

TERAPIA

LE NUOVE FRONTIERE DELLA MODULAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNO-INFIAMMATORIA PER IL TRATTAMENTO DELLA MALATTIA CARDIOVASCOLARE

Immunomodulation: The Next Frontier in Cardiovascular Disease Management

ARIANNA MORETTI, MIRYAM BUSNELLI, FABRIZIA BONACINA

*Dipartimento di scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti",
Università degli Studi di Milano*

SUMMARY

Atherosclerosis is increasingly recognized as a chronic immune-mediated disease, in which the intersection between dyslipidemia and immuno-inflammation drives plaque progression and cardiovascular events. Despite the efficacy of lipid-lowering therapies, the persistence of residual cardiovascular risk calls for complementary therapeutic strategies aimed at modulating vascular inflammation. In this context, immunomodulatory therapies are emerging as a novel therapeutic approach, aimed not only to promote suppression of inflammation, but also to modulate innate and adaptive immune responses. Among the most promising approaches, the increase of regulatory T cells (Tregs) through low-dose interleukin-2 reduces vascular inflammation. In parallel, innovative strategies such as cellular therapy with oxidized LDL-specific CAR-Tregs and nanocarriers for CD47 inhibition are designed to enhance pro-resolving inflammatory mechanisms and efferocytosis. Other immunomodulatory strategies include depletion of pro-atherogenic lymphocyte subsets (CD8⁺ and B2 cells) and the inhibition of the NLRP3 inflammasome, a crucial target of innate immunity upstream to IL-1 β . Finally, active immunization through vaccination demonstrates high target specificity and offers long-term prevention.

Although these therapies show a promising efficacy profile, the future challenge lies in modulating pathological inflammation without compromising immune surveillance, thereby enabling the development of personalized and precision-based treatment strategies.

Keywords: *Atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD); vascular inflammation; immunoinflammatory response; immunomodulatory therapies.*

Indirizzo per la corrispondenza

Arianna Moretti

E-mail: arianna.moretti@unimi.it

L'associazione causale tra l'esposizione nel tempo ad alti livelli di colesterolo e il rischio di eventi cardiovascolari aterosclerotici è dimostrata da solide evidenze sperimentali, cliniche, epidemiologiche e, di randomizzazione mendeliana (1). Tuttavia, la persistenza di un rischio cardiovascolare residuo, nonostante gli efficienti farmaci ipolipidemizzanti ad oggi a disposizione, suggerisce un'eziopatogenesi della malattia aterosclerotica più complessa. Altri fattori causali oltre gli alti livelli di colesterolo concorrono, infatti, a delineare un profilo di rischio, che risulta specifico per ciascun paziente. Tra questi fattori di rischio rientra la risposta immuno-infiammatoria. Difatti, negli ultimi decenni studi sperimentali e clinici hanno dimostrato l'*ipotesi infiammatoria* della malattia cardiovascolare aterosclerotica, suggerendo come l'interazione tra dislipidemia ed immuno-infiammazione rappresenti un evento patologico causale (2). Ciò è testimoniato dalle prime evidenze di un'associazione tra eventi cardiovascolari

e livelli plasmatici di marcatori dell'infiammazione come la proteina C reattiva (CRP) e l'interleuchina 6 (IL-6), dalla presenza, attraverso tecnologie di ultima generazione, di cellule immunitarie nelle placche umane (3, 4), e dalle evidenze cliniche di beneficio cardiovascolare, aggiuntivo rispetto alla terapia ipolipidemizzante standard, di farmaci ad attività anti-infiammatoria specifica, come Anakinra, Canakinumab, Ziltivekimab e Colchicina (5-8).

Sebbene promettenti, tali terapie anti-infiammatorie sono associate al rischio di infezioni per una aspecifica soppressione dei meccanismi infiammatori; queste considerazioni aprono la strada a nuovi approcci terapeutici di tipo immunomodulatorio, che hanno l'obiettivo di contrastare in modo specifico l'immuno-infiammazione cardiovascolare (9).

Tali approcci, che vanno oltre la semplice soppressione infiammatoria, puntano a modulare selettivamente meccanismi immunitari, quali l'interleuchina 2 (IL-2), l'attività dei linfo-

