

Antibody-Drug Conjugates (ADC) : Struttura, Meccanismo d'azione, Applicazioni Cliniche e Metodi Analitici per la Caratterizzazione.

PARTE I

1. Introduzione

- Abstract
- Razionale dei farmaci anticorpo coniugati

2. Struttura e componenti degli Antibody-Drug Conjugate

- Anticorpo monoclonale
- Linker
- Payload citotossico
- Rapporto farmaco/anticorpo (DAR)

3. Meccanismo d'azione e farmacologia

- Legame al target e internalizzazione
- Rilascio del farmaco
- Farmacodinamica e farmacocinetica

4. Principali ADC approvati, Evoluzione, Applicazioni cliniche, limiti, Strategie di combinazione e prospettive future

- Principali ADC approvati
- Profilo di sicurezza
- Meccanismi di resistenza
- Prospettive future

PARTE II : METODI ANALITICI PER LA CARATTERIZZAZIONE DEGLI Antibody-Drug Conjugates

5. Tecniche Analitiche per la Caratterizzazione

- Tecniche Cromatografiche
- Elettroforesi Capillare
- Spettrometria di massa (LC-MS)
- Metodi immunochimici (ELISA) e Bioanalitici

6. Studi di Stabilità e Controllo Qualità

7. Validazione dei Metodi e Aspetti Regolatori

Conclusioni

ABSTRACT

La presente tesi si propone di descrivere l'evoluzione concettuale e tecnologica dei coniugati anticorpo-farmaco (Antibody-Drug Conjugates, ADC), evidenziandone lo sviluppo come strategia terapeutica mirata nel trattamento delle patologie oncologiche.

Gli ADC sono molecole "intelligenti" capaci di trasportare la chemioterapia direttamente all'interno delle cellule tumorali, riducendo gli effetti collaterali e aumentando l'efficacia, promettendo quindi di cambiare radicalmente il modo in cui il cancro viene trattato. Già utilizzati con successo in alcune forme di tumore metastatico, gli ADC possono essere utilizzati anche nelle fasi iniziali della malattia, aprendo scenari terapeutici potenzialmente curativi.

In questo lavoro di tesi viene analizzata la struttura degli ADC, il loro meccanismo d'azione e le principali caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche, con particolare attenzione al ruolo delle diverse componenti che ne determinano l'attività e il profilo terapeutico. Vengono inoltre esaminate le applicazioni cliniche attualmente approvate e le principali limitazioni terapeutiche associate al loro impiego.

Gli ADC sono molecole intrinsecamente complesse; è quindi fondamentale caratterizzare la loro struttura, purezza e potenza. La tesi approfondisce i principali metodi analitici impiegati per la caratterizzazione degli ADC, il controllo della qualità e la valutazione della loro stabilità, evidenziando l'importanza di tali approcci nel garantire la sicurezza, l'efficacia e la qualità del prodotto farmaceutico.

Specifici attributi di qualità critici (CQA) degli ADC sono:

- Rapporto Farmaco-Anticorpo (DAR - Drug-to-Antibody Ratio): È il numero medio di molecole di payload legate a un singolo anticorpo. Un DAR troppo basso riduce l'efficacia del farmaco; un DAR troppo alto può compromettere la stabilità strutturale dell'anticorpo o accelerarne la clearance epatica.
- Distribuzione delle Specie Coniugate (Drug Load Distribution): Gli ADC non sono molecole omogenee, ma miscele di specie con valori di DAR differenti (es. anticorpi con 0, 2, 4, 6 o 8 payload). Mappare questa distribuzione è vitale.
- Siti di coniugazione (Positional Isomers): Identificazione degli amminoacidi esatti (es. lisine di superficie o cisteine derivanti dalla riduzione dei ponti disolfuro) a cui si è legato il linker.
- Purezza: Presenza di frammenti di anticorpo libero, payload libero (altamente tossico).

