

FISIOPATOLOGIA DELL'ATEROSCLEROSI

RUOLO DEI RECETTORI DELLE CHEMOCHINE INFIAMMATORIE NELL'ATEROSCLEROSI

Role of inflammatory chemokine receptors in atherosclerosis

EUSABETTA CAIAZZO^{1,2}, DANILA GURGONE², ARMANDO IALENTI¹, PASQUALE MAFFIA^{2,1}

¹Dipartimento di Farmacia, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli;

²Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, Regno Unito

SUMMARY

The chemokine network specifically orchestrates the trafficking of immune cells in both homeostasis and during inflammation. Although several studies support an important pathogenic role of inflammatory chemokines and their receptors in atherosclerosis, potentially representing attractive therapeutic targets in the pathology, there is no clinical application of drugs targeting chemokine receptors for the treatment of cardiovascular diseases. Inflammatory chemokines are generated by any cell type in the atherosclerotic vessel wall and can interact with multiple inflammatory chemokine receptors. However, redundancy, ligand sharing and overlapping expression patterns typify the inflammatory chemokine/receptor system. Accordingly, we have an insufficient understanding of the complex roles played by individual, and combination of, chemokine receptors in regulating vascular inflammation, which has precluded the development of targeted therapies. Most of the clinical trials are in phase II and do not show any statistically significant results, some of them are ongoing or completed but results are still not available. This article summarizes the major clinical trials targeting inflammatory chemokines and their receptors and proposes a novel experimental strategy that could overcome the main barrier to their use as anti-inflammatory therapies in cardiovascular diseases.

Keywords: *Atherosclerosis, chemokines, clinical trials, inflammatory chemokine receptors, vascular inflammation.*

Introduzione

L'aterosclerosi e le sue manifestazioni cliniche sono le principali cause di mortalità nel mondo. Considerata l'origine multifattoriale della malattia è importante disporre di diverse opzioni terapeutiche che prendano di mira i meccanismi causali di

Indirizzo per la corrispondenza

Pasquale Maffia
University of Glasgow, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli
E-mail: Pasquale.Maffia@glasgow.ac.uk

questa patologia. Negli ultimi 30 anni, la ricerca di base ha dimostrato in modo inequivocabile il ruolo causale delle risposte immuno-infiammatorie nell'aterosclerosi e, quindi, il potenziale teorico di manipolare la risposta infiammatoria per prevenire eventi cardiovascolari. Ipotesi confermata nel 2017 con la pubblicazione dello studio CANTOS (*Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study*) (1, 2), prima dimostrazione clinica che la riduzione dell'infiammazione vascolare è utile nella prevenzione secondaria degli eventi cardiaci avversi maggiori (*major adverse cardiac events*, MACE).

È noto che l'aterosclerosi accelera il reclutamento delle cellule immunitarie nei vasi arteriosi, sia nelle fasi iniziali che in quelle avanzate della patologia (3, 4). Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato in modelli murini che il *trafficking* ed il *priming* locale dei linfociti T naïve a livello aortico contribuisce al processo aterosclerotico (5-8). Nelle fasi avanzate della patologia, le cellule immunitarie migrano nel tessuto connettivo avventiziale che avvolge le arterie per formare organi linfoidi terziari indicati come ATLOs (*artery tertiary lymphoid organs*). Questi aggregati linfoidi sono in grado di controllare *in situ* la risposta vascolare delle cellule T, bypassando gli organi linfoidi secondari (9, 10). Più recentemente, tecniche innovative come la citometria di massa (*cytometry by time-of-flight*, CyTOF) ed il sequenziamento dell'RNA a singola cellula (*single-cell RNA sequencing*) hanno permesso una mappatura completa dei diversi sottotipi di cellule immuni presenti all'interno dei vasi aterosclerotici (11).

Ruolo delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori nell'aterosclerosi

La migrazione dei leucociti nei vasi aterosclerotici è regolata in gran parte dalle

chemochine, proteine a basso peso molecolare (8-12 kD) tutte strutturalmente omologhe e provviste di uno o due ponti disolfuro. Possono essere monomeri, dimeri o oligomeri. La famiglia delle chemochine è suddivisa, in base al numero ed alla posizione dei residui di cisteina collocati nella regione N-terminale, nelle seguenti sottoclassi: CC, CXC, XC e CX₃C (12). Le chemochine si legano a recettori appartenenti alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (*G-Protein Coupled Receptors*, GPCR) con sette domini transmembrana comprendenti due famiglie: 19 recettori convenzionali (*conventional chemokine receptors*, cCKRs) e 4 recettori "atipici" (*atypical chemokine receptors* ACKRs) (13). Le chemochine possono essere ulteriormente classificate in chemochine infiammatorie e chemochine omeostatiche. Mentre le chemochine infiammatorie sono indotte in risposta a stimoli pro-infiammatori e promuovono il rapido reclutamento di cellule immunitarie nei siti di infezione, flogosi e danno tissutale, le chemochine omeostatiche ed i loro recettori sono costitutivamente espresse e regolano il traffico basale dei leucociti all'interno e all'esterno dei tessuti periferici e degli organi linfoidi secondari. L'espressione dei recettori omeostatici delle chemochine risulta ridotta sui leucociti, contrariamente, i recettori delle chemochine infiammatorie (*inflammatory chemokine receptors*, iCCRs) sono ampiamente espressi sulle cellule infiammatorie (*Tabella 1*). Inoltre, mentre i recettori omeostatici delle chemochine legano al massimo due chemochine, i recettori delle chemochine infiammatorie legano numerose chemochine (*Tabella 2*) (14, 15).

