNBC, localmente avanzato o metastatico (7) ([Trodelvy | European Medicines Agency \(EMA\)](#)).

5.1 Carcinoma mammario TNBC

Il carcinoma mammario rappresenta la neoplasia più frequente nel genere femminile. La probabilità di sopravvivenza varia significativamente in base alla stadiazione del tumore. In generale, un carcinoma mammario diagnosticato in fase precoce è caratterizzato da una probabilità di sopravvivenza a cinque anni pari al 96%, al confronto con il 38% nei casi diagnosticati in fase avanzata. Di tutti i casi di decesso per carcinoma mammario, il *setting* metastatico ne rappresenta infatti la principale causa (44).

Oltre alla stadiazione, la prognosi di un carcinoma mammario dipende anche dal sottotipo biologico. La diagnosi di tale neoplasia prevede, infatti, la valutazione istologica del livello di espressione dei seguenti tre recettori: recettore degli estrogeni, recettore del progesterone e HER2 (44).

Il TNBC, che costituisce circa il 20% di tutti i casi di carcinoma mammario, è caratterizzato da un livello di espressione dei recettori degli estrogeni e del progesterone inferiore all'1% e da negatività a HER2 (15) (45).

Tra tutti i sottotipi biologici di carcinoma mammario, il TNBC rappresenta quello associato ad una prognosi peggiore. Tale esito è riconducibile, prima di tutto, alla sua biologia altamente invasiva, che comporta comunemente metastasi all'encefalo, al polmone e all'apparato scheletrico. A ciò si aggiunge una scarsa risposta clinica ai trattamenti attualmente disponibili, associata a recidive più frequenti e precoci rispetto ad altri sottotipi di carcinoma mammario (46) (47).

5.1.1 Trattamento farmacologico del TNBC in fase precoce

Vista la “tripla negatività” che lo caratterizza, il TNBC non consente il ricorso a all’ormonoterapia e/o alla terapia anti-HER2. Di conseguenza, il trattamento di prima linea, in *setting* neoadiuvante o adiuvante, si basa essenzialmente sull’impiego della chemioterapia classica. Tuttavia, anche in presenza di una diagnosi precoce, la responsività del TNBC a tale approccio terapeutico è spesso connotata da chemoresistenza associata a un’elevata incidenza di recidiva di malattia (48) (46).

Recentemente, la valutazione della positività del TNBC ad altri biomarcatori rilevanti, quali PD-L1 e le mutazioni germinali dei geni BRCA1 e BRCA2 (gBRCAm), ha permesso l’impiego di terapie mirate (44) (48).

In particolare, la gestione del TNBC in fase precoce gBRCAm⁺ può essere ottimizzata mediante l’impiego degli inibitori della poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARPi), quali olaparib e talazoparib (44) (48).

I pazienti PD-L1⁺, che rappresentano circa il 40% di tutte le diagnosi di TNBC, possono essere trattati mediante l’impiego, in associazione alla chemioterapia, del pembrolizumab o dell’atezolizumab. Tuttavia, la responsività del TNBC precoce all’immunoterapia anti-PD-1/PD-L1 è frequentemente caratterizzata da casi di recidiva di malattia (44) (48) (49).

Nonostante l’ottimizzazione della gestione in prima linea del TNBC, grazie all’introduzione delle terapie mirate, attualmente il tasso di sopravvivenza a cinque anni dei pazienti con diagnosi di TNBC in fase precoce è pari al 65% (46).

5.1.2 Trattamento farmacologico del TNBC in fase avanzata

Rispetto al TNBC in fase precoce, la forma metastatica (mTNBC), è caratterizzata da una prognosi ulteriormente sfavorevole, con un tasso di sopravvivenza a cinque anni pari al 10-15% (46) (49).

L’mTNBC può presentarsi sia come recidiva di malattia, in seguito al trattamento del TNBC in fase precoce, sia come neoplasia *de novo*. Il primo caso, che rappresenta la modalità di presentazione più frequente, è associato alla

selezione di cloni cellulari chemoresistenti; perciò, mostra un comportamento biologico particolarmente aggressivo.

Al contrario, il trattamento del mTNBC *de novo*, ovvero diagnosticato per la prima volta in fase metastatica, è generalmente associato ad una prognosi relativamente migliore (44) (48).

Il trattamento di prima linea del mTNBC *de novo* (o recidivante) e del TNBC localmente avanzato prevede, innanzitutto, la valutazione della positività a PD-L1 e gBRCAm (44).

Per il trattamento del mTNBC gBRCAm⁺ vi è l'indicazione all'uso dei PARPi (olaparib e talazoparib) (44).

Per quanto concerne la positività a PD-L1, l'impiego in prima linea della combinazione atezolizumab/nab-paclitaxel è indicato per il trattamento del mTNBC *de novo* o del mTNBC recidivante, con un intervallo libero da malattia (DFI, *Disease-Free Interval*), dal termine della terapia sistemica, di 12 mesi. L'impiego in prima linea delle combinazioni pembrolizumab/nab-paclitaxel, pembrolizumab/paclitaxel, pembrolizumab/gemcitabina-carboplatino è indicato, invece, nel trattamento del mTNBC *de novo* o del mTNBC recidivante, con un DFI di 6 mesi dal completamento della chemioterapia neoadiuvante o adiuvante (44).

Il trattamento di prima linea del mTNBC PD-L1⁻ e gBRCAm *wild-type* si basa essenzialmente sulla chemioterapia classica, in particolare sull'uso di antracicline o taxani, in monoterapia o in varie combinazioni (44).