PARTE I

1. Introduzione

I coniugati anticorpo-farmaco (Antibody-Drug Conjugates, ADC) rappresentano una delle più promettenti evoluzioni della terapia oncologica mirata. Essi combinano la specificità degli anticorpi monoclonali con l'elevata potenza citotossica di agenti chemioterapici (payload), coniugati attraverso un linker chimicamente stabile. Il razionale alla base degli ADC è quello di utilizzare l'anticorpo come "vettore intelligente" in grado di riconoscere selettivamente un antigene espresso sulla superficie delle cellule tumorali. Dopo il legame con il target, il complesso viene internalizzato e il farmaco citotossico viene rilasciato all'interno della cellula neoplastica, dove esercita la propria azione biologica, inducendo morte cellulare. Questa strategia consente di superare alcune delle principali limitazioni della chemioterapia convenzionale, permettendo la somministrazione di molecole altamente potenti che, se utilizzate in forma libera, risulterebbero eccessivamente tossiche. Inoltre, la possibilità di modulare le caratteristiche dell'anticorpo, del linker e del payload offre un'ampia flessibilità progettuale, rendendo gli ADC una piattaforma terapeutica altamente innovativa. Tuttavia, nonostante i significativi progressi clinici, permangono alcune criticità legate all'eterogeneità tumorale, ai meccanismi di resistenza, alla stabilità del coniugato e al profilo di sicurezza, che rendono necessaria una continua ottimizzazione di tali molecole [1].

La complessa architettura multicomponente degli ADC introduce livelli sovrapposti di eterogeneità, tra cui le distribuzioni del rapporto farmaco-anticorpo (DAR), le varianti di carica, le modificazioni post-traduzionali e le alterazioni strutturali sia a livello intatto che di subunità. Lungo tutto lo sviluppo degli ADC, queste caratteristiche sono considerate attributi critici di qualità (CQA) che devono essere caratterizzati, presi in esame e monitorati.

Alla luce dell'importanza crescente degli ADC nel panorama terapeutico oncologico, la presente tesi si propone di analizzare in modo sistematico questa classe di farmaci, con particolare attenzione agli aspetti farmacologici e analitici.

In particolare, gli obiettivi del lavoro sono:

- Descrivere brevemente l'evoluzione concettuale e tecnologica dei coniugati anticorpo-farmaco;
- Analizzarne, in modo sintetico, la struttura, il meccanismo d'azione e le principali caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche;
- Esaminare concisamente le applicazioni cliniche attualmente approvate e le principali limitazioni terapeutiche;
- Approfondire i metodi analitici impiegati per la caratterizzazione, il controllo qualità e la valutazione della stabilità degli ADC.

L'elaborato intende fornire una visione integrata che coniughi gli aspetti chimico-farmaceutici, farmacologici e tecnico-analitici relativi agli ADC.

2. Struttura e componenti degli Antibody-Drug Conjugates

L'architettura molecolare degli ADC si basa su tre componenti fondamentali: l'anticorpo monoclonale, il linker e il payload citotossico. L'interazione e l'ottimizzazione di questi elementi determinano le proprietà farmacologiche, l'efficacia clinica e il profilo di sicurezza del coniugato.

● La componente anticorpale

L'anticorpo monoclonale rappresenta l'elemento di riconoscimento selettivo dell'ADC. Generalmente si tratta di immunoglobuline di classe IgG, spesso di sottoclasse IgG1, scelte per la loro stabilità strutturale, lunga emivita plasmatica e capacità di interazione con il sistema immunitario. Il ruolo principale dell'anticorpo è quello di legarsi in maniera altamente specifica a un antigene espresso sulla superficie delle cellule tumorali. La selezione del target antigenico costituisce una fase cruciale nello sviluppo dell'ADC e deve soddisfare determinati requisiti:

- Elevata espressione sulle cellule neoplastiche
- Limitata o assente espressione nei tessuti sani
- Capacità di internalizzazione dopo il legame con l'anticorpo

Dopo il riconoscimento del bersaglio, il complesso antigene-anticorpo viene internalizzato mediante endocitosi mediata da recettore, permettendo il successivo rilascio intracellulare del farmaco citotossico. Oltre alla funzione di targeting, l'anticorpo può contribuire all'attività antitumorale attraverso meccanismi immunologici quali la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) e l'attivazione del complemento, ampliando così il potenziale terapeutico dell'ADC [1].

● Il linker chimico

Il linker è il ponte chimico che connette l'anticorpo al payload citotossico e rappresenta un elemento determinante per la stabilità e la sicurezza del coniugato. Esso deve garantire un'elevata stabilità in circolo per evitare il rilascio prematuro del farmaco e, al contempo, consentire un'efficiente liberazione del payload all'interno della cellula tumorale.