Diversi studi genetici nell'uomo hanno collegato i polimorfismi a singolo nucleotide nei geni dei recettori C-C per le chemochine alla malattia cardiometabolica (16-19). Questi recettori ed i loro molteplici

ci ligandi sono espressi durante l'infiammazione vascolare e sebbene siano stati ampiamente studiati nell'aterosclerosi, c'è ancora un vivace dibattito relativo al ruolo dei singoli recettori nella formazione e nello sviluppo di tale patologia (20-22). Dibattito evidente se si guarda agli articoli pubblicati nell'ultimo decennio sul reclutamento dei monociti nelle placche aterosclerotiche. Nel 2007, Tacke et al. hanno mostrato che CCR2, CCR5 e CX3CR1 sono necessari per il reclutamento dei monociti nella placca (23). Più recentemente, tuttavia, è stato dimostrato che CCR1 e CCR5 ma non CCR2 o CX3CR1 sono necessari per il reclutamento dei monociti (24). Sembra dunque che il ruolo generale di CCR1, CCR2 e CCR5 nella formazione dell'ateroma sia contraddittorio. I topi deficienti di CCR2 e CCR5 sviluppano meno aterosclerosi; al contrario, i topi deficienti di CCR1 mostrano una maggiore formazione di placca (25-28) con una risposta Th1 pro-aterogena (29). Più recentemente, è stato dimostrato che la neutralizzazione farmacologica di CCR2 riduce il processo aterosclerotico ma non influenza il reclutamento microvascolare dei leucociti (30). Sebbene CCR3 sia espresso in placche aterosclerotiche umane (31), non è stato ad oggi studiato in modelli animali. I risultati contraddittori suggeriscono che il ruolo di alcune chemochine varia a seconda delle fasi dello sviluppo dell'aterosclerosi, rendendo lo studio dell'attività biologica delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori nella patologia estremamente complesso.

In questo articolo abbiamo esaminato il potenziale clinico delle strategie terapeutiche basate sul sistema chemochine infiammatorie/recettori nonché la relativa complessità del *targeting* farmacologico di questa famiglia di molecole. Abbiamo anche discusso nuove strategie sperimen-

Tabella 1 - Espressione dei recettori infiammatori delle chemochine (iCCRs) sulle cellule immuni.

Cellule	Recettori
Neutrofilii	CCR1, CCR2, CXCR2
Monociti	CCR1, CCR2, CCR5, CX3CR1
Macrofagi	CCR1, CCR2, CCR5, CX3CR1
Mastociti	CCR1, CCR2, CCR5, CXCR2
Basofili	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
Eosinofili	CCR1, CCR3
Cellule Natural Killer	CCR1, CCR2, CCR5, CX3CR1

Tabella 2 - Promiscuità dei recettori delle chemochine infiammatorie.

Recettore omeostatico	Chemochine
CCR7	CCL19, 21
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27, 28
Recettore infiammatorio	Chemochine
CCR1	CCL3, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 23
CCR2	CCL2, 7, 8, 12, 13, 16
CCR3	CCL2, 3, 5, 7, 8, 11, 13, 15, 24, 26, 28
CCR5	CCL3, 4, 5, 7, 8, 11, 14, 16
CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8

tali per superare gli ostacoli riguardanti lo sviluppo di terapie mirate a chemochine infiammatorie ed ai loro recettori per il trattamento delle patologie cardiovascolari.

Studi clinici

I principali studi clinici su patologie cardiovascolari che prendono in considerazione le chemochine infiammatorie e/o i loro recettori come possibili bersagli terapeutici sono riportati in *Tabella 3*.

MLN1202 è un anticorpo monoclonale che interagisce con CCR2 ed inibisce il

Tabella 3 - Principali studi clinici su patologie cardiovascolari che prendono in considerazione le chemochine infiammatorie o i loro recettori come possibili bersagli terapeutici registrati su <http://www.clinicaltrials.gov> o EudraCTR.