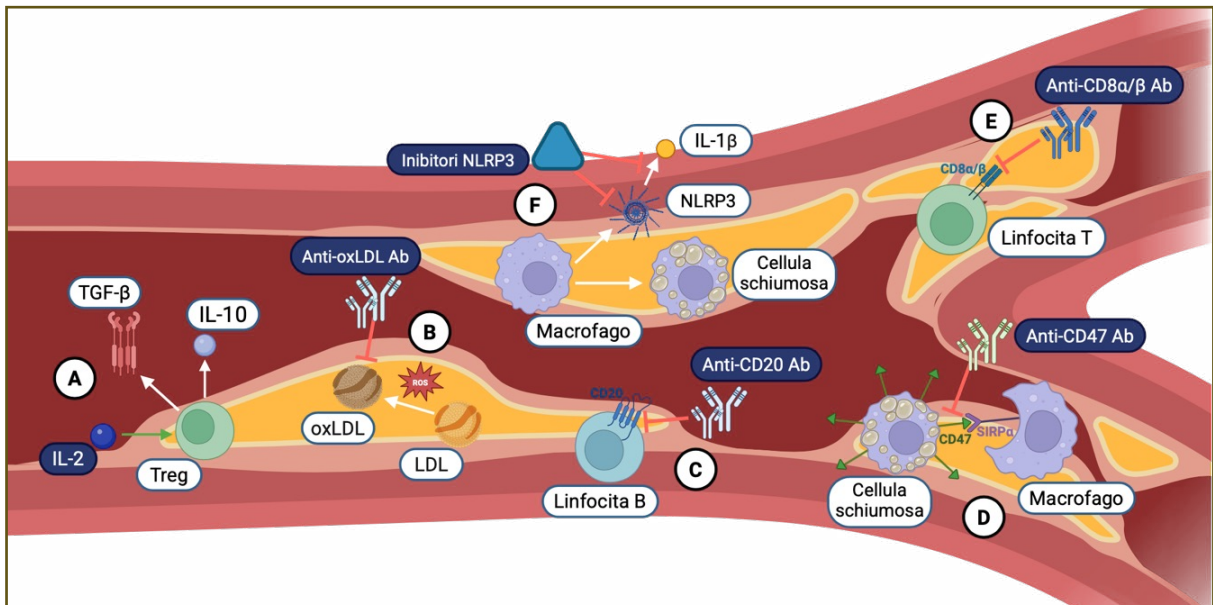


Figura 1 - Alcuni dei nuovi approcci terapeutici (rappresentati nei riquadri blu) che modulano la risposta immunitaria per il trattamento della malattia cardiovascolare. A, basse dosi di IL-2 per promuovere l'attivazione delle cellule T regolatorie. B, anticorpi monoclonali anti-oxLDL. C, anticorpi monoclonali anti-CD20. D, anticorpi monoclonali anti-CD47. E, anticorpi monoclonali anti-CD8α/β. F, Inibitori dell'inflammasoma NLRP3.

citi T regolatori (Treg) e dei linfociti T CD8+, le Lipoproteine ossidate a bassa densità (ox-LDL) e la proteina CD47. Questo razionale si basa sull'evidenza che l'aterosclerosi non sia solo un processo infiammatorio aspecifico, ma una malattia cronica immunomediata in cui il bilanciamento delle risposte adattative e innate determina la progressione della placca e, di conseguenza, il rischio di eventi clinici (*Figura 1*).

Potenziare la risposta tolerogenica nell'infiammazione cardiovascolare tramite l'espansione dei linfociti Treg

Le cellule T regolatorie (Treg) sono cellule immunosoppressive che originano principalmente dal timo; attraverso il rilascio di citochine anti-infiammatorie come IL-10, TGF- β e IL-35, queste cellule controllano le risposte autoimmuni e prevengono l'iperattivazione del sistema immunitario, mitigando potenzialmente la progressione di patologie croniche infiammatorie, inclusa l'aterosclerosi. Infatti, nel contesto vascolare, le cellule Treg esercitano un ruolo protettivo sopprimendo l'attivazione dei linfociti T effettori, promuovendo il fenotipo macrofagico anti-infiammatorio/pro-risolutivo e inibendo la formazione di cellule schiumose all'interno della lesione, come dimostrato in modelli murini di displipidemia (10, 11). Inoltre, pazienti affetti da sindrome coronarica acuta (ACS) presentano ridotti livelli circolanti di Treg, suggerendo che un loro aumento potesse rappresentare una strategia immunomodulatoria promettente per ridurre l'infiammazione cardiovascolare (12). Nella recente pubblicazione dello studio clinico IVORY è stato infatti dimostrato come l'espansione delle cellule Treg riduca l'infiammazione vascolare. L'espansione delle Treg è stata ottenuta utilizzando basse dosi di IL-2, che erano già state viste promuovere in modo selettivo la proliferazione delle Treg nello studio di fase I/II LILACS (13). Il trial ha coinvolto 60 pazienti, 31 dei quali hanno ricevuto $1,5 \times 10^6$ IU di Alde-

sleuchina, una forma ricombinante di IL-2, mentre 29 hanno ricevuto il placebo. Il trattamento si è articolato in due fasi, per una durata complessiva di 8 settimane: la fase di induzione ha previsto un'iniezione sottocutanea giornaliera di Aldesleuchina o placebo per 5 giorni consecutivi, seguita dalla fase di mantenimento con una sola iniezione settimanale per 7 settimane. L'infiammazione vascolare è stata valutata prima e dopo il trattamento mediante imaging con tomografia a emissione di positroni (PET)/TC con il radiofarmaco 2-deossi-2-[fluoro-18]fluoro-D-glucosio (18F-FDG) (14). L'endpoint primario dello studio ha valutato il rapporto massimo (TBR max, *Target-To-Background Ratio maximum*) tra il segnale della lesione, cioè la placca aterosclerotica infiammata, e quello di fondo, dimostrando come il trattamento con IL-2 porti ad una riduzione significativa del TBR max rispetto al placebo (-0,171, pari al 7,7%) (15).

L'endpoint secondario ha analizzato, invece, la variazione nelle diverse sottopopolazioni di linfociti T presenti in circolo, dimostrando come il trattamento con IL-2 porti ad un aumento significativo delle cellule Treg rispetto al placebo, senza differenze significative riguardo la variazione di linfociti T effettori. Il farmaco è stato ben tollerato: le reazioni avverse più comuni sono state quelle al sito di iniezione, di natura temporanea; altre hanno incluso sintomi simil-influenzali e mialgie (13, 14). Infine, la coorte che ha ultimato lo studio IVORY è stata seguita nell'ambito di IVORY-FINALE, un'indagine prospettica e osservazionale focalizzata sulla valutazione degli *outcome* cardiovascolari. La differenza negli eventi cardiovascolari maggiori a 2 anni dal follow-up è stata dell'11% nel gruppo placebo contro nessun evento nel gruppo trattato. Pur con i limiti della natura preliminare dei dati, questi risultati indicano una correlazione positiva tra l'espansione dei Treg e il beneficio cardiovascolare nel lungo periodo, ponendo le basi per ulteriori indagini mediante trial clinici su più vasta scala.