I linker possono essere distinti in due principali categorie:

a) Linker scindibili

Sono progettati per essere scissi in risposta a specifiche condizioni intracellulari, quali:

- pH acido lisosomiale
- Presenza di enzimi proteolitici
- Ambiente intracellulare riducente

Questa strategia consente un rilascio selettivo del farmaco una volta internalizzato il complesso.

b) Linker non scindibili

Richiedono la degradazione completa dell'anticorpo all'interno del lisosoma per liberare il principio attivo. Tali linker offrono generalmente maggiore stabilità sistemica, ma il rilascio del payload dipende strettamente dai processi catabolici intracellulari. La scelta del linker influenza non solo la stabilità farmacocinetica, ma anche il cosiddetto effetto bystander, ossia la capacità del farmaco rilasciato di diffondere nelle cellule tumorali adiacenti [1].

● Il payload citotossico

Il payload costituisce la componente farmacologicamente attiva dell'ADC. A causa del numero limitato di molecole di farmaco che possono essere coniugate a ciascun anticorpo, il principio attivo deve possedere un'elevatissima potenza citotossica, spesso nell'ordine picomolare o nanomolare.

Le principali classi di payload impiegate includono:

- Inibitori dei microtubuli, che interferiscono con la divisione cellulare
- Agenti danneggianti il DNA

- Inibitori della topoisomerasi I

La scelta del payload influenza profondamente il meccanismo d'azione, il profilo di tossicità e la possibilità di sviluppare resistenza terapeutica [1].

• Rapporto Farmaco-Anticorpo (Drug-to-Antibody Ratio DAR)

Un parametro critico nella progettazione degli ADC è il Drug-to-Antibody Ratio (DAR), ovvero il numero medio di molecole di farmaco coniugate a ciascun anticorpo. Un DAR troppo basso può ridurre l'efficacia terapeutica, mentre un DAR eccessivamente elevato può compromettere la stabilità del coniugato, aumentarne l'idrofobicità e favorire fenomeni di aggregazione o rapida clearance sistemica. Le moderne tecniche di coniugazione sito-specifica consentono di ottenere prodotti più omogenei, migliorando il controllo del DAR e riducendo l'eterogeneità strutturale rispetto alle prime generazioni di ADC.

L'efficacia clinica di un ADC non dipende da un singolo componente, ma dall'equilibrio ottimale tra anticorpo, linker e payload. La progettazione razionale di queste molecole richiede un approccio multidisciplinare che integri conoscenze di chimica farmaceutica, biotecnologia, farmacocinetica e farmacodinamica. La continua evoluzione delle tecnologie di coniugazione e la crescente comprensione dei meccanismi biologici alla base della risposta tumorale stanno contribuendo allo sviluppo di ADC sempre più selettivi, stabili ed efficaci [1].