Farmaco	Target	Condizione	Fase trial	Scopo dello studio	Risultati principali	Identificativo
MLN1202 (Anticorpo monoclonale umanizzato)	CCR2	Aterosclerosi	Fase II	Effetto sui livelli sierici di proteina C-reattiva	Riduzione significativa dei livelli sierici di proteina C-reattiva	NCT00715169
Maraviroc (antagonista recettoriale)	CCR5	Infezione da HIV con aterosclerosi	Fase IV	Efficacia in pazienti affetti da HIV con aterosclerosi	Significativo miglioramento di FMD, cfPWV, IMT rispettivamente del 66%, 11% e 13%. Effetto benefico sul rapporto EMP/ EPCs (P<.001) e piastrine/aggregati di leucociti (P=.013)	NCT03402815
Bindarit (inibitore di NF- κ B)	CCL2, CCL7, CCL8	Restenosi in pazienti sottoposti a PCI	Fase II	Efficacia e sicurezza dopo PCI	Riduzione non statisticamente significativa della perdita tardiva di lume all'interno senza effetti sugli eventi avversi cardiovascolari maggiori	NCT01269242
JVS-100 (plasmide a DNA non virale)	CXCL12	Insufficienza cardiaca	Fase II	Efficacia e sicurezza; valutazione del 6MWT e MLHFQ a 4 mesi di follow-up	Sicurezza di un singolo dosaggio endocardico, nessun miglioramento di 6MWT e MLHFQ a 4 mesi dal trattamento	NCT01643590
ACRX-100 (plasmide a DNA non virale)	CXCL12	Insufficienza cardiaca	Fase I	Sicurezza, tollerabilità ed efficacia sulla funzione cardiaca	Completato, risultati non ancora disponibili	NCT01082094
POL6326 (antagonista recettoriale)	CXCR4	Infarto acuto del miocardico	Fase II	Effetto su mobilitazione di cellule staminali, funzione cardiaca, dimensione dell'infarto e su sicurezza e tollerabilità	Completato, risultati non ancora disponibili	NCT01905475; EudraCT 2012-003229-91
AZD5069 (antagonista recettoriale)	CXCR2	PCI nella malattia coronarica	Fase II	Effetto sulla funzione cardiaca (riserva frazionale di flusso; funzione diastolica) e sull'infiammazione vascolare	In corso, risultati non ancora disponibili	EudraCT 2016-000775-24

FMD = dilatazione flusso-mediata dell'arteria brachiale; cfPWV = velocità dell'onda di polso carotideo-femorale; IMT = spessore intima-media carotideo; EMP = microparticelle endoteliali circolanti; EPCs = cellule progenitrici endoteliali; PCI = intervento coronarico percutaneo; 6MWT = *Six minute walking test*; MLHFQ = *Minnesota living heart failure questionnaire*; NF- κ B = Nuclear factor kappa-B.

legame con il suo ligando *chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL2) anche conosciuto come *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1). MLN1202 è stato utilizzato in uno studio di fase II randomizzato (112 pazienti), in doppio cieco, controllato verso placebo, per analizzare l'effetto dell'inibizione di CCR2 sui livelli sierici di proteina C-reattiva. L'antagonismo CCR2 da parte di MLN1202 ha mostrato una riduzione dei livelli sierici di proteina C-reattiva nei soggetti a più alto rischio di aterosclerosi (32). Tuttavia, sarà necessario uno studio di fase III per valutare l'effettiva efficacia di MLN1202 nel ridurre eventi cardiaci avversi maggiori. Un altro studio clinico di fase II randomizzato è stato disegnato al fine di valutare l'effetto di MLN1202 sull'infiammazione vascolare in pazienti con malattia vascolare aterosclerotica (malattia coronarica, arteriopatia periferica, aterosclerosi aortica o aneurisma dell'aorta addominale <5 cm, malattia carotidea o malattia cerebrovascolare) clinicamente stabile per almeno 3 mesi prima dell'inizio del trial. Il trial, tuttavia, non è stato portato a conclusione (Identificativo ClinicalTrials.gov: NCT02388971).

L'aterosclerosi è una complicanza comune nei pazienti affetti da HIV, in particolare durante il trattamento con inibitori della proteasi virali (PI). Maraviroc (Celsentri/Selzentry; Pfizer) è un farmaco antivirale che agisce inibendo il recettore delle chemochine infiammatorie CCR5, una delle proteine chiave per la penetrazione dell'HIV nelle cellule bersaglio. Dati preliminari derivanti da uno studio in cui sono stati confrontati 6 pazienti positivi per HIV trattati con PI e maraviroc per 6 mesi con 9 pazienti arruolati retrospettivamente e trattati con PI suggeriscono un effetto protettivo del farmaco sui parametri infiammatori, metabolici ed endoteliali associati al processo di aterogenesi. Nel-