Un approccio per potenziare i meccanismi anti-infiammatori ancora più innovativo è rappresentato dalle cellule CAR-Treg, le quali combinano l'effetto cardioprotettivo delle cellule Treg con la specificità antigenica del recettore CAR (*chimeric antigen receptor*) verso le LDL ossidate. Si tratta di un'immunoterapia cellulare che, partendo dai linfociti prelevati dal sangue periferico, prevede l'introduzione nelle cellule di un recettore modificato (CAR) per riconoscere in modo specifico antigeni associati alla malattia, garantendo una risposta immunitaria antigene-specifica. Tale strategia ha dimostrato un notevole successo clinico in ambito oncologico per il trattamento di pazienti affetti da leucemie, linfomi a cellule B refrattari o recidivanti e mieloma multiplo (16, 17). Nell'ambito delle malattie cardiovascolari si è quindi ipotizzato che la combinazione della specificità antigenica dei recettori CAR verso antigeni associati all'infiammazione cardiovascolare, con i benefici cardioprotettivi delle cellule T regolatorie, potesse rivelarsi una strategia efficiente per contrastare lo sviluppo dell'aterosclerosi. Due CAR sono stati sviluppati a partire da anticorpi anti-oxLDL precedentemente caratterizzati, 2D03 e IEI-E3. Entrambi hanno dimostrato quali sono in grado di ridurre la formazione di placche aterosclerotiche rispettivamente fino al 50% e al 36% quando somministrati in topi ApoE^{-/-}. Questi anticorpi riconoscono oxLDL e ApoB-100 modificata con malondialdeide (MDA), epitopo presente sulle oxLDL in vivo e comunemente riscontrato nelle placche aterosclerotiche umane, ma solo CAR-2D03 è stato selezionato per studi in vivo. Per generare le CAR-Treg oxLDL-specifiche, cellule T CD4 sono prelevate dal sangue periferico umano e trasdotte con un vettore lentivirale bicistronico, co-esprimente Foxp3, fattore trascrizionale caratteristico delle cellule T regolatorie, e 2D03-CAR. In vitro, tali cellule hanno dimostrato una riduzione della risposta infiammatoria, riducendo la formazione di cellule schiumose. A partire da queste considerazioni sono state create e

caratterizzate versioni murine delle 2D03-CAR Tregs, in cui Foxp3 umano e il dominio di segnalazione CD28 umano sono stati sostituiti con sequenze omologhe murine. Modelli murini geneticamente modificati, in cui ApoB murina viene inattivata nel fegato per esprimere una ApoB umana transgenica (topi LA-DKO/hApoB-Tg), aventi un'età compresa tra 8 e 12 settimane e condizionati 24 ore prima con ciclofosfamida, sono stati trattati con cellule T CD4 murine non trasdotte, Tregs CAR di controllo oppure Tregs 2D03-CAR. Rispetto alle Tregs CAR di controllo, le 2D03-CAR Tregs hanno portato ad una riduzione media del carico di placca di quasi dell'80%. L'analisi dei lipidi sierici non ha mostrato variazioni significative nei livelli di LDL tra i diversi gruppi di trattamento indicando che la riduzione dell'aterosclerosi non è dovuta a una diminuzione sistemica del colesterolo LDL, distinguendo così il meccanismo d'azione della terapia 2D03-CAR Tregs da quello dei farmaci ipolipidemizzanti (18).

Promozione dei meccanismi di risoluzione dell'infiammazione tramite l'inibizione di CD47

Un recente approccio immunomodulatorio è rappresentato dalla promozione di meccanismi pro-risolutivi dell'infiammazione come l'inibizione di CD47, una proteina altamente espressa in condizioni di infiammazione vascolare. Questa glicoproteina interagisce con il recettore SIRP- α espresso dai macrofagi attivando un segnale "*don't eat me*", che inibisce il processo di efferocitosi, processo di fagocitosi delle cellule apoptotiche e di detriti cellulari, favorendo così l'accumulo di materiale pro-infiammatorio (19, 20). Un recente studio clinico retrospettivo non randomizzato e senza gruppo controllo ha dimostrato che l'anticorpo monoclonale anti-CD47 Magrolimab sia efficace nel ridurre l'infiammazione vascolare, quantificata tramite la captazione di 18F-FDG. Questo studio ha coinvolto 9 pazienti affetti da linfoma e in

trattamento con Rituximab, presentanti fattori di rischio cardiovascolare. Il trattamento è stato protratto per 9 settimane, durante le quali i pazienti hanno ricevuto una somministrazione settimanale di Magrolimab, inizialmente con un dosaggio di circa 1 mg/kg, seguito da una fase di mantenimento con dosaggi maggiori compresi tra 20 e 45 mg/kg. A seguito del trattamento è stata osservata una riduzione significativa della captazione di 18F-FDG, misurata come valore massimo normalizzato di captazione (SUV max) e come rapporto tra il segnale della lesione e quello di fondo (TBR) nel segmento più compromesso della carotide di riferimento. Nonostante il numero esiguo di pazienti, lo studio ha dimostrato come Magrolimab sia in grado di ridurre la captazione arteriosa di 18F-FDG e sopprimere l'infiammazione vascolare (21). L'inibizione di CD47 è stata oggetto anche di un altro studio condotto nel 2024, che ha valutato un nanocarrier bifunzionale a base di Ibrutinib e di un anticorpo anti-CD47 (22). Ibrutinib è un farmaco che, legandosi in modo irreversibile al residuo di cisteina (Cys-481) situato nel sito attivo della tirosina chinasi di Bruton (BTK), inibisce l'attività di questo enzima e sopprime la proliferazione e l'attivazione delle cellule B portando alla loro deplezione (23). Inoltre, l'inibizione di BTK espressa sui macrofagi inibisce l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, bloccando l'attivazione della caspasi-1 e la maturazione di IL-1 β , esercitando così potenti effetti anti-infiammatori (24). Rispetto ad altre terapie mirate alla deplezione delle cellule B, come gli anticorpi anti-CD20, Ibrutinib è un farmaco di piccole dimensioni che offre vantaggi quali facilità di sintesi, minor costo di produzione e maggiore stabilità. Il nanosistema oggetto di studio si compone di nanoparticelle di polidopamina contenenti Ibrutinib le quali sono coniugate ad un anticorpo anti-CD47, dando origine ad un sistema di rilascio nanofarmacologico mirato, denominato PIP-CD47. La polidopamina ha delle proprietà chimiche peculiari: in condizioni alcaline le