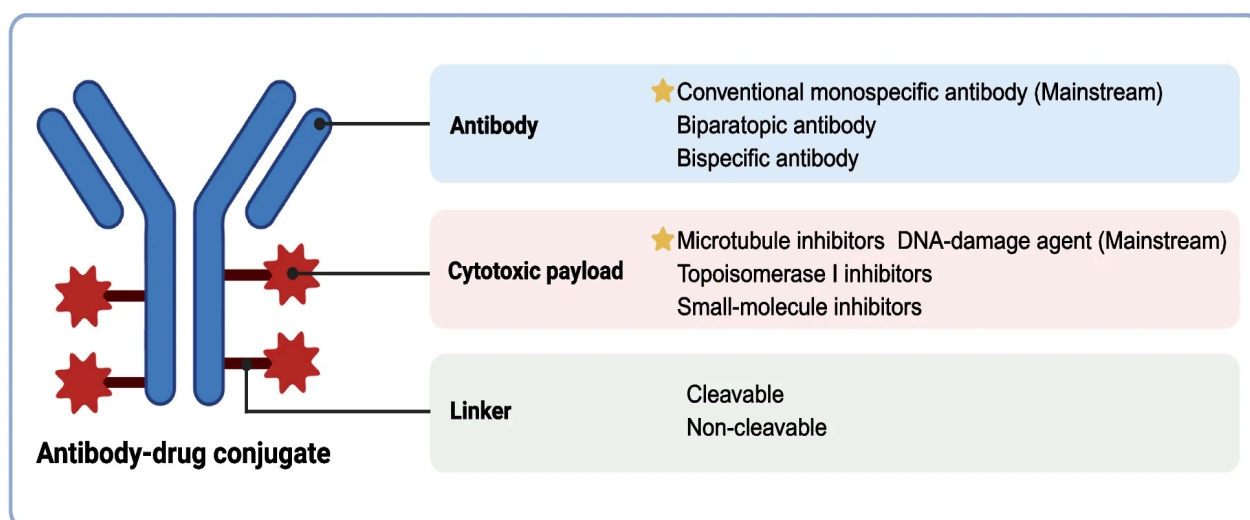


Fig 1: Componenti strutturali degli ADC, sono costituiti da tre componenti essenziali: un anticorpo monoclonale (mAb) per il targeting specifico del tumore, un agente citotossico per indurre morte delle cellule tumorali e un linker chimico che regola il rilascio del farmaco [1].

3. Meccanismo d'azione e farmacologia

Gli ADC esercitano la loro attività terapeutica attraverso un meccanismo d'azione multifasico che integra riconoscimento selettivo del bersaglio, internalizzazione cellulare e rilascio intracellulare di un agente citotossico altamente potente. La complessità strutturale di questi biofarmaci si riflette in un profilo farmacodinamico e farmacocinetico peculiare, che li distingue sia dagli anticorpi monoclonali convenzionali sia dai chemioterapici tradizionali.

- **Legame selettivo al target antigenico**

Il primo evento fondamentale nel meccanismo d'azione degli ADC è il legame altamente specifico tra l'anticorpo monoclonale e l'antigene espresso sulla superficie delle cellule tumorali. La selettività di questo riconoscimento costituisce il presupposto per la riduzione della tossicità sistemica e per la concentrazione preferenziale del farmaco nel tessuto neoplastico. La densità di espressione dell'antigene, la sua distribuzione nei tessuti sani e la capacità di internalizzazione del complesso antigene-anticorpo rappresentano fattori determinanti per l'efficacia terapeutica. Una volta avvenuto il legame, si attiva un processo di endocitosi mediata da recettore che consente l'ingresso del coniugato nella cellula bersaglio [1].

- **Internalizzazione e traffico intracellulare**

Dopo il legame al target, il complesso ADC-antigene viene internalizzato attraverso meccanismi endocitici e trasportato lungo il compartimento endosomiale fino ai lisosomi. In questo ambiente intracellulare caratterizzato da pH acido e presenza di enzimi proteolitici, si verificano le condizioni necessarie per il rilascio del payload citotossico. Il tipo di linker utilizzato influenza direttamente questa fase: nei linker scindibili, il rilascio del farmaco avviene per scissione chimica o enzimatica; nei linker non scindibili, è

necessaria la degradazione proteolitica completa dell'anticorpo per liberare il metabolita attivo [1].

- **Rilascio del payload e morte cellulare**

Una volta rilasciato nel citoplasma, il payload esercita la propria azione farmacologica interferendo con processi cellulari essenziali. A seconda della classe di farmaco impiegata, il meccanismo può includere:

- Inibizione della polimerizzazione dei microtubuli, con arresto del ciclo cellulare in fase mitotica;
- Induzione di danni al DNA; rotture del doppio filamento
- Inibizione della topoisomerasi I, con conseguente stress replicativo e apoptosi.

L'esito finale è l'attivazione di vie apoptotiche e la morte della cellula tumorale (Figura 2). In alcuni casi, il rilascio del farmaco può determinare anche un effetto bystander, ossia la diffusione del payload nelle cellule tumorali adiacenti, contribuendo a superare l'eterogeneità antigenica intratumorale. È un vantaggio nei tumori solidi eterogenei, ma può contribuire a tossicità "off-target" fuori dal bersaglio [1]

Interazioni farmacodinamiche e farmacocinetiche degli ADC

- **Farmacodinamica**

La farmacodinamica degli **ADC** studia come il farmaco interagisce con l'organismo e le cellule bersaglio per esercitare il suo effetto terapeutico e la sua tossicità. Da questo punto di vista, gli ADC combinano le proprietà biologiche dell'anticorpo con l'attività citotossica del payload. L'anticorpo può mantenere, oltre alla funzione di targeting, eventuali meccanismi immuno-mediati quali la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) e l'attivazione del complemento.