lo specifico, l'utilizzo di maraviroc è stato associato a miglioramenti significativi del profilo dei trigliceridi, dello spessore medio-intimale carotideo e della rigidità arteriosa, valutata misurando la velocità di propagazione dell'onda sfingica PWV (*pulse wave velocity*, PWV), oltre ad essere stato associato ad una significativa riduzione di citochine pro-infiammatorie (IL-6 e CCL-2) e molecole di adesione solubili (sVCAM e sICAM) (33). Questi risultati supportano i dati ottenuti dal trial MERIT (34) che ha dimostrato un effetto protettivo del maraviroc sui danni dismetabolici indotti dai PI e i risultati di uno studio che ha evidenziato elevati livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL) e la diminuzione dei trigliceridi plasmatici in pazienti con una variante naturale del gene CCR5 CCR532 che si traduce in un recettore CCR5 non funzionale (18). Recentemente è stato completato uno studio clinico randomizzato che ha incluso 22 pazienti affetti da HIV ad alto rischio cardiovascolare trattati con maraviroc (35). Il trattamento con maraviroc ha portato a miglioramenti significativi in diversi marcatori di rischio cardiovascolare come disfunzione endoteliale, rigidità arteriosa e aterosclerosi carotidea precoce, accompagnati da un aumento della capacità vascolare, senza alcun effetto rilevante sull'infiammazione sistemica (35). Dati che supportano la necessità di studi più ampi per testare eventuali effetti di maraviroc sulla prevenzione delle patologie aterosclerotiche.

Le chemochine infiammatorie sono coinvolte nella regolazione del processo di restenosi (36). Gli autori di un trial randomizzato di fase II (148 pazienti), in doppio cieco, hanno valutato il potenziale terapeutico di bindarit, che inibisce selettivamente le chemochine CCL2, CCL7 e CCL8, nel prevenire la restenosi nei pazienti sottoposti ad intervento coronarico percutaneo

(37). L'*endpoint* primario era la perdita tardiva intra-segmento (*in-segment late loss*), mentre i principali *endpoint* secondari erano perdita tardiva di lume interno (*in-stent late loss*) e gli eventi cardiovascolari avversi maggiori. Questo è stato uno studio negativo con l'*endpoint* primario non raggiunto. Tuttavia, una significativa riduzione *in-stent late loss* suggerisce che bindarit probabilmente esercita un'azione favorevole sulla parete vascolare dopo l'angioplastica. Bindarit è stato ben tollerato con un tasso di compliance superiore al 90%.

Lo studio di fase II *Stromal Cell-Derived Factor-1 Plasmid Treatment for Patients with Heart Failure* (STOP-HF), in doppio cieco, randomizzato, controllato verso placebo (93 pazienti), ha valutato invece la sicurezza e l'efficacia di un singolo dosaggio endocardico di JVS-100 [un plasmide di DNA non virale, codificante *Stromal Cell Derived Factor 1* (SDF-1), anche conosciuto come *C-X-C motif chemokine 12* (CXCL12)] al fine di migliorare le prestazioni cardiache in pazienti con frazione di eiezione del ventricolo sinistro $\leq 40\%$ (38). Questo studio non è riuscito a dimostrare la significatività statistica sul suo *endpoint* primario, rappresentato da un composito del test del cammino in 6 minuti (6MWT) e della valutazione della qualità della vita (MLHFQ) da basale a 4 mesi di *follow-up*. Tuttavia, attraverso un'analisi predefinita, lo studio STOP-HF ha dimostrato il potenziale di attenuare il rimodellamento ventricolare sinistro e migliorare la frazione di eiezione nella cardiomiopatia ischemica ad alto rischio. Non sono, invece, ancora disponibili i risultati di un altro studio di fase I, non randomizzato, disegnato al fine di valutare la sicurezza e l'efficacia di una singola dose crescente, somministrata tramite iniezione endocardica, di ACRX-100, un plasmide di DNA non virale

progettato per esprimere transitoriamente SDF-1 in 16 pazienti con cardiopatia ischemica (Identificativo ClinicalTrials.gov: NCT01082094). Inoltre, è stato completato uno studio clinico di fase II randomizzato che esamina l'effetto di POL6326, un antagonista di CXCR4, sulla mobilitazione cellulare, sulla funzione cardiaca e sulla dimensione dell'infarto in 120 pazienti con infarto miocardico acuto, ma i risultati non sono ancora disponibili (Identificativo ClinicalTrials.gov: NCT01905475). Un'altra applicazione clinica oggetto di studio è l'uso dell'*imaging* molecolare di CXCR4 (il recettore specifico per SDF-1/CXCL12) come strumento diagnostico nell'aterosclerosi (39). Recentemente, un farmaco con proprietà teranostiche, il pentixather marcato con ^{177}Lu o ^{90}Y , è stato introdotto per l'endoradioterapia a base di radionuclidi (ERT) di neoplasie ematologiche che sovraesprimono CXCR4. L'endoradioterapia diretta da CXCR4 con pentixather marcato in 5 pazienti con mieloma multiplo, ha mostrato di ridurre le lesioni aterosclerotiche (40). Sebbene questo studio preliminare sia caratterizzato da un numero molto limitato di pazienti e un disegno retrospettivo, il *targeting* di CXCR4 dovrebbe essere considerato per applicazioni future e potrebbe aprire una nuova opzione terapeutica per pazienti ad alto rischio di aterosclerosi.

Un trial randomizzato controllato di fase II in corso (Identificativo EudraCT: 2016-000775-24), si propone di valutare se AZD5069, un antagonista di *cysteine-X-cysteine chemokine receptor 2* (CXCR2), sia in grado di variare la riserva di flusso coronarico in 90 pazienti con malattia coronarica sottoposti a intervento coronarico percutaneo (41). L'*endpoint* secondario di questo studio è di correlare l'inibizione di CXCR2 all'alterazione della placca verso placche più stabili e ridotta restenosi.