molecole di dopamina si uniscono formando una rete polimerica solida che permette di mantenere il farmaco incapsulato, mentre in ambienti acidi (come i tessuti infiammati o tumorali) le nanoparticelle si degradano rilasciando il farmaco laddove serve. Questo studio preclinico è stato condotto sulla linea cellulare di macrofagi murini RAW264.7: il trattamento con PIP-CD47 ha ridotto l'espressione di BTK fosforilata (pBTK) e dei componenti a valle della cascata infiammatoria, tra cui NLRP3, caspasi-1 e IL-1 β . Per valutare gli effetti citotossici di PIP-CD47 sui linfociti B, questi ultimi sono stati prelevati dalla milza di topi C57. Dopo 12 ore di trattamento i tassi di sopravvivenza erano del 53,41% per il gruppo Ibrutinib e del 66,5% per il gruppo PIP-CD47 suggerendo come la monoterapia con Ibrutinib abbia un effetto citotossico più marcato rispetto a PIP-CD47. I saggi ELISA condotti per misurare la secrezione di citochine associate al fenotipo dei macrofagi hanno dimostrato l'efficacia della somministrazione di PIP-CD47 nel ridurre i mediatori pro-infiammatori e nell'aumentare quelli anti-infiammatori. Il sistema PIP-CD47 è stato testato in un modello di reversione dell'aterosclerosi, dove ha dimostrato una riduzione nella dimensione delle placche aterosclerotiche in topi ApoE^{-/-} (22). In sintesi, PIP-CD47 si rivela essere un'interessante strategia terapeutica bifunzionale per il trattamento delle lesioni aterosclerotiche, meritando ulteriori indagini cliniche.

Inibizione dei meccanismi di citotossicità nella lesione vascolare tramite la deplezione dei linfociti CD8 e dei linfociti B

Le lesioni aterosclerotiche avanzate contengono numerosi linfociti T CD8+ i quali presentano funzioni di memoria centrale, memoria effettrice ed attività citotossica. A differenza delle cellule Treg, che esercitano un ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi, le cellule

T CD8+ sono coinvolte nelle complicanze della patologia; la loro deplezione rappresenterebbe, pertanto, una strategia terapeutica promettente per il trattamento della malattia aterosclerotica (25). A conferma di ciò, sono stati condotti studi preclinici su topi ApoE -/- dislipidemici per valutare l'efficacia anti-aterosclerotica di una strategia di deplezione dei linfociti CD8. Sono stati valutati due anticorpi monoclonali, anti-CD8 α (TIB-210) e anti-CD8 β (YTS-156.7), diretti contro le due catene α e β del co-recettore CD8, che hanno ridotto del 97% e del 99% rispettivamente i linfociti CD8 circolanti dopo iniezione intraperitoneale. Il passo successivo è stato quello di valutare se la deplezione delle cellule T CD8+ in questi modelli animali potesse influenzare lo sviluppo dell'aterosclerosi. I topi trattati con l'anticorpo monoclonale anti-CD8 α hanno mostrato una riduzione del 34% nell'area totale della lesione, una riduzione del 30% nell'accumulo di lipidi valutata tramite la colorazione con Oil Red O, e una riduzione del 33% nell'accumulo di macrofagi CD68+ nelle lesioni aterosclerotiche della radice aortica. Risultati simili sono stati raggiunti dall'impiego dell'anticorpo anti-CD8 β , il quale ha mostrato come la deplezione di questi linfociti riduca del 44% l'area totale delle lesioni aterosclerotiche, del 52% l'accumulo lipidico evidenziato dalla colorazione Oil Red O e del 47% l'accumulo di macrofagi CD68. Tali risultati sono stati ulteriormente supportati da una riduzione del 72% dell'accumulo lipidico, valutato sempre mediante colorazione con Oil Red O dell'intera aorta. Gli anticorpi depletanti anti-CD8 α e anti-CD8 β non hanno indotto alcuna modifica né al peso corporeo né all'iperlipidemia dei topi alimentati con la dieta ricca in grassi, confermando che la deplezione dei linfociti T CD8+ riduce l'aterosclerosi per modulazione della risposta infiammatoria e non per un effetto metabolico (26). Nonostante questi risultati promettenti nei modelli sperimentali, il passaggio all'uomo è rallentato dalle preoccupazioni di una deplezione sistemica cronica dei linfociti CD8 che

potrebbe avere conseguenze negative considerato il loro ruolo essenziale per la difesa antivirale e antitumorale.

I linfociti B giocano ruoli opposti nell'aterosclerosi a seconda della sottopopolazione analizzata: mentre i linfociti B2 sono pro-aterogeni, i B1 sono protettivi, attraverso la produzione di anticorpi naturali IgM che neutralizzano le LDL ossidate. La deplezione dei linfociti B2 in modelli ApoE-/- ha dimostrato la riduzione drastica dello sviluppo dell'aterosclerosi; questo trattamento preserva la produzione di autoanticorpi IgM anti-oxLDL naturali e potenzialmente protettivi rispetto agli anticorpi anti-oxLDL di tipo IgG e riduce notevolmente l'attivazione delle cellule T pro-infiammatorie (27). In ambito clinico, l'uso di anticorpi anti-CD20 (come Rituximab), utilizzato per le malattie autoimmuni ed ematologiche, ha permesso di osservare effetti cardiovascolari protettivi e di avviare trial specifici. Lo studio clinico RITA-MI ha dimostrato come la somministrazione in dose singola dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 Rituximab sia in grado di depletare le cellule B2, considerate aterogeniche, con conseguente riduzione della conta dei linfociti T CD4+, CD8+ e dei livelli di CRP. Lo studio clinico è stato condotto su 24 pazienti con infarto miocardico acuto caratterizzato da un'elevazione del tratto ST (STEMI) sottoposti con successo ad un intervento coronarico percutaneo primario (PPCI) entro le prime 24 ore dall'esordio del dolore toracico di origine cardiaca. A 30 minuti dalla premedicazione a base di metilprednisolone, clorfenamina e paracetamolo, impiegata per ridurre gli effetti collaterali associati a Rituximab, è stata avviata l'infusione dell'anticorpo monoclonale in quattro gruppi sequenziali di 6 pazienti che hanno ricevuto, rispettivamente, 200, 500, 700 e 1000 mg di farmaco. Per tutte le dosi, Rituximab ha causato una riduzione media del 96,3% del conteggio di cellule B entro 30 minuti dall'inizio dell'infusione e anche una riduzione nella conta di linfociti T CD8+ e CD4+. I livelli di CRP hanno raggiunto il picco al giorno 1, per

poi diminuire entro il giorno 6 e a 6 mesi. Gli eventi avversi più comuni sono stati i disturbi gastrointestinali, tra cui diarrea, indigestione e dolore addominale. Le infezioni sono state riscontrate in 4 pazienti: due di essi hanno presentato raffreddori/influenze durante la stagione influenzale verificatesi diversi mesi dopo l'infusione dell'anticorpo; un soggetto ha riportato un'infezione alle vie urinarie, insorta 5 mesi dopo l'infusione e trattata con antibiotici; un'infezione, insorta a distanza di una settimana dalla dimissione ospedaliera, ha riguardato le vie respiratorie inferiori, richiedendo la somministrazione di antibiotici (28). Attualmente è in corso lo studio clinico di fase 2 RITA-MI con l'obiettivo di verificare se il Rituximab possa prevenire il rimodellamento del ventricolo sinistro e lo scompenso cardiaco a lungo termine dopo un infarto.