L'effetto terapeutico complessivo dipende da molteplici fattori, tra cui:

- Espressione e omogeneità del target tumorale;
- Stabilità del linker;
- Potenza e permeabilità del payload;
- Drug-to-Antibody Ratio (DAR).

L'interazione di questi parametri determina l'equilibrio tra efficacia antitumorale e tossicità sistemica [1].

La farmacodinamica studia il legame del farmaco con la molecola bersaglio e le sue conseguenze sulle funzioni biologiche, cioè il meccanismo d'azione. Il legame determina l'azione terapeutica. La farmacocinetica studia gli eventi a cui è sottoposto un farmaco quando viene a contatto con l'organismo

- **Farmacocinetica**

La farmacocinetica studia gli eventi a cui è sottoposto un farmaco quando viene a contatto con l'organismo. La farmacocinetica degli ADC presenta caratteristiche ibride, influenzate sia dalla componente anticorpale sia dal farmaco coniugato. A causa dell'elevato peso molecolare, gli ADC sono generalmente somministrati per via endovenosa e presentano una distribuzione prevalentemente vascolare e interstiziale. La penetrazione nei tumori solidi può essere limitata da fattori quali pressione interstiziale elevata e architettura vascolare disorganizzata. Il metabolismo avviene principalmente attraverso processi catabolici proteici, con degradazione dell'anticorpo nei lisosomi cellulari e successiva liberazione del farmaco o dei suoi metaboliti attivi. L'eliminazione degli ADC è mediata principalmente dal sistema reticoloendoteliale e dai normali processi di turnover proteico. Il payload libero eventualmente rilasciato può essere soggetto a ulteriori vie metaboliche epatiche. La stabilità del coniugato in circolo rappresenta un parametro cruciale: un rilascio prematuro del farmaco può aumentare la tossicità sistemica, mentre una stabilità eccessiva può ridurre l'efficacia intracellulare.

Gli ADC rappresentano una piattaforma terapeutica complessa, in cui il risultato clinico è il prodotto dell'interazione dinamica tra struttura molecolare, meccanismo d'azione e comportamento farmacocinetico. L'ottimizzazione di tali parametri consente di migliorare l'indice terapeutico, definito come rapporto tra efficacia antitumorale e tossicità. La comprensione approfondita dei meccanismi farmacologici alla base degli ADC è essenziale non solo per lo sviluppo di nuove molecole, ma anche per una gestione clinica appropriata [1].