Discussione

Sebbene un gran numero di molecole che prendono di mira le chemochine infiammatorie ed i loro recettori siano attualmente in fase di sperimentazione clinica, solo poche molecole sono state approvate clinicamente: l'antagonista allosterico CCR5 maraviroc (Celsentri/Selzentry; Pfizer) è approvato per il trattamento dell'HIV; l'antagonista CXCR4 plerixafor (Genzyme Corporation) è stato approvato per mobilitare le cellule staminali emopoietiche per il trapianto autologo in pazienti con linfoma non Hodgkin e mieloma multiplo; il mogamulizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato anti-CXCR4, è stato approvato per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) e del linfoma leucemia dell'adulto a cellule T. Non vi è dunque, ad oggi, alcuna applicazione clinica di farmaci che abbiano come *target* le chemochine infiammatorie ed i loro recettori per il trattamento delle malattie cardiovascolari. Il fallimento della maggior parte degli studi di fase II nel raggiungere la significatività statistica e la loro interruzione potrebbe essere dovuta a molteplici fattori. L'espressione e la funzione delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori sono alterate nei pazienti con disturbi cardiovascolari e quindi capire con esattezza l'espressione dei diversi iCCR nelle diverse fasi della patologia e nei diversi letti vascolari aiuterebbe a capire come essi possano influenzare il *trafficking* delle cellule immunitarie nell'infiammazione vascolare, nonché il loro contributo in processi come la proliferazione cellulare, la migrazione e l'espressione di citochine. Il quadro è ulteriormente complicato dall'età, dal sesso, dall'etnia e dalle variazioni genetiche, nonché dalle comorbidità con patologie infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide che provocano una accelerazione dei processi aterosclerotici. Ostacoli

importanti includono la comprensione limitata del *signalling* delle chemochine, l'elevata ridondanza del sistema, le differenze tra i tipi cellulari e il legame non specifico di antagonisti dei recettori delle chemochine. Comprendere dunque la complessa rete delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori, le funzioni effettrici e la regolazione della risposta immunitaria nella patologia cardiovascolare è essenziale per sviluppare future strategie terapeutiche di successo.

Prospettive future e conclusioni

Prospettive future

Gli studi sperimentali condotti soprattutto su modelli murini si sono rivelati indispensabili per chiarire molti dei meccanismi che guidano la biologia del sistema chemochine infiammatorie/recettori nella fisiopatologia dell'aterosclerosi; tuttavia, la mancata capacità di traslare questi risultati nella pratica clinica richiede ulteriori studi sperimentali con approcci diversi che consentano di definire il ruolo individuale ed integrato dei singoli recettori delle chemochine infiammatorie nell'aterosclerosi.

Ridondanza, promiscuità nella condivisione del ligando e modelli di espressione sovrapposti che caratterizzano il *network* delle chemochine infiammatorie non hanno finora consentito una comprensione sufficiente dei complessi ruoli svolti dai singoli recettori delle chemochine infiammatorie e dalla loro combinazione nella regolazione dell'infiammazione vascolare precludendo lo sviluppo di terapie mirate. Ad esempio, i monociti possono esprimere CCR1, 2 e 5 e CX3CR131, e quindi la delezione di un singolo recettore comprometterà, ma non bloccherà completamente, il reclutamento dei monociti. Questo è il motivo per cui i topi deficienti di CCR2 spesso mostrano solo un blocco parziale o ritardato nell'in-

gresso dei monociti nei siti infiammati. Inoltre, gli iCCR possono anche regolare la mobilitazione dei progenitori dal midollo osseo, il reclutamento dal sangue periferico al tessuto infiammato, il movimento e la cinetica cellulare all'interno dei tessuti ed esercitare funzioni non chemiotattiche (21, 30, 42, 43). Pertanto, i modelli esistenti di animali *knockout* per un singolo recettore non possono aiutarci a chiarire la complessità della risposta infiammatoria guidata da iCCR. Anche gli approcci farmacologici sono inadeguati per tali analisi.

Per superare questi problemi, Gerard Graham all'Università di Glasgow ha generato topi con i classici recettori delle chemochine infiammatorie CC (CCR1, 2, 3 e 5) silenziati. Il silenziamento è reversibile e consente di attivare selettivamente ciascun recettore a turno, nonché in combinazioni selezionate. In questo modo è possibile valutare lo specifico ruolo svolto dai singoli recettori in modelli sperimentali di aterosclerosi. Sono stati anche generati topi transgenici in cui i recettori delle chemochine infiammatorie sono resi fluorescenti (topi reporter) e che consentono di studiare *in vivo* come varia la loro espressione nell'infiammazione vascolare in modelli sperimentali di aterosclerosi.