Per quanto riguarda il trattamento di seconda linea e delle linee successive l'approccio terapeutico classico nel mTNBC o nel TNBC localmente avanzato si è storicamente basato sull'impiego di agenti chemioterapici, tra cui la capecitabina, la gemcitabina, la vinorelbina, l'eribulina, il carboplatino, il cisplatino e il nab-paclitaxel (50).

In questo contesto di limitate opzioni terapeutiche e di prognosi sfavorevole, l'approvazione, nel 2020 da parte di FDA e nel 2021 da parte di EMA, dell'ADC sacituzumab govitecan ha rappresentato un importante avanzamento clinico nel trattamento del mTNBC e del TNBC localmente avanzato (7) (47). Costituendo

un'alternativa terapeutica più efficace rispetto alla chemioterapia classica, sacituzumab govitecan è attualmente indicato per i pazienti adulti con TNBC localmente avanzato o metastatico, precedentemente trattato con almeno due terapie sistemiche. In accordo con le linee guida ESMO (European Society For Medical Oncology) è considerato l'opzione terapeutica preferenziale per i pazienti caratterizzati da progressione della malattia dopo trattamento con antracicline e taxani (44) (50) ([Trodelvy | European Medicines Agency \(EMA\)](#)). In particolare, l'impiego del sacituzumab govitecan è suggerito quando il paziente abbia anche ricevuto, in *setting* adiuvante, il carboplatino e la capecitabina e presenti la mutazione germinale di BRCA1/2 (44).

In caso di progressione della malattia dopo trattamento con sacituzumab govitecan, le opzioni terapeutiche successive si basano essenzialmente sull'impiego dei chemioterapici eribulina, capecitabina e vinorelbina (44).

5.2 Target terapeutico e struttura del sacituzumab govitecan

5.2.1 Trophoblast Cell Surface Antigen 2

TROP2 è una glicoproteina di superficie cellulare che deve il suo nome al sito in cui è stata identificata per la prima volta, ossia il trofoblasto umano (51). Questo tessuto rappresenta uno dei tre diversi strati cellulari che, nella placenta umana, si interpongono tra la circolazione sanguigna materna e quella fetale (10). TROP2 è inoltre espresso dalle cellule epiteliali umane, in particolare nell'epitelio squamoso stratificato della cervice, dell'esofago, della cute, nonché nell'epitelio cubico e colonnare della ghiandola mammaria, del rene, del pancreas, dei dotti biliari e della prostata (51).

Codificato dall'oncogene TACSTD2, TROP2 ricopre un ruolo importante nella trasduzione del segnale intracellulare del calcio ed è coinvolto nella proliferazione, nella sopravvivenza e nell'invasività cellulare. La sua sovraespressione si osserva in molteplici neoplasie solide di origine epiteliale ed è associata a progressione della malattia (5) (20) (51) (52). Tale alterazione, unitamente alla sua scarsa presenza nei tessuti sani, consente di identificare in TROP2 un possibile target specifico e selettivo della cellula neoplastica (53).

Risultando alterato in circa l'80-90% dei casi di TNBC, TROP2 ha rappresentato il target terapeutico ideale per lo sviluppo di una terapia mirata (7) (51).

5.2.2 Struttura del sacituzumab govitecan

L'ADC sacituzumab govitecan è costituito dal mAb hRS7 coniugato, mediante il *linker* CL2A, al *payload* SN-38 (Figura 16) (5) (20).

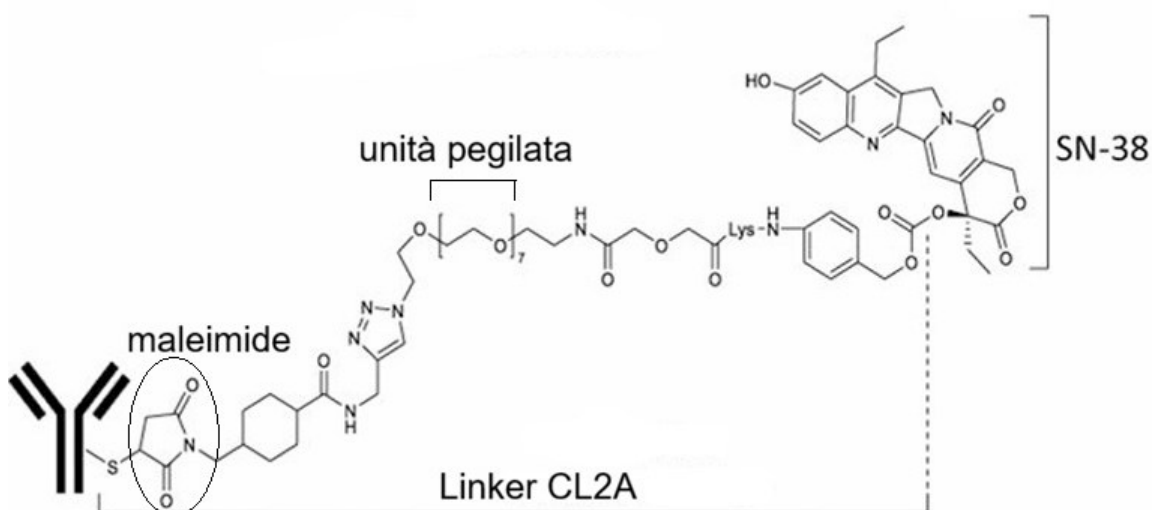


Figura 16. Struttura del sacituzumab govitecan. Adattata da (16).

L'immunoglobulina hRS7 consiste in una IgG1 umanizzata anti-TROP2 (20).