Strategie per inibire la risposta infiammatoria a monte dell'IL-1 β tramite gli inibitori delle LDL ossidate e dell'inflammasoma NLRP3

Le strategie terapeutiche più recenti mirano non solo ai mediatori dell'immunità adattativa, ma anche a quelli dell'immunità innata.

Quest'ultima, rappresentata dai macrofagi residenti nei tessuti, dalle cellule dendritiche, dai granulociti e dai monociti del midollo osseo e del sangue periferico, agisce come meccanismo di difesa primario, rilevando segnali di danno extra e intracellulare o la presenza di microrganismi attraverso i recettori di riconoscimento del pattern (PRR) (29, 30). A livello della lesione aterosclerotica, l'immunità innata contribuisce attivamente allo sviluppo di un microambiente pro-infiammatorio, dove le oxLDL, convertite a partire dalle LDL, vengono riconosciute dai recettori scavenger espressi sui macrofagi. Questi si trasformano in cellule schiumose rilasciando mediatori pro-infiammatori come IL-1 β , IL-6 e IL-18. Pertanto, la rimozione di queste lipoproteine modificate si associa ad

effetti anti-infiammatori (29, 31). A tale proposito, tra il 2021 e il 2022 è stato condotto uno studio clinico in doppio cieco e controllato con placebo sull'anticorpo monoclonale anti-oxLDL (nel dettaglio anti-MDA-ApoB-100) Orticumab. Lo studio ha coinvolto 77 pazienti in sovrappeso affetti da psoriasi, una patologia infiammatoria cronica utilizzata come modello clinico per l'aumentato rischio cardiovascolare, con l'obiettivo di valutare se Orticumab potesse ridurre sia l'infiammazione cutanea che vascolare. I pazienti sono stati assegnati in modo casuale (rapporto 2:1) a ricevere un'infusione di 50 mL contenente Orticumab (somministrato a 52 pazienti) oppure un placebo (somministrato a 25 pazienti) per un periodo di 12 settimane. La tomografia computerizzata coronarica (CCTA), che permette di ottenere immagini dettagliate delle arterie coronarie, è stata eseguita prima della randomizzazione e a 15 settimane dalla randomizzazione in 32 pazienti del gruppo Orticumab e in 19 pazienti del gruppo placebo. Attraverso la CCTA la riduzione dell'infiammazione vascolare è stata valutata mediante il punteggio FAI (*Fat Attenuation Index*), un parametro utilizzato per quantificare le alterazioni del tessuto adiposo perivascolare indotte da segnali infiammatori provenienti dalla parete vascolare, nelle arterie coronarie discendente anteriore sinistra (LAD), coronaria destra (RCA) e circonflessa sinistra (LCX). Per stimare la possibile rilevanza clinica della risposta al trattamento con Orticumab, è stato utilizzato un algoritmo di predizione del rischio cardiaco potenziato dall'intelligenza artificiale (*CaRi-Heart Risk*), che integra il punteggio FAI con i fattori di rischio clinici e i parametri delle placche coronariche ottenuti dalla CCTA, con l'obiettivo di predire il rischio di eventi cardiaci fatali a 8 anni. I risultati di questo studio clinico mostrano come il trattamento con Orticumab per un periodo di 15 settimane abbia ridotto il punteggio FAI nei pazienti con psoriasi ed elevata infiammazione coronarica, senza alcun effetto significativo nei soggetti con un basso livello di

infiammazione coronarica. Secondo il modello *CaRi-Heart*, questo potrebbe tradursi in una riduzione del 50% del rischio previsto di eventi cardiaci fatali nel gruppo con infiammazione coronarica elevata. Non sono stati riportati eventi avversi gravi attribuibili al farmaco, né è stato registrato un incremento degli eventi avversi emergenti dal trattamento (TEAE) nel gruppo Orticumab rispetto al placebo. Gli eventi avversi più comuni sono stati le infezioni, verificatesi nel 17,3% dei soggetti trattati con Orticumab e nel 16% di quelli nel gruppo controllo, evidenziando una sostanziale sovrapposibilità tra i due bracci dello studio. I risultati suggeriscono che la combinazione tra lo screening tramite punteggio FAI e il trattamento con Orticumab possa rappresentare una strategia di medicina di precisione per identificare e trattare il rischio cardiovascolare residuo. Lo studio dimostra infatti che l'inibizione delle oxLDL riduce efficacemente l'infiammazione coronarica, confermando la specificità vascolare di questo approccio (32).

Tra i recettori di riconoscimento del pattern PRR, mediatori chiave della risposta infiammatoria innata, il più noto e caratterizzato è l'inflammasoma, descritto dettagliatamente per la prima volta nel 2002. Nello specifico, l'inflammasoma NLRP3 ha un ruolo fondamentale nell'infiammazione vascolare causata dai lipidi e, come conseguenza, nell'iniziazione e progressione dell'aterosclerosi. I suoi componenti sono espressi prevalentemente nei macrofagi e nelle cellule schiumose presenti nella placca aterosclerotica. L'inflammasoma NLRP3 si compone di un sensore (NLRP3), un adattatore (ASC o PYCARD) ed un effettore (caspasi-1). A seguito di un segnale di attivazione, NLRP3 oligomerizza e recluta ASC e caspasi-1, che a sua volta si attiva e promuove la generazione, attraverso un taglio proteolitico, delle interleuchine 1 β e 18 dai loro precursori, che amplificando la risposta infiammatoria sistemica tramite la stimolazione della produzione di IL-6 e, infine, di CRP dal fegato. Inoltre, l'attivazione di caspasi-1

è in grado di indurre una forma di morte cellulare denominata piroptosi. Tra i numerosi attivatori dell'inflammasoma, nel contesto dell'aterosclerosi spiccano i cristalli di colesterolo. Di conseguenza, l'inibizione dell'inflammasoma NLRP3 rappresenta un importante bersaglio a monte dell'IL1 β , già target di Canakinumab, e può essere ottenuta mediante tre strategie:

- il blocco dei segnali a monte che regolano l'espressione genica di NLRP3, caspasi-1 e IL-1 β ;
- l'inibizione dell'assemblaggio dell'inflammasoma NLRP3;
- l'inibizione della segnalazione a valle di NLRP3.