Topi reporter iCCR (GGiREP)

Questi "topi reporter" transgenici forniranno le prime informazioni approfondite sulle dinamiche spazio-temporali dell'espressione di iCCR durante la formazione e lo sviluppo dell'aterosclerosi sperimentale. Questi topi reporter possiedono un BAC (*bacterial artificial chromosome*) inserito casualmente nei loro genomi che codifica per il locus iCCR, ma i geni per gli stessi iCCR sono stati sostituiti con geni che codificano per proteine fluorescenti (CCR3-mTagBFP2, CCR1-Clover, CCR2-mRuby2, CR5-IRFP682). Questi topi esprimono con-

temporaneamente sia i recettori delle chemochine infiammatorie che le specifiche proteine fluorescenti, consentendo una valutazione diretta dell'espressione temporale e spaziale del recettore delle chemochine nell'aterosclerosi. Questo modello consentirà di tracciare in tempo reale l'espressione dei recettori delle chemochine infiammatorie nell'aterosclerosi sperimentale in diversi stadi e letti vascolari.

Topi null iCCR (TAKO)

In questo ceppo, l'intero cluster iCCR sul cromosoma 9 è stato eliminato, risultando in un topo iCCR KO (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 KO). I topi TAKO sono vitali e sani e non mostrano anomalie dello sviluppo. In condizioni basali questi topi mostrano una marcata diminuzione dei monociti infiammatori circolanti (44). Ciò è prevedibile, poiché CCR2 è necessario per il rilascio dei monociti dal midollo osseo. Utilizzando questi topi, si è recentemente dimostrato che la ridondanza e la specificità del recettore delle chemochine dipende dal contesto. Gli iCCR regolano in modo ridondante popolazioni di cellule mielomonocitiche residenti nei tessuti mentre solo CCR2 controlla il reclutamento di monociti nell'infiammazione acuta (44). Questi topi permetteranno di analizzare e definire l'entità del reclutamento di cellule infiammatorie nel vaso e la formazione di atheroma in assenza di iCCR.

Topi che esprimono singoli iCCR

Il silenziamento di iCCR è reversibile e consente di attivare selettivamente ciascun recettore a turno, nonché in combinazioni selezionate. In questo modo è possibile valutare lo specifico ruolo svolto dai singoli recettori in modelli sperimentali di aterosclerosi. A tal proposito, è stato "ricombinato" l'iCCR BAC murino per

introdurre cassette di arresto 5' affiancate da ricombinasi a ciascun recettore. Questi topi possono essere utilizzati per generare topi che esprimono singoli iCCR o combinazioni di iCCR (a livelli fisiologici) come desiderato. Ciò può essere ottenuto, per ogni iCCR, incrociando con appropriati ceppi di delezione della linea germinale.

Conclusioni

Il ruolo delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi risulta complesso e non completamente chiarito. La maggior parte delle sperimentazioni cliniche ha rivelato che il *targeting* di tale sistema è un approccio terapeutico promettente in linea di principio, ma sono ancora necessarie ulteriori indagini che ne consentano l'approvazione clinica. Ulteriori studi sui ruoli pato-fisiologici dei recettori delle chemochine infiammatorie nelle patologie cardiovascolari consentirebbe la progettazione di agenti farmacologici migliori e più mirati. Attraverso l'utilizzo dei modelli murini sopra descritti si potranno

ottenere nuove informazioni sul contributo individuale e integrato di iCCR all'infiammazione vascolare e chiarire se il *targeting* individuale oppure in combinazione di questi recettori potrebbe rappresentare un approccio praticabile per limitare la formazione e lo sviluppo dell'aterosclerosi.

Finanziamenti

Pasquale Maffia è finanziato dalla British Heart Foundation (BHF) [grant PG/19/84/34771, FS/19/56/34893A, PG/21/10541, PG/21/10557, PG/21/10634], University of Glasgow Scottish Funding Council and the Global Challenges Research Fund, Wellcome Trust [grant 204820/Z/16/Z], Erasmus+ International Credit Mobility (ICM) [2020-1-UK01-KA107-078782] e FRA 2020 - Linea A University of Naples Federico II/Compagnia di San Paolo; Armando Ialenti dal Ministero dell'Università e della Ricerca (MUR) [PRIN 2017 project grant 2017NKB2N4_003, PRIN 2020 project grant 20203YAY9B_003]; Elisabetta Caiazza da un grant della European Society of Cardiology (ESC).