I siti di coniugazione impiegati per l'accoppiamento farmaco-anticorpo sono rappresentati dagli otto residui di cisteina derivanti dalla riduzione dei quattro ponti disolfuro intercatena. Questa tecnica ha consentito di ottenere un valore elevato di DAR, pari a 7.6. Diversamente da quanto osservato per altri ADC con lo stesso DAR, nel caso del sacituzumab govitecan tale valore è associato a un buon profilo di sicurezza ed efficacia. Ciò è stato dimostrato in uno studio preclinico condotto su un modello murino di topo nudo sottoposto a xenotrapianto della linea cellulare tumorale SK-MES-1. Questo comportamento *in vivo* è attribuibile all'inserimento di sette unità pegilate nella struttura del *linker*, che aumenta l'idrofilia complessiva dell'ADC (Figura 16) (54).

Oltre alla pegilazione, la struttura del *linker* CL2A è funzionalizzata con un maleimide. Tale molecola, reagendo con i residui di cisteina del mAb, forma un

legame tioetere che determina l'accoppiamento del complesso *linker/payload* all'anticorpo (*Figura 16*) (54) (55).

CL2A conferisce al sacituzumab govitecan una buona stabilità nella circolazione sistemica. Questo parametro, misurato come il tempo necessario affinché il 50% del *payload* venga rilasciato dall'ADC ($t_{1/2}$), è stato valutato in uno studio condotto su un modello murino di topo nudo con xenotrapianto tumorale umano SK-MES-1. CL2A ha mostrato una stabilità plasmatica ($t_{1/2}$ ~20 ore) circa due volte superiore rispetto all'ambiente acido caratteristico del microambiente tumorale e dei lisosomi ($t_{1/2}$ ~13 ore). In particolare, il rilascio del *payload* al sito d'azione è controllato dall'idrolisi acida del carbonato connesso all'ossidrilile in posizione 20 di SN-38 (*Figura 16*) (54).

Infine, la 7-etil-10-idrossicamptotecina (SN-38), che consiste nel metabolita attivo dell'irinotecan, un inibitore della TOPO-1, costituisce il *payload* di tale ADC (51) (54).

5.3 Farmacologia del sacituzumab govitecan

5.3.1 Meccanismo d'azione

Sacituzumab govitecan, mediante l'anticorpo hRS7, riconosce e lega TROP2 espresso sulla superficie delle cellule neoplastiche. Tale interazione è seguita dall'internalizzazione dell'ADC tramite l'endocitosi del complesso ADC/TAA. In seguito all'integrazione dell'endosoma tardivo nei lisosomi, l'ambiente acido lisosomiale determina l'idrolisi del carbonato di CL2A, con conseguente rilascio del *payload*. L'SN-38 liberato può quindi diffondere nella cellula, raggiungere il nucleo e legare la TOPO-1. La formazione del complesso SN-38/TOPO-1 previene la rilegatura delle rotture a singolo filamento del DNA, operate dall'enzima stesso. Il conseguente danno al DNA indotto dall'azione di SN-38, che risulta 100-1000 volte più potente rispetto all'irinotecan, determina l'apoptosi della cellula tumorale (5) (54) ([*Trodelvy, INN-sacituzumab govitecan](#)).

All'azione di SN-38 si aggiunge l'attività citotossica operata dalle cellule natural killer. L'IgG1 hRS7 è, infatti, in grado di riconoscere e legare i recettori Fc γ R espressi da queste cellule, attivando dunque il meccanismo di ADCC (5).

Infine, grazie alla natura scindibile del *linker* CL2A e all'adeguata lipofilia di SN-38, sacituzumab govitecan è in grado di indurre il cosiddetto *bystander effect*, risultando efficace anche nei pazienti con TNBC caratterizzato da un'espressione eterogenea di TROP2 (5).

5.3.2 Efficacia e sicurezza clinica nel TNBC: lo studio ASCENT

Il beneficio clinico del sacituzumab govitecan rispetto alla chemioterapia classica nel trattamento del TNBC localmente avanzato o metastatico è stato valutato all'interno dello studio clinico ASCENT (NCT02574455) (45).

5.3.2.1 Disegno dello studio

Lo studio ASCENT consiste in uno studio di fase III, internazionale, multicentrico (230 centri distribuiti in 7 paesi, tra cui Stati Uniti, Belgio, Canada, Francia, Germania, Spagna, Regno Unito), in aperto e randomizzato, in cui sono stati arruolati 529 pazienti di entrambi i sessi e con età uguale o maggiore ai 18 anni (45).

Il primo criterio di eleggibilità con cui è stata identificata la popolazione in studio consiste nell'inclusione dei pazienti con TNBC refrattario o recidivante dopo almeno due regimi terapeutici standard in *setting* avanzato o metastatico. Tuttavia, se il TNBC si presentava come progressione della malattia entro 12 mesi dal termine del trattamento del TNBC in fase precoce, la terapia in *setting* adiuvante/neoadiuvante è stata considerata come uno dei due regimi terapeutici precedenti. L'uso dei PARPi è stato considerato come una delle due terapie precedenti nei pazienti gBRCAm⁺ (45) ([*Trodelvy, INN-sacituzumab govitecan](#)). Ulteriori criteri di inclusione comprendevano una precedente esposizione a un taxano, l'idoneità a uno dei chemioterapici da impiegare come trattamento scelto dal medico (TPC, *Treatment of Physician's Choice*) nel gruppo di controllo e un TNBC valutabile mediante tomografia computerizzata o risonanza magnetica. La valutazione ematochimica del paziente richiedeva un emocromo nei limiti della

norma, nonché una funzionalità renale ed epatica adeguate. Nel caso di metastasi cerebrali, i pazienti eleggibili presentavano un quadro stabile, dunque con metastasi precedentemente trattata, non in progressione e con un periodo di *washout* di almeno quattro settimane dall'eventuale trattamento con corticosteroidi ad alte dosi (> 20 mg/die). Infine, era richiesto un periodo di *washout* di due settimane dall'ultima terapia sistemica del TNBC, nonché dalla guarigione da tutte le tossicità acute, ad esclusione dell'alopecia e delle neuropatie periferiche. In particolare, i pazienti con neuropatie periferiche di grado ≥ 2 risultavano eleggibili allo studio, ma non idonei al TPC con vinorelbina (45).