La Gliburide, nota anche come Glibenclamide, è un farmaco antidiabetico appartenente alla classe delle sulfoniluree che agisce sopprimendo i canali del K⁺ sensibili all'ATP nelle cellule β pancreatiche e stimolando il rilascio di insulina nei pazienti affetti da diabete di tipo 2. Nel 1997, prima della scoperta degli inflammasomi, si osservò che la Glibenclamide era in grado di prevenire il rilascio di IL-1 β da macrofagi umani e murini attivati da LPS e ATP. Successivamente, nel 2009, fu dimostrato che questo farmaco inibisce selettivamente l'attivazione della caspasi-1 mediata da NLRP3 e la secrezione di IL-1 β . Tuttavia, non è stato utilizzato in clinica perché le elevate dosi necessarie per l'ottenimento dell'inibizione di NLRP3 causano ipoglicemia ed alterazione del metabolismo glucidico. Partendo dalla Glibenclamide però sono stati sviluppati diversi inibitori, tra cui JC121 (16673-34-0) e i suoi analoghi metilato (JC124) e idrossilato (JC171). Questi composti sono privi del gruppo cicloesilurea, responsabile dell'attività ipoglicemizzante, ma conservano i gruppi funzionali benzammidico e sulfonilico, essenziali per l'inibizione dell'inflammasoma NLRP3. Più recentemente sono stati sviluppati dei nuovi derivati bifenil-sulfonamide tra cui il composto H28, il quale si lega direttamente alla proteina NLRP3, impedendo in modo efficace l'assemblaggio e la conseguente attivazione.

Presso l'azienda farmaceutica Pfizer sono stati condotti degli screening di diaril-sulfoniluree, con l'obiettivo di identificare composti strutturalmente correlati alla Glibenclamide ma più potenti nel bloccare il rilascio di IL-1 β , portando alla scoperta degli inibitori del rilascio di citochine (CRIDs, tra cui CRID3), capaci di bloccare il rilascio di IL-1 β con potenza nanomolare. Tuttavia, lo sviluppo clinico di CRID3 è stato interrotto a causa della tossicità epatica dell'inibizione *off-target* delle anidrasi carboniche I e II. Nel 2019, utilizzando CRID3 come scaffold, sono stati sviluppati dei derivati alchenil-sulfoniluree, in cui il furano responsabile di tossicità epatica è stato sostituito con diversi anelli eterociclici, tra cui tiofene, piridina e tiazolo. Ulteriori ricerche hanno generato nuovi composti, tra cui NIC11 e NIC12, i quali sono strutturalmente correlati a CRID3 ma privi della sua attività *off-target* sulle anidrasi carboniche I e II. Oltre ai composti citati, altri numerosi inibitori sono attualmente in fase di studio, a dimostrazione del continuo interesse per molecole selettive contro NLRP3 (30).

Verso l'immunizzazione attiva: l'uso dei vaccini nella prevenzione cardiovascolare

Parallelamente alle strategie di immunizzazione passiva, come le terapie cellulari o la somministrazione di anticorpi, emergono approcci di immunizzazione attiva che si basano sulla somministrazione di vaccini in grado di indurre una risposta immunitaria adattativa anti-aterogena duratura ed altamente specifica nel soggetto ricevente. L'immunizzazione verso il frammento dell'apolipoproteina B-100 p210 ha dimostrato in topi ApoE $^{-/-}$ una riduzione delle placche aterosclerotiche e un'espansione delle cellule Treg (33). Lo studio clinico AUSPICE ha valutato il potenziale cardioprotettivo di un vaccino polisaccaridico pneumococcico (PPV) (34) il quale in una metanalisi di 8 studi osservazionali era stato associato ad un

na riduzione del 17% del rischio di eventi coronarici acuti in pazienti sopra i 65 anni, grazie alla produzione di anticorpi con reattività crociata verso le LDL (35). L'endpoint primario del trial era rappresentato dall'incidenza di eventi cardiovascolari fatali e non fatali in un follow-up di 6 anni, con un'analisi intermedia a 3 anni; tuttavia, lo studio è stato formalmente chiuso il 31 gennaio 2023, ma gli esiti clinici primari non sono stati ancora resi pubblici (34).

L'uso della vaccinazione può essere utilizzato anche per la produzione di anticorpi neutralizzanti, come nel caso di PCSK9. I vaccini anti-PCSK9 mirano ad indurre la produzione di anticorpi specifici tramite l'uso di peptidi che mimano l'estremità di PCSK9, coniugati a una proteina carrier. In studi preclinici, hanno dimostrato di ridurre il colesterolo LDL fino al 30% (36).

Rispetto alle attuali immunoterapie passive, la vaccinazione offrirebbe il vantaggio di un numero ridotto di somministrazioni. Grazie all'induzione di una risposta immunitaria umorale duratura, il paziente sarebbe in grado di produrre endogenamente gli anticorpi desiderati per periodi prolungati. Ciò non solo ridurrebbe i costi per i sistemi sanitari, ma garantirebbe una maggiore aderenza terapeutica, eliminando le fluttuazioni di efficacia legate alla frequenza delle somministrazioni esterne. Tuttavia, gli effetti a lungo termine della vaccinazione in ambito cardiovascolare sono ancora da chiarire.