RIASSUNTO

La rete delle chemochine guida specificamente il *trafficking* delle cellule immunitarie sia nell'omeostasi che durante l'infiammazione. Sebbene diversi studi indicano un importante ruolo delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori nella patogenesi dell'aterosclerosi, rappresentando potenzialmente interessanti bersagli terapeutici per i disturbi aterosclerotici, non esiste un'applicazione clinica di farmaci mirati ai recettori delle chemochine per il trattamento delle malattie cardiovascolari. Le chemochine infiammatorie sono generate da qualsiasi tipo di cellula nella parete del vaso aterosclerotico e possono interagire con più recettori delle chemochine infiammatorie. Tuttavia, la ridondanza, la condivisione del ligando e modelli di espressione sovrapposti caratterizzano il sistema delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori. Di conseguenza, abbiamo una comprensione insufficiente dei complessi ruoli svolti dai singoli recettori delle chemochine infiammatorie e dalla loro combinazione nella regolazione dell'infiammazione vascolare, che ha precluso lo sviluppo di terapie mirate. La maggior parte degli studi clinici sono in fase II e non mostrano alcun risultato statisticamente significativo, alcuni di essi sono in corso o completati ma i risultati non sono ancora disponibili. Questo articolo riassume le sperimentazioni cliniche che prendono di mira le chemochine infiammatorie e i loro recettori e propone alcune strategie sperimentali che potrebbero superare la principale barriera al loro utilizzo come terapie anti-infiammatorie nelle malattie cardiovascolari.

Parole chiave: Aterosclerosi, chemochine, test clinici, recettori delle chemochine infiammatorie, infiammazione vascolare.

Bibliografia

- Maffia P, Guzik TJ. When, where, and how to target vascular inflammation in the post-CANTOS era? *Eur Heart J*. 2019; 40 (30): 2492-4.
- Liberale L, Montecucco F, Schwarz L, Luscher TF, Camici GG. Inflammation and cardiovascular diseases: lessons from seminal clinical trials. *Cardiovasc Res*. 2021; 117 (2): 411-22.
- Maffia P, Zinselmeyer BH, Ialenti A, Kennedy S, Baker AH, McInnes IB, et al. Images in cardiovascular medicine. Multiphoton microscopy for 3-dimensional imaging of lymphocyte recruitment into apolipoprotein-E-deficient mouse carotid artery. *Circulation*. 2007; 115 (11): e326-8.
- Swirski FK, Nahrendorf M, Libby P. Mechanisms of Myeloid Cell Modulation of Atherosclerosis. *Microbiol Spectr*. 2016; 4 (4).
- Koltsova EK, Garcia Z, Chodaczek G, Landau M, McArdle S, Scott SR, et al. Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2012; 122 (9): 3114-26.
- MacRitchie N, Grassia G, Sabir SR, Maddaluno M, Welsh P, Sattar N, et al. Plasmacytoid dendritic cells play a key role in promoting atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32 (11): 2569-79.
- Sage AP, Murphy D, Maffia P, Masters LM, Sabir SR, Baker LL, et al. MHC Class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells drives proatherogenic T cell immunity. *Circulation*. 2014; 130 (16): 1363-73.
- MacRitchie N, Grassia G, Noonan J, Cole JE, Hughes CE, Schroeder J, et al. The aorta can act as a site of naive CD4+ T-cell priming. *Cardiovasc Res*. 2020; 116 (2): 306-16.
- Hu D, Mohanta SK, Yin C, Peng L, Ma Z, Srikakulapu P, et al. Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Aorta Immunity and Protect against Atherosclerosis via Vascular Smooth Muscle Cell Lymphotoxin β Receptors. *Immunity*. 2015; 42 (6): 1100-15.
- Srikakulapu P, Hu D, Yin C, Mohanta SK, Bontha SV, Peng L, et al. Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Multilayered Territorialized Atherosclerosis B-Cell Responses in Aged ApoE^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36 (6): 1174-85.
- Cole JE, Park I, Ahern DJ, Kassiteridi C, Danso Abeam D, Goddard ME, et al. Immune cell census in murine atherosclerosis: cytometry by time of flight illuminates vascular myeloid cell diversity. *Cardiovasc Res*. 2018; 114 (10): 1360-71.
- Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 891-928.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52 (1): 145-76.
- Schall TJ, Proudfoot AE. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11 (5): 355-63.
- Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25: 787-820.
- Pai JK, Kraft P, Cannuscio CC, Manson JE, Rexrode KM, Albert CM, et al. Polymorphisms in the CC-chemokine receptor-2 (CCR2) and -5 (CCR5) genes and risk of coronary heart disease among US women. *Atherosclerosis*. 2006; 186 (1): 132-9.
- Nyquist PA, Winkler CA, McKenzie LM, Yanek LR, Becker LC, Becker DM. Single nucleotide polymorphisms in monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor act synergistically to increase the risk of carotid atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis*. 2009; 28 (2): 124-30.
- Hyde CL, Macinnes A, Sanders FA, Thompson JF, Mazzarella RA, Faergeman O, et al. Genetic association of the CCR5 region with lipid levels in at-risk cardiovascular patients. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010; 3 (2): 162-8.
- Golbus JR, Stitzel NO, Zhao W, Xue C, Farrall M, McPherson R, et al. Common and Rare Genetic Variation in CCR2, CCR5, or CX3CR1 and Risk of Atherosclerotic Coronary Heart Disease and Glucometabolic Traits. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016; 9 (3): 250-8.
- White GE, Iqbal AJ, Greaves DR. CC chemokine receptors and chronic inflammation-therapeutic opportunities and pharmacological challenges. *Pharmacol Rev*. 2013; 65 (1): 47-89.
- Zernecke A, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34 (4): 742-50.
- Noels H, Weber C, Koenen RR. Chemokines as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39 (4): 583-92.
- Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007; 117 (1): 185-94.
- Soehnlein O, Drechsler M, Döring Y, Lievens D,