Da questo studio sono stati esclusi i pazienti con metastasi ossea, altre neoplasie pregresse con un DFI inferiore a 3 anni (eccetto i carcinomi cutanei non melanoma e il carcinoma della cervice), sindrome di Gilbert nota, angina instabile, infarto miocardico, insufficienza cardiaca congestizia, malattia infiammatoria intestinale cronica attiva o perforazione gastrointestinale, virus dell'immunodeficienza umana (HIV), infezione da epatite B o C attiva, somministrazione di un vaccino vivo nei 30 giorni precedenti o che erano stati precedentemente trattati con irinotecan. Costituivano ulteriori criteri di esclusione lo stato di gravidanza e di allattamento, nonché le donne e gli uomini in età fertile non disposti ad adottare misure contraccettive efficaci durante il trattamento e, rispettivamente, fino a 3 e 6 mesi dopo l'ultima dose del farmaco assegnato (45) ([*Trodelvy, INN-sacituzumab govitecan](#)).

I pazienti selezionati sono stati randomizzati a ricevere sacituzumab govitecan 10 mg/Kg tramite infusione endovenosa lenta il giorno 1 e il giorno 8 di un ciclo di trattamento di 21 giorni oppure un TPC selezionato tra eribulina, capecitabina, gemcitabina o vinorelbina, somministrate, come monoterapia, secondo la posologia e il modo di somministrazione approvati. Sia il braccio di trattamento che quello di controllo sono stati trattati fino a progressione della malattia, decesso, tossicità inaccettabile o ritiro del consenso, a seconda di quale evento si è verificato prima ([*Trodelvy, INN-sacituzumab govitecan](#)) (56).

L'*endpoint* primario con cui è stata valutata l'efficacia del trattamento con sacituzumab govitecan consiste nella sopravvivenza libera da progressione (PFS, *Progression-Free Survival*) nei pazienti senza metastasi cerebrali (BMNeg, *Brain Metastasis Negative*) al momento della randomizzazione, valutata mediante revisione centrale indipendente in cieco (BICR, *Blinded, Independent, Centralised Review*). Per PFS si intende il tempo dalla randomizzazione fino alla data della prima progressione tumorale oggettiva secondo i criteri di valutazione della risposta nei tumori solidi (RECIST, *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) v1.1 o del decesso per qualsiasi causa, a seconda di quale si è verificata prima. Nello specifico, come data della progressione si considera la data dell'ultima valutazione delle lesioni bersaglio (mediante tomografia computerizzata o risonanza magnetica) che mostra un aumento di almeno il 20% della somma dei diametri delle lesioni *target* (prendendo come riferimento la somma più piccola durante lo studio, che può coincidere o meno con quella basale) o la data della comparsa di nuove lesioni (45) (56) (57) ([*Trodelvy, INN-sacituzumab govitecan](#)).

Tra gli *endpoint* secondari di efficacia figuravano:

- PFS nella popolazione complessiva, valutata secondo i criteri RECIST v1.1
- sopravvivenza globale (OS, *Overall Survival*) nei pazienti BMNeg e in tutta la popolazione in studio. Per OS si intende il tempo dalla randomizzazione fino al decesso per qualsiasi causa
- tasso di risposta obiettiva (ORR, *Objective Response Rate*) nei pazienti BMNeg. Per ORR si intende la percentuale di pazienti che hanno avuto la migliore risposta complessiva, valutata come somma della risposta completa (CR) e della risposta parziale (PR), in relazione alla dimensione della popolazione valutata. In particolare, per CR si intende la scomparsa di tutte le lesioni tumorali, la normalizzazione dei livelli dei marcatori tumorali e l'assenza di nuove lesioni. Per PR, invece, si intende l'assenza di nuove lesioni, associata alla riduzione di almeno il 30% nella somma

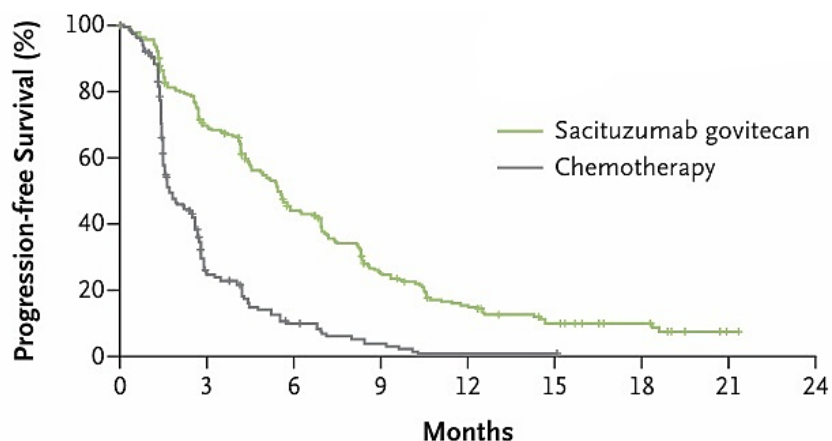
dei diametri delle lesioni *target*, prendendo come riferimento la somma dei diametri massimi basale

- durata della risposta (DOR, *Duration Of Response*) nei pazienti BMNeg. Per DOR si intende il numero di giorni tra la prima data in cui è stata documentata una risposta CR o PR e la data di progressione o decesso (45) (57).