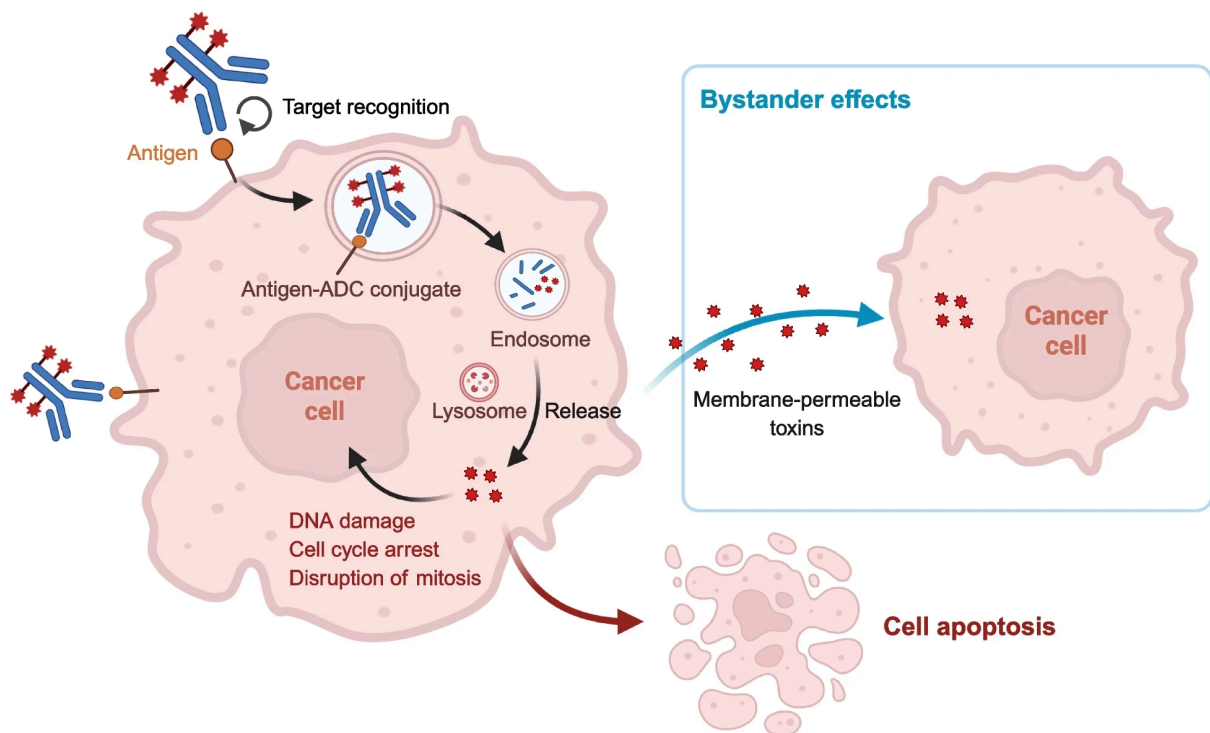


Fig 2: Meccanismi d'azione degli ADC. Dopo il legame con gli antigeni di superficie associati al tumore, il complesso ADC-antigene viene internalizzato tramite endocitosi, trasportato agli endosomi e ai lisosomi e subisce il rilascio intracellulare dell'agente citotossico, questo rilascio induce la morte cellulare (apoptosi) [1].

4. Principali ADC approvati, evoluzione, applicazioni cliniche, limiti, strategie di combinazione e prospettive future.

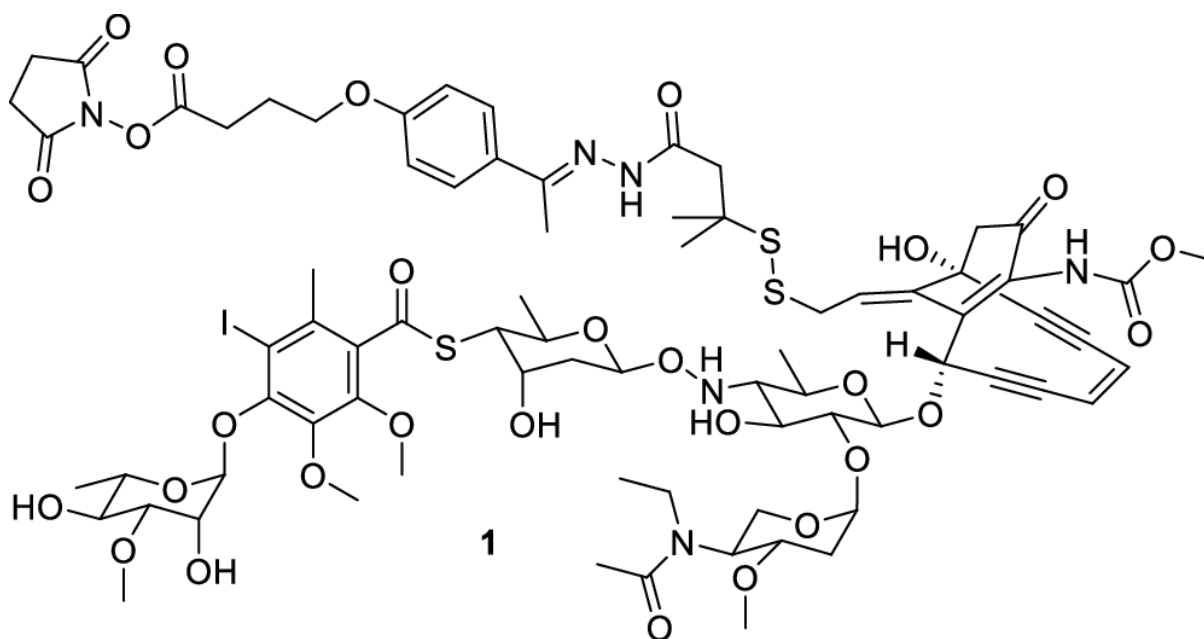
Negli ultimi vent'anni, la tecnologia degli ADC si è evoluta attraverso tre generazioni successive, passando da una semplice “proof of concept” a terapie di precisione programmabili. Attraverso queste tre generazioni, l'obiettivo principale è il miglioramento della selettività tumorale, la riduzione della tossicità e il superamento dei meccanismi di resistenza.