Conclusione

In conclusione, le crescenti evidenze a supporto del ruolo centrale dell'immunità innata e adattativa nella patogenesi dell'aterosclerosi hanno inaugurato una nuova fase nello sviluppo di strategie terapeutiche mirate, affiancando gli approcci consolidati di modifiche dello stile di vita e di terapie ipolipemizzanti (*Tabella 1*). L'identificazione di nuovi biomarcatori infiammatori e di bersagli immunitari specifici

Tabella 1 - I nuovi approcci terapeutici che modulano la risposta immuno-infiammatoria per il trattamento della malattia cardiovascolare.

Approccio	Bersaglio	Risultati	Riferimento bibliografico
Basse dosi di IL-2	Cellule T regolatorie (Treg)	Aumento dei livelli di Treg e riduzione dell'infiammazione vascolare nel gruppo trattato con IL-2 rispetto al placebo	Sriranjan-Rothwell, R.S. et al. <i>Nature Medicine</i> , (2026).
CAR-Treg	LDL ossidate (oxLDL)	Riduzione nella formazione e dimensione della placca in modelli murini ApoE -/-	Schwab, R. D. et al. <i>Circulation</i> (2025).
Magrolimab	CD47	Riduzione dell'infiammazione vascolare in 9 pazienti che hanno ricevuto l'anticorpo monoclonale	Jarr, K.-U. et al. <i>New England Journal of Medicine</i> 384, 382-383 (2021).
Nanocarrier bifunzionale (Ibrutinib + anticorpo anti-CD47)	BTK	Riduzione in modelli preclinici dell'espressione di BTK fosforilata (pBTK) e dei componenti a valle della cascata infiammatoria (NLRP3, caspasi-1 e IL-1 β)	Wang, H. et al. <i>Adv. Healthc. Mater.</i> 13, (2024).
Anticorpi anti-CD8 α e anti-CD8 β	Cellule T CD8+	Riduzione dell'accumulo di lipidi e macrofagi e dell'area totale della lesione aterosclerotica nei modelli murini che hanno ricevuto uno dei due anticorpi	Kyaw, T. et al. <i>Circulation</i> 127, 1028-1039 (2013).
Rituximab	Cellule B2	Riduzione dei livelli di cellule B2 e di altri mediatori dell'infiammazione nel gruppo ricevente l'anticorpo monoclonale rispetto al placebo	Zhao, T. et al. <i>Cardiavascular. Res.</i> 118, 872-882 (2022).
Oricumab	LDL ossidate (oxLDL)	Riduzione dell'infiammazione vascolare in pazienti affetti da psoriasi con elevata infiammazione al basale	Farina, C. J. et al. <i>Cardiovasc. Res.</i> 120, 678-680 (2024).
Inibitori inflammasoma NLRP3	inflammasoma NLRP3	Efficacia preclinica nel ridurre l'infiammazione vascolare mediante inibizione di NLRP3 e del rilascio di citochine pro-infiammatorie	Momen, V. <i>Preprints.org</i> (2025).
Vaccinazione	PCSK9 LDL	Potenziale cardioprotettivo di un vaccino polisaccaridico pneumococcico in grado di indurre anticorpi anti-LDL	Ren, S. et al. <i>Am. Heartj.</i> 177, 58-65 (2016).

ha permesso di delineare terapie innovative in grado di modulare selettivamente i pathway immuno-infiammatori coinvolti nella progressione e nella destabilizzazione della placca aterosclerotica. Molti di questi approcci, caratterizzati da modalità di somministrazione sottocutanea e da regimi terapeutici meno frequenti, offrono potenziali vantaggi in termini di aderenza e sostenibilità clinica. Nonostante tali strategie abbiamo dimostrato efficacia e un profilo di sicurezza favorevole nella riduzione

degli eventi cardiovascolari, principalmente grazie alla loro azione anti-infiammatoria e immunomodulatoria, gli studi clinici hanno dimostrato un possibile impatto sulla competenza immunitaria in corso di infezione. Ciò sottolinea la necessità di ulteriori studi volti a definire interventi capaci di controllare la risposta infiammatoria patologica senza compromettere l'efficienza della risposta immunitaria fisiologica. In questo contesto, la ricerca preclinica continua ad esplorare strategie innovative,

quali i nanofarmaci, la terapia cellulare con le CAR-T e la vaccinazione, che potrebbero aprire nuove prospettive per un trattamento mirato

e sempre più personalizzato al rischio cardiovascolare di ciascun paziente.

RIASSUNTO

L'aterosclerosi è ad oggi riconosciuta come malattia cronica immunomediata, in cui l'interazione tra dislipidemia e immuno-infiammazione rappresenta un meccanismo centrale nella progressione della placca e nella genesi degli eventi cardiovascolari. Nonostante l'efficacia delle terapie ipolipemizzanti, la persistenza di un rischio cardiovascolare residuo evidenzia la necessità di strategie terapeutiche complementari mirate anche alla modulazione della risposta immunitaria. In questo contesto, le terapie immunomodulatorie emergono come un nuovo approccio terapeutico, orientato non alla semplice soppressione della risposta infiammatoria cardiovascolare, ma alla modulazione selettiva delle risposte immunitarie innate e adattative. Tra gli approcci più promettenti, la modulazione delle cellule T regolatorie (Treg) tramite basse dosi di Interleuchina-2 ha dimostrato di poter ridurre l'infiammazione vascolare. Parallelamente, strategie innovative quali la terapia cellulare con CAR-Treg specifiche per le LDL ossidate e nanocarrier per l'inibizione di CD47 puntano a potenziare i meccanismi pro-risolutivi dell'infiammazione e di efferocitosi. La ricerca si estende inoltre alla deplezione di sottopopolazioni linfocitarie pro-aterogene (CD8+ e B2) e all'inibizione dell'inflammasoma NLRP3, target cruciale dell'immunità innata a monte dell'IL-1 β . Infine, l'immunizzazione attiva tramite vaccinazione mostra un'elevata specificità e offre prospettive di prevenzione a lungo termine più sostenibili.

Sebbene queste terapie mostrino un profilo di efficacia promettente, la sfida futura risiede nel modulare la risposta infiammatoria patologica senza compromettere la sorveglianza immunitaria, aprendo la strada ad un trattamento di prevenzione cardiovascolare personalizzato e di precisione.