5.3.2.2 Risultati di efficacia nella popolazione BMNeg

L'analisi primaria di efficacia è stata condotta sulla popolazione BMNeg (n=468), costituita da 235 pazienti trattati con sacituzumab govitecan e 233 trattati con TPC. La valutazione delle lesioni bersaglio è stata eseguita ogni 6 settimane nei primi 9 mesi e successivamente ogni 9 settimane, fino a progressione della malattia (45).

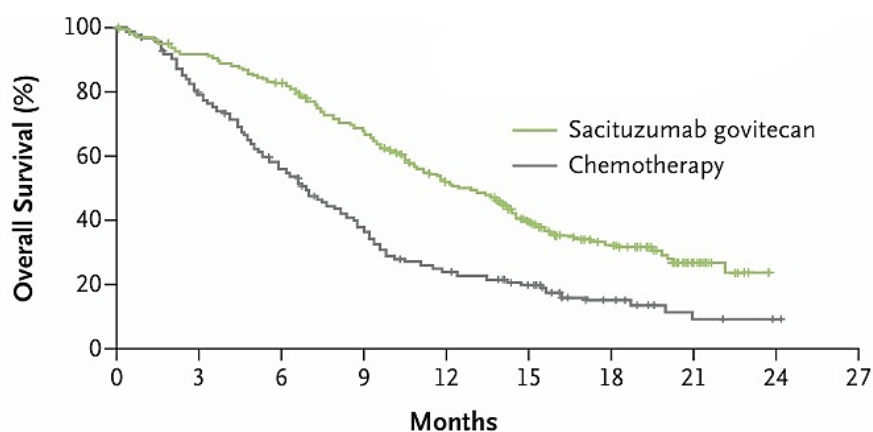
Sacituzumab govitecan ha determinato una PFS mediana di 5.6 mesi (intervallo di confidenza [IC] 95%: 4.3, 6.3) rispetto a 1.7 mesi (IC 95%: 1.5, 2.6) con TPC. L'*hazard ratio* (HR) per progressione della malattia o decesso era 0.41 (IC 95%: 0.32, 0.52; P-Value < 0.0001), indicando un miglioramento statisticamente significativo della PFS nei pazienti trattati con sacituzumab govitecan. Tale beneficio clinico è mostrato graficamente mediante la curva di Kaplan-Meier, che mette in relazione la probabilità di PFS (%) in funzione del tempo (mesi) (Figura 17) (56).



Numero di pazienti a rischio								
Sacituzumab govitecan	235	154	91	49	28	15	9	1
Chemotherapy	233	39	14	5	1	1	0	0

Figura 17. Curva di Kaplan-Meier per la PFS nella popolazione BMNeg. Adattata da (56).

Per quanto riguarda gli *endpoint* secondari di efficacia, sacituzumab govitecan ha determinato un miglioramento statisticamente significativo anche di questi parametri. In particolare, nel braccio trattato con sacituzumab govitecan la mediana di OS era di 12.1 mesi (IC 95%: 10.7, 14.0) rispetto a 6.7 mesi (IC 95%: 5.8, 7.7) nel braccio trattato con TPC. L'HR per decesso era 0.48 (IC 95%: 0.38, 0.59; P-Value < 0.0001). Tale beneficio clinico è rappresentato graficamente mediante la curva di Kaplan-Meier, che mostra la probabilità di OS (%) in funzione del tempo (mesi) (Figura 18) (56).



Numero di pazienti a rischio									
Sacituzumab govitecan	235	214	190	153	107	70	37	13	0
Chemotherapy	233	173	117	74	45	30	11	3	1

Figura 18. Curva di Kaplan-Meier per la OS nella popolazione BMNeg. Adattata da (56).

L'efficacia di sacituzumab govitecan è stata confermata anche da una ORR del 35% (IC 95%: 28.8, 41.4) rispetto al 5% (IC al 95%: 2.4, 8.3) nei pazienti trattati rispettivamente con sacituzumab govitecan e con TPC (45).

Infine, la DOR ha mostrato un miglioramento a favore di sacituzumab govitecan, con una mediana di 6.3 mesi (IC 95%: 5.5, 7.9) rispetto a 3.6 mesi (IC 95%: 2.8, non stimabile) per TPC. L'HR per progressione della malattia o decesso era 0.41 (IC 95%: 0.15, 1.11; P-Value = 0.0683), indicando un miglioramento della durata della risposta senza tuttavia raggiungere la significatività statistica (45).

5.3.2.3 Risultati di efficacia nella popolazione complessiva

I risultati di efficacia nella popolazione complessiva (n=529, di cui 267 pazienti trattati con sacituzumab govitecan e 262 trattati con TPC) erano in linea con quelli

della popolazione BMNeg. Nello specifico, sacituzumab govitecan ha determinato una PFS mediana di 4.8 mesi (IC 95%: 4.1, 5.8) rispetto a 1.7 mesi (IC 95%: 1.5, 2.5) con TPC. L'HR per progressione della malattia o decesso era 0.43 (IC 95%: 0.35, 0.54; P-Value < 0.0001).