➤ Prima generazione (2000–2010)

La prima generazione di ADC, rappresentata da **gemtuzumab ozogamicina** (Mylotarg®), utilizzava anticorpi umanizzati coniugati in modo casuale a tossine come la calicheamicina. La calicheamicina è prodotta, mediante un processo di fermentazione, dal *Micromonospora echinospora* spp. *Calichensis*

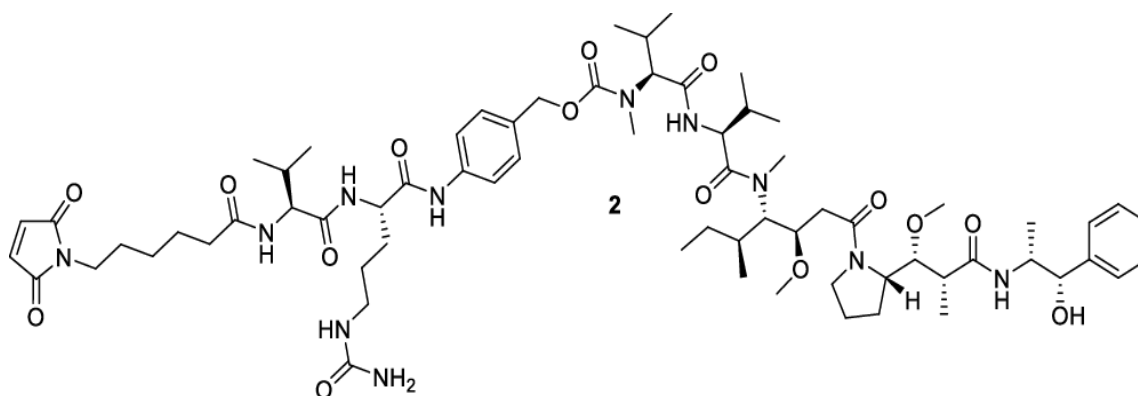
e si lega al DNA, causando una scissione specifica del doppio elica del DNA, portando alla morte cellulare. L'**ozogamicina (1)** è preparata a partire dalla γ -calicheamicina, che viene acetilata per poi attaccare il linker attivato. Tuttavia, questi primi ADC presentavano importanti limitazioni: instabilità dei linker, variabilità del rapporto farmaco/anticorpo (DAR), scarso controllo del payload.

Questi fattori determinavano una finestra terapeutica ristretta e una significativa tossicità off-target [2].



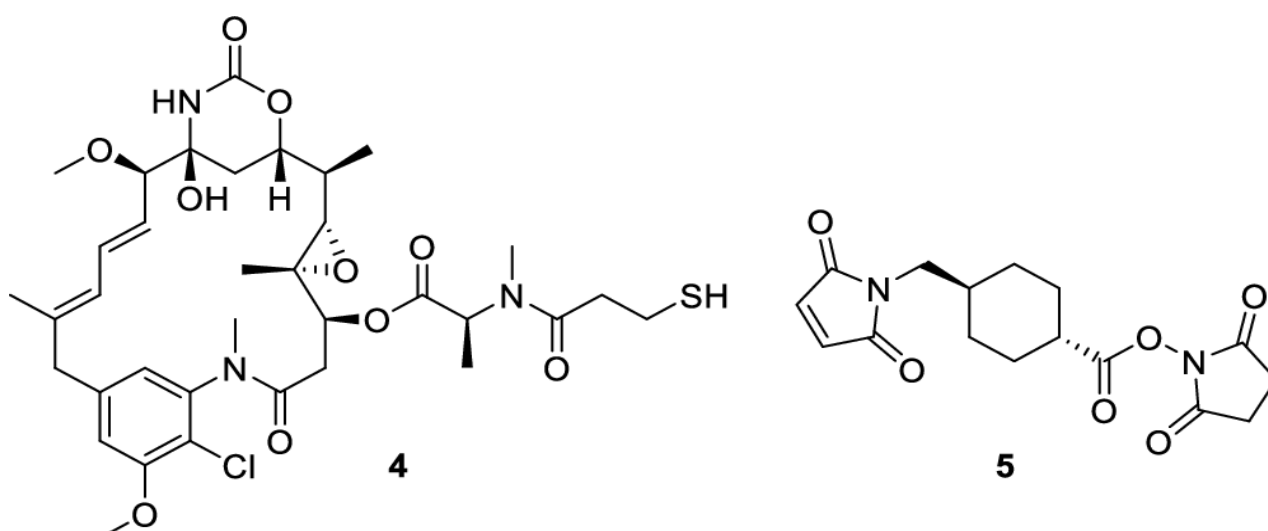
➤ Seconda generazione (2011–2018)