- Hartwig H, Kemmerich K, et al. Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med.* 2013; 5 (3): 471-81.
25. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998; 394 (6696): 894-7.
 26. Potteaux S, Combadière C, Esposito B, Casanova S, Merval R, Ardouin P, et al. Chemokine receptor CCR1 disruption in bone marrow cells enhances atherosclerotic lesion development and inflammation in mice. *Mol Med.* 2005; 11 (1-12): 16-20.
 27. Potteaux S, Combadière C, Esposito B, Lecureuil C, Ait-Oufella H, Merval R, et al. Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26 (8): 1858-63.
 28. Brauersreuther V, Zerneck A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, et al. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27 (2): 373-9.
 29. Zerneck A, Liehn EA, Gao JL, Kuziel WA, Murphy PM, Weber C. Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10. *Blood.* 2006; 107 (11): 4240-3.
 30. Winter C, Silvestre-Roig C, Ortega-Gomez A, Lemnitzer P, Poelman H, Schumski A, et al. Chrono-pharmacological Targeting of the CCL2-CCR2 Axis Ameliorates Atherosclerosis. *Cell Metab.* 2018; 28 (1): 175-82.e5.
 31. Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, et al. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation.* 2000; 102 (18): 2185-9.
 32. Gilbert J, Lekstrom-Himes J, Donaldson D, Lee Y, Hu M, Xu J, et al. Effect of CC chemokine receptor 2 CCR2 blockade on serum C-reactive protein in individuals at atherosclerotic risk and with a single nucleotide polymorphism of the monocyte chemoattractant protein-1 promoter region. *Am J Cardiol.* 2011; 107 (6): 906-11.
 33. Piconi S, Pocaterra D, Rainone V, Cossu M, Masetti M, Rizzardini G, et al. Maraviroc Reduces Arterial Stiffness in PI-Treated HIV-infected Patients. *Sci Rep.* 2016; 6: 28853.
 34. MacInnes A, Lazzarin A, Di Perri G, Sierra-Madero JG, Aberg J, Heera J, et al. Maraviroc can improve lipid profiles in dyslipidemic patients with HIV: results from the MERIT trial. *HIV Clin Trials.* 2011; 12 (1): 24-36.
 35. Francisci D, Pirro M, Schiaroli E, Mannarino MR, Cipriani S, Bianconi V, et al. Maraviroc Intensification Modulates Atherosclerotic Progression in HIV-Suppressed Patients at High Cardiovascular Risk. A Randomized, Crossover Pilot Study. *Open Forum Infect Dis.* 2019; 6 (4): ofz112.
 36. Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, Mizuno O, Fukazawa H, Fujikawa H, et al. Chemokine expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a prognostic factor for restenosis. *Atherosclerosis.* 2001; 156 (1): 165-70.
 37. Colombo A, Basavarajiah S, Limbruno U, Picchi A, Lettieri C, Valgimigli M, et al. A double-blind randomised study to evaluate the efficacy and safety of bindarit in preventing coronary stent restenosis. *EuroIntervention.* 2016; 12 (11): e1385-e94.
 38. Chung ES, Miller L, Patel AN, Anderson RD, Mendelsohn FO, Traverse J, et al. Changes in ventricular remodelling and clinical status during the year following a single administration of stromal cell-derived factor-1 non-viral gene therapy in chronic ischaemic heart failure patients: the STOP-HF randomized Phase II trial. *Eur Heart J.* 2015; 36 (33): 2228-38.
 39. Weiberg D, Thackeray JT, Daum G, Sohns JM, Kropf S, Wester HJ, et al. Clinical Molecular Imaging of Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Atherosclerotic Plaque Using (68) Ga-Pentixafor PET: Correlation with Cardiovascular Risk Factors and Calcified Plaque Burden. *J Nucl Med.* 2018; 59 (2): 266-72.
 40. Li X, Kemmer L, Zhang X, Kircher M, Buck AK, Wester HJ, et al. Anti-Inflammatory Effects on Atherosclerotic Lesions Induced by CXCR4-Directed Endoradiotherapy. *J Am Coll Cardiol.* 2018; 72 (1): 122-3.
 41. Joseph JP, Reyes E, Guzman J, O'Doherty J, McConkey H, Arri S, et al. CXCR2 Inhibition - a novel approach to treating CoronAry heart DiseAse (CICADA): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials.* 2017; 18 (1): 473.
 42. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 2011; 32 (10): 452-60.
 43. Nahrendorf M, Swirski FK. Cholesterol, CCR2, and monocyte phenotypes in atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2017; 38 (20): 1594-6.
 44. Dyer DP, Medina-Ruiz L, Bartolini R, Schuette F, Hughes CE, Pallas K, et al. Chemokine Receptor Redundancy and Specificity Are Context Dependent. *Immunity.* 2019; 50 (2): 378-89.e5.