Per quanto riguarda l'OS, sacituzumab govitecan ha mostrato una mediana di 11.8 mesi (IC 95%: 10.5, 13.8) rispetto a 6.9 mesi (IC 95%: 5.9, 7.7) con TPC. L'HR per decesso era 0.51 (IC 95%: 0.41, 0.62; P-Value < 0.0001) ([*Trodelvy, INN-sacituzumab govitecan](#)).

5.3.2.4 Risultati relativi al profilo di sicurezza

Il profilo di sicurezza è stato valutato in tutti i pazienti arruolati nello studio che hanno ricevuto almeno una dose della terapia assegnata (n=482, di cui 258 trattati con sacituzumab govitecan e 224 con TPC), indipendentemente dalla presenza di metastasi cerebrali (45) (56).

Sacituzumab govitecan ha mostrato un profilo di tossicità caratterizzato da mielotossicità e tossicità gastrointestinale, coerentemente con il profilo farmacodinamico del *payload* SN-38. Le reazioni avverse di grado 3-4 più comunemente osservate erano neutropenia (nel 51% dei pazienti trattati con sacituzumab govitecan e nel 33% con TPC), leucopenia (10% e 5%), diarrea (10% e <1%), anemia (8% e 5%) e neutropenia febbrile (6% e 2%). Secondo i criteri comuni di terminologia per gli eventi avversi (CTCAE, *Common Terminology Criteria for Adverse Events*) il grado 3 corrisponde a tossicità severa, mentre il grado 4 indica tossicità potenzialmente pericolosa per la vita. Queste tossicità hanno richiesto modifiche posologiche e l'impiego di terapie di supporto (45) (56).

Gli eventi avversi gravi sono stati osservati in 69 pazienti (26.7%) trattati con sacituzumab govitecan e in 64 pazienti (28.6%) trattati con TPC. Di questi, solo il 15% e l'8% rispettivamente sono stati ritenuti correlati al trattamento ricevuto (45) (56).

La frequenza di riduzioni posologiche e di sospensioni del trattamento dovute a eventi avversi è risultata simile nei due bracci. La riduzione della dose si è

verificata nel 22% dei pazienti trattati con sacituzumab govitecan e nel 26% di quelli trattati con TPC. Analogamente, la sospensione del trattamento a causa di eventi avversi ha interessato il 5% dei pazienti in ciascun gruppo (56).

5.3.2.5 Discussione sui risultati dello studio

In definitiva, i risultati dello studio ASCENT dimostrano una riduzione del 59% del rischio di progressione della malattia e del 52% del rischio di decesso nella coorte di pazienti trattati con sacituzumab govitecan rispetto a quelli sottoposti a TPC (5). Questo risultato è stato confermato dalle analisi condotte sui sottogruppi della popolazione BMNeg, che includevano pazienti di età diversa (<65 anni o ≥65 anni), di razza diversa, di sesso diverso, con differenti numeri di precedenti terapie sistemiche (2 o 3, >3), con precedente trattamento anti-PD-1/PD-L1 (sì o no), con metastasi epatiche (sì o no) e con diagnosi iniziale di TNBC (mTNBC *de novo* o recidivante) (56).

Inoltre, un'analisi esplorativa dei biomarcatori ha valutato l'efficacia in relazione ai livelli di espressione di TROP2 e allo stato di gBRCAm, dimostrando il beneficio del sacituzumab govitecan rispetto al TPC anche nei pazienti con bassi livelli del target terapeutico e indipendentemente dallo stato di gBRCAm (58) ([*Trodelvy, INN-sacituzumab govitecan](#)).

Nonostante le reazioni avverse di grado 3-4 siano state osservate con maggiore frequenza nel braccio trattato con sacituzumab govitecan rispetto al TPC, la terapia può essere gestita mediante modifiche posologiche e l'impiego di terapie di supporto, con sospensione del trattamento a causa di eventi avversi solo nel 5% dei pazienti (56).

6 Conclusioni e sviluppi futuri

Lo sviluppo degli ADC, nato dall'esigenza di realizzare farmaci citotossici selettivi, in grado di combinare il potente effetto citotossico della chemioterapia classica con il *targeting* di precisione degli anticorpi monoclonali, ha raggiunto il miglior compimento con gli ADC di terza generazione. In questo contesto, sacituzumab govitecan rappresenta un esempio emblematico di come questa classe di farmaci possa costituire un avanzamento clinico significativo nel trattamento di neoplasie caratterizzate da limitate opzioni terapeutiche.

Gli ADC sono oggi considerati farmaci promettenti e di successo nella terapia oncologica, mostrando una potenziale applicazione anche in ambiti non oncologici. L'interesse per questa classe di farmaci è suggerito dall'elevato numero di studi clinici attualmente in corso (395 al 18 febbraio 2026, secondo il database ClinicalTrials.gov, filtrando la ricerca per "Recruiting" e "Active, not recruiting" con il termine "Antibody-Drug Conjugate").

Nonostante i progressi raggiunti, alcune sfide caratterizzeranno lo sviluppo futuro degli ADC. Tra queste vi sono l'insorgenza di meccanismi di resistenza, l'inefficacia verso alcune neoplasie e, talvolta, un profilo di tossicità comparabile con quello dei *payload* impiegati come molecole libere. Per superare tali limiti, la ricerca è orientata alla scoperta di nuovi TAA, allo sviluppo di *payload* con meccanismi d'azione differenti, nonché all'ottimizzazione continua della struttura del mAb, del *linker* e del metodo di coniugazione.