La seconda generazione rappresentata da **Brentuximab vedotin** (Adcetris®), il principio attivo deriva dal prodotto naturale marino (-)-dolastatin 10. Il componente citotossico della **vedotina (2)** è la mono-metilauristatina E (MMAE), un pentapeptide che viene assemblato mediante una sintesi convergente a partire da blocchi costitutivi di aminoacidi, tra cui due aminoacidi non naturali, dolaprolina e dolisoleucina [2].



L'MMAE è un agente antimitotico molto efficace che inibisce la divisione cellulare bloccando la polimerizzazione della tubulina. Gli auristatin hanno una potenza farmacologica da 100 a 1000 volte maggiore rispetto ad agenti microtubulari tradizionali.

Anche da **Trastuzumab emtansine** (Kadcyla®), Il componente citotossico dell'emtansina è la **mertansina (4)**, chiamata anche DM1) che è basata sulla maytansina, un prodotto naturale originariamente isolato dalla corteccia di un arbusto africano. La mertansina viene preparata mediante semisintesi, un processo in cui una fermentazione produce una miscela di ansamitocine che vengono ridotte a maytansinolo. La catena laterale viene quindi legata tramite un legame disolfuro, che viene poi ridotto per ottenere la mertansina. La coniugazione si ottiene mediante l'attacco iniziale del **linker bifunzionale (5)** all'anticorpo, seguito dalla coniugazione della mertansina [2].



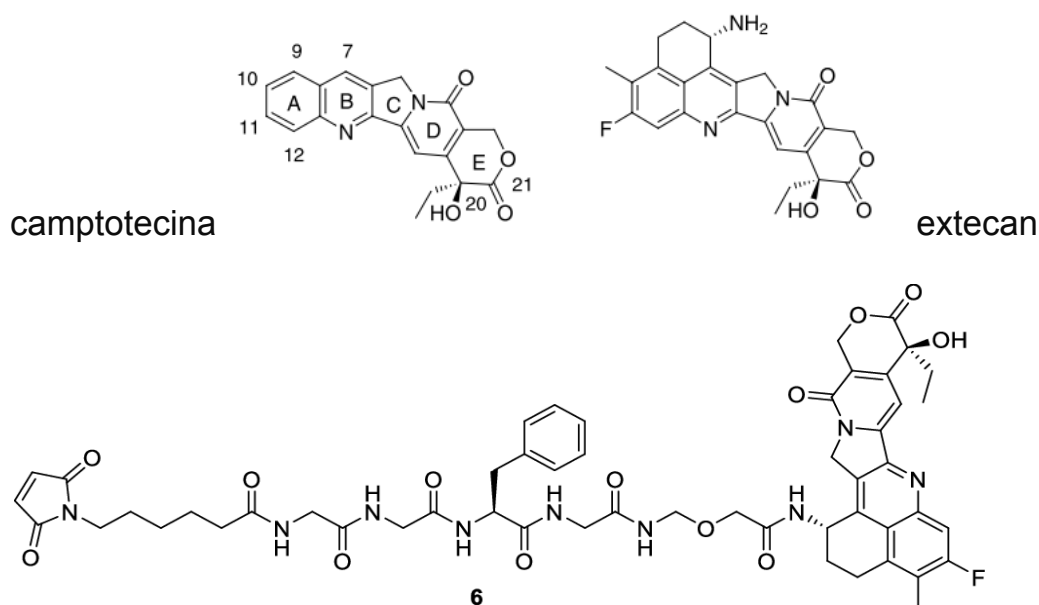
Questa generazione ha introdotto miglioramenti sostanziali: anticorpi maggiormente umanizzati, linker scindibili più stabili, siti di coniugazione

ingegnerizzati. Il DAR è diventato più uniforme (generalmente 3–4), migliorando la riproducibilità, il profilo farmacocinetico e ha consentito l'impiego di payload altamente potenti.

➤ Terza generazione (2019–oggi)