Parole chiave: *Malattia cardiovascolare aterosclerotica (ASCVD); Infiammazione vascolare; Risposta immuno-infiammatoria; terapie immunomodulatorie.*

Bibliografia

1. Ference BA, Braunwald E, Catapano AL. The LDL cumulative exposure hypothesis: evidence and practical applications. *Nat. Rev. Cardiol.* 2024; 21.
2. Jukema RA, Ahmed TAN, Tardif JC. Does low-density lipoprotein cholesterol induce inflammation? if so, does it matter? Current insights and future perspectives for novel therapies. *BMC Med.* 2019; 17
3. Norata GD, Ruolo dell'infiammazione nell'aterosclerosi. *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi.* 2021; 12: 136-148.
4. Fernandez DM, Giannarelli C. Immune cell profiling in atherosclerosis: role in research and precision medicine. *Nat. Rev. Cardiol.* 2022; 19: 43-58.
5. Morton AC, et al. The effect of interleukin-1 receptor antagonist therapy on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes: The MRC-ILA Heart Study. *Eur. Heart J.* 2015; 36: 377-384.
6. Ridker PM, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine.* 2017; 377: 1119-113.
7. Ridker PM, et al. IL-6 inhibition with ziltivekimab in patients at high atherosclerotic risk (RESCUE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet.* 2021; 397: 2060-2069.
8. Tardif J-C, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine.* 2019; 381: 2497-2505.
9. Libby P. Targeting inflammatory pathways in cardiovascular disease: The inflammasome, interleukin-1, interleukin-6 and beyond. *Cells.* 2021; 10.
10. Klingenberg R, et al. Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation.* 2013; 123: 1323-1334.
11. Mor A, et al. Role of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 893-900.
12. Sriranj-Rothwell RS, et al. Anti-inflammatory therapy with low-dose IL-2 in acute coronary syndromes: a randomized phase 2 trial. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1038/s41591-025-04090-y> (2026) doi:10.1038/s41591-025-04090-y.
13. Zhao TX, et al. Regulatory T-Cell Response to Low-Dose Interleukin-2 in Ischemic Heart Disease. *NEJM Evidence.* 2021; 1.
14. Sriranj R, et al. Low-dose interleukin 2 for the reduction of vascular inflammation in acute coronary syndromes (IVORY): protocol and study rationale for a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *BMJ Open.* 2022; 12.

15. Rothwell RS, et al. Abstract 4144964: Low-Dose IL-2 Lowers Arterial Inflammation and Trends Towards Lower MACE in patients with ACS: The results of the IVORY trial and IVORY FINALE study. *Circulation*. 2024; 150.
16. Garfall AL, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2015; 373: 1040-1047.
17. Maude SL, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371: 1507-1517.
18. Schwab RD, et al. OxLDL-Targeted Chimeric Antigen Receptor T Regulatory Cells Reduce Atherosclerotic Plaque Development. *Circulation* <https://doi.org/10.1161/circulationaha.125.073987> (2025) doi:10.1161/circulationaha.125.073987.
19. Cheng Q, Gu J, Adhikari BK, Sun L, Sun J. Is CD47 a potentially promising therapeutic target in cardiovascular diseases? - Role of CD47 in cardiovascular diseases. *Life Sci*. 2020; 247.
20. Ryan JJ. CD47-Blocking Antibodies and Atherosclerosis. *JACC Basic Transl. Sci*. 2016; 1: 413.
21. Jarr K-U, et al. Effect of CD47 Blockade on Vascular Inflammation. *New England Journal of Medicine*. 2021; 384: 382-383.
22. Wang H, Zhao R, Peng L, Yu A, Wang Y. A Dual-Function CD47-Targeting Nano-Drug Delivery System Used to Regulate Immune and Anti-Inflammatory Activities in the Treatment of Atherosclerosis. *Adv. Healthc. Mater*. 2024; 13.
23. Byrd JC, et al. Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013; 369: 32-42.
24. Liu X, et al. Human NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activity is regulated by and potentially targetable through Bruton tyrosine kinase. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017; 140: 1054-1067. e10.
25. Ait-Oufella H, Libby P. Inflammation and Atherosclerosis: Prospects for Clinical Trials. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2024; 44: 1899-1905.
26. Kyaw T, et al. Cytotoxic and proinflammatory CD8+ T lymphocytes promote development of vulnerable atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Circulation*. 2013; 127: 1028-1039.
27. Ait-Oufella H, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J. Exp. Med*. 2010; 207: 1579-1587.
28. Zhao TX, et al. Rituximab in patients with acute ST-elevation myocardial infarction: An experimental medicine safety study. *Cardiovasc. Res*. 2022; 118: 872-882.
29. Jebari-Benslaiman, S. et al. Pathophysiology of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms23063346> 0.
30. Momen YS. Targeting the NLRP3 Inflammasome: Novel Inhibitors for Cardiovascular Disease Management. 2025. <https://doi.org/10.20944/preprints202501.1297.v1> doi:10.20944/preprints202501.1297.v1.
31. Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture: Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997; 95: 1062-1071.
32. Farina CJ, et al. Inhibition of oxidized low-density lipoprotein with orticumab inhibits coronary inflammation and reduces residual inflammatory risk in psoriasis: a pilot randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Cardiovasc. Res*. 2024; 120: 678-680.
33. Klingenberg R, et al. Intranasal immunization with an apolipoprotein B-100 fusion protein induces antigen-specific regulatory T cells and reduces atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2010; 30: 946-952.
34. Ren S, et al. Rationale and design of a randomized controlled trial of pneumococcal polysaccharide vaccine for prevention of cardiovascular events: The Australian Study for the Prevention through Immunization of Cardiovascular Events (AUSPICE). *Am. Heart. J*. 2016; 177: 58-65.
35. Ren S, et al. Effect of the adult pneumococcal polysaccharide vaccine on cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Open Heart*. 2015; 2: e000247.
36. Landlinger C, et al. The AT04A vaccine against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces total cholesterol, vascular inflammation, and atherosclerosis in APOE*3Leiden.CETP mice. *Eur. Heart J*. 2017; 38: 2499-2507.