7 Bibliografia

1. Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7(1):93.
2. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich’s magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(6):473–80.
3. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol.* 2018; 9:1300.
4. Joo WD, Visintin I, Mor G. Targeted cancer therapy – Are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas.* 2013; 76(4):308–14.
5. Wang R, Hu B, Pan Z, Mo C, Zhao X, Liu G, et al. Antibody–Drug Conjugates (ADCs): current and future biopharmaceuticals. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 2025; 18(1):51.
6. Dumontet C, Reichert JM, Senter PD, Lambert JM, Beck A. Antibody–drug conjugates come of age in oncology. *Nat Rev Drug Discov.* 2023; 22(8):641–61.
7. Chis AA, Dobrea CM, Arseniu AM, Frum A, Rus LL, Cormos G, et al. Antibody–Drug Conjugates—Evolution and Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(13):6969.
8. Rodríguez-Nava C, Ortuño-Pineda C, Illades-Aguilar B, Flores-Alfaro E, Leyva-Vázquez MA, Parra-Rojas I, et al. Mechanisms of Action and Limitations of Monoclonal Antibodies and Single Chain Fragment Variable (scFv) in the Treatment of Cancer. *Biomedicines.* 2023; 11(6):1610.
9. Damelang T, Brinkhaus M, Van Osch TLJ, Schuurman J, Labrijn AF, Rispen T, et al. Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions. *Front Immunol.* 2024; 14:1304365.
10. Pyzik M, Sand KMK, Hubbard JJ, Andersen JT, Sandlie I, Blumberg RS. The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Front Immunol.* 2019; 10:1540.

11. Hoffmann RM, Coumbe BGT, Josephs DH, Mele S, Ilieva KM, Cheung A, et al. Antibody structure and engineering considerations for the design and function of Antibody Drug Conjugates (ADCs). *OncolImmunology*. 2018; 7(3):e1395127.
12. Wei Q, Li P, Yang T, Zhu J, Sun L, Zhang Z, et al. The promise and challenges of combination therapies with antibody-drug conjugates in solid tumors. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2024; 17(1):1.
13. Valle I, Grinda T, Antonuzzo L, Pistilli B. Antibody–drug conjugates in breast cancer: mechanisms of resistance and future therapeutic perspectives. *Npj Breast Cancer*. 2025; 11(1):102.
14. Ma X, Wang M, Ying T, Wu Y. Reforming solid tumor treatment: the emerging potential of smaller format antibody-drug conjugate. *Antib Ther*. 2024; 7(2):114–22.
15. Armstrong GB, Graham H, Cheung A, Montaseri H, Burley GA, Karagiannis SN, et al. Antibody-drug conjugates as multimodal therapies against hard-to-treat cancers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2025; 224:115648.
16. Jin Y, Schladetsch MA, Huang X, Balunas MJ, Wiemer AJ. Stepping forward in antibody-drug conjugate development. *Pharmacol Ther*. 2022; 229:107917.
17. Su Z, Xiao D, Xie F, Liu L, Wang Y, Fan S, et al. Antibody–drug conjugates: Recent advances in linker chemistry. *Acta Pharm Sin B*. 2021; 11(12):3889–907.
18. Long R, Zuo H, Tang G, Zhang C, Yue X, Yang J, et al. Antibody-drug conjugates in cancer therapy: applications and future advances. *Front Immunol*. 2025; 16:1516419.
19. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Narhi LO, et al. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci*. 2016; 105(2):417–30.

20. Riccardi F, Dal Bo M, Macor P, Toffoli G. A comprehensive overview on antibody-drug conjugates: from the conceptualization to cancer therapy. *Front Pharmacol.* 2023; 14:1274088.
21. Tonon G, Rizzolio F, Visentin F, Scattolin T. Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy: From Metallodrugs to Nature-Inspired Payloads. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(16):8651.
22. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. [citato 6 novembre 2025]. A Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Efficacy of MORAb-202 (Herein Referred to as Farletuzumab Ecteribulin), a Folate Receptor Alpha (FR α)-Targeting Antibody-drug Conjugate (ADC) in Participants With Selected Tumor Types (NCT04300556). Disponibile su: [https://clinicaltrials.gov/study/NCT04300556?cond=Cancer&term=%20MORAb-202%20%20\(farletuzumab%20%20ecteribulin\)&rank=1](https://clinicaltrials.gov/study/NCT04300556?cond=Cancer&term=%20MORAb-202%20%20(farletuzumab%20%20ecteribulin)&rank=1)
23. Guo H, Xie H, Huang Y, Jia J, Kong X, Yang Q, et al. The development and evaluation of a tublysine-based antibody-drug conjugate with enhanced tumor therapeutic efficacy. *Front Pharmacol.* 2025; 16:1532104.
24. Izzo D, Ascione L, Guidi L, Marsicano RM, Koukoutzeli C, Trapani D, et al. Innovative payloads for ADCs in cancer treatment: moving beyond the selective delivery of chemotherapy. *Ther Adv Med Oncol.* 2025; 17:17588359241309461.
25. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu>. [citato 10 novembre 2025]. Lumoxiti (moxetumomab pasudotox) - EPAR. Disponibile su: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lumoxiti>
26. Zaťovičová M, Pastoreková S. Modulation of cell surface density of carbonic anhydrase IX by shedding of the ectodomain and endocytosis. *Acta Virol.* 2013; 57(02):257–64.
27. Esapa B, Jiang J, Cheung A, Chenoweth A, Thurston DE, Karagiannis SN. Target Antigen Attributes and Their Contributions to Clinically Approved Antibody-

Drug Conjugates (ADCs) in Haematopoietic and Solid Cancers. *Cancers*. 2023; 15(6):1845.

28. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011; 3(1_suppl):S7–19.

29. Banerjee S, Drapkin R, Richardson DL, Birrer M. Targeting NaPi2b in ovarian cancer. *Cancer Treat Rev*. 2023; 112:102489.

30. Luo M, Wang X, Yu G, Ji J, Li L, Song F. Development of a bispecific antibody–drug conjugate targeting EpCAM and CLDN3 for the treatment of multiple solid tumors. *Exp Hematol Oncol*. 2025; 14(1):33.

31. Ashman N, Bargh JD, Spring DR. Non-internalising antibody–drug conjugates. *Chem Soc Rev*. 2022; 51(22):9182–202.

32. Dal Corso A, Gébleux R, Murer P, Soltermann A, Neri D. A non-internalizing antibody-drug conjugate based on an anthracycline payload displays potent therapeutic activity in vivo. *J Controlled Release*. 2017; 264:211–8.

33. Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021; 19(1):159.

34. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*. 2020; 27(1):1.

35. Blair HA. Telisotuzumab Vedotin: First Approval. *Drugs*. 2025; 85(9):1171–6.

36. Tiller T. Single B cell antibody technologies. *New Biotechnol*. 2011; 28(5):453–7.

37. Hurwitz J, Haggstrom LR, Lim E. Antibody–Drug Conjugates: Ushering in a New Era of Cancer Therapy. *Pharmaceutics*. 2023; 15(8):2017.

38. Hao Y, Song Z. Mechanisms of resistance to antibody-drug conjugates in cancer therapy: molecular basis and therapeutic strategies. *Cancer Drug Resist*

[Internet]. 2025 [citato 26 gennaio 2026]; Disponibile su: <https://www.oaepublish.com/articles/cdr.2025.148>

39. Dong Y, Zhi Y, Li X, Ma M, Ye M, Huang S, et al. Navigating hepatotoxicity of antibody-drug conjugates: from mechanistic insights to clinical and postmarketing evidence. *Front Pharmacol.* 2025; 16:1694436.

40. Gao Y, Xia Y, Chen Y, Zhou S, Fang Y, Yu J, et al. Key considerations based on pharmacokinetic/pharmacodynamic in the design of antibody-drug conjugates. *Front Oncol.* 2025; 14:1459368.

41. Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC Toxicity and Strategies to Increase ADC Tolerability. *Cancers.* 2023; 15(3):713.

42. Ricart AD. Immunoconjugates Against Solid Tumors: Mind the Gap. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 89(4):513–23.

43. Theocharopoulos C, Lialios PP, Samarkos M, Gogas H, Ziogas DC. Antibody-Drug Conjugates: Functional Principles and Applications in Oncology and Beyond. *Vaccines.* 2021; 9(10):1111.

44. Gennari A, André F, Barrios CH, Cortés J, De Azambuja E, DeMichele A, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2021; 32(12):1475–95.

45. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. 2022 [citato 12 febbraio 2026]. Trial of Sacituzumab Govitecan in Participants With Refractory/Relapsed Metastatic Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) (ASCENT). Disponibile su: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02574455?term=nct02574455&rank=1>

46. Almansour NM. Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. *Front Mol Biosci.* 2022; 9:836417.

47. Zagami P, Carey LA. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *Npj Breast Cancer.* 2022; 8(1):95.

48. Morrison L, Okines A. Systemic Therapy for Metastatic Triple Negative Breast Cancer: Current Treatments and Future Directions. *Cancers*. 2023; 15(15):3801.
49. Tolaney SM, De Azambuja E, Kalinsky K, Loi S, Kim SB, Yam C, et al. Sacituzumab Govitecan plus Pembrolizumab for Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2026; 394(4):354–66.
50. Li S, Bao C, Huang L, Wei JF. Current Therapeutic Strategies for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: From Pharmacists' Perspective. *J Clin Med*. 2022; 11(20):6021.
51. Nelson BE, Meric-Bernstam F. Leveraging TROP2 Antibody-Drug Conjugates in Solid Tumors. Vol. 75, *Annual Review of Medicine*. Annual Reviews; 2024. p. 31–48.
52. Qureshi Z, Jamil A, Altaf F, Siddique R, Fatima E, Dost S, et al. Revolutionizing triple-negative metastatic breast cancer treatment: sacituzumab Govitecan's role in advancing chemotherapy. *Ann Med Surg*. 2024; 86(9):5314–9.
53. Syed YY. Sacituzumab Govitecan: First Approval. *Drugs*. 2020; 80(10):1019–25.
54. Dong W, Shi J, Yuan T, Qi B, Yu J, Dai J, et al. Antibody-drug conjugates of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: Sacituzumab govitecan and labetuzumab govitecan. *Eur J Med Chem*. 2019; 167:583–93.
55. Alradwan IA, Alnefaie MK, Al Fayez N, Aodah AH, Majrashi MA, Alturki M, et al. Strategic and Chemical Advances in Antibody–Drug Conjugates. *Pharmaceutics*. 2025; 17(9):1164.
56. Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, Loirat D, Punie K, Oliveira M, et al. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021; 384(16):1529–41.

57. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009; 45(2):228–47.
58. Keskinilic M, Sacks R. Antibody-Drug Conjugates in Triple Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2024; 24(3):163–74.

8 Sitografia

<https://clinicaltrials.gov/>

<https://www.fda.gov/>

<https://www.ema.europa.eu/en/homepage>

<https://db.antibodysociety.org/index>

<https://www.esmo.org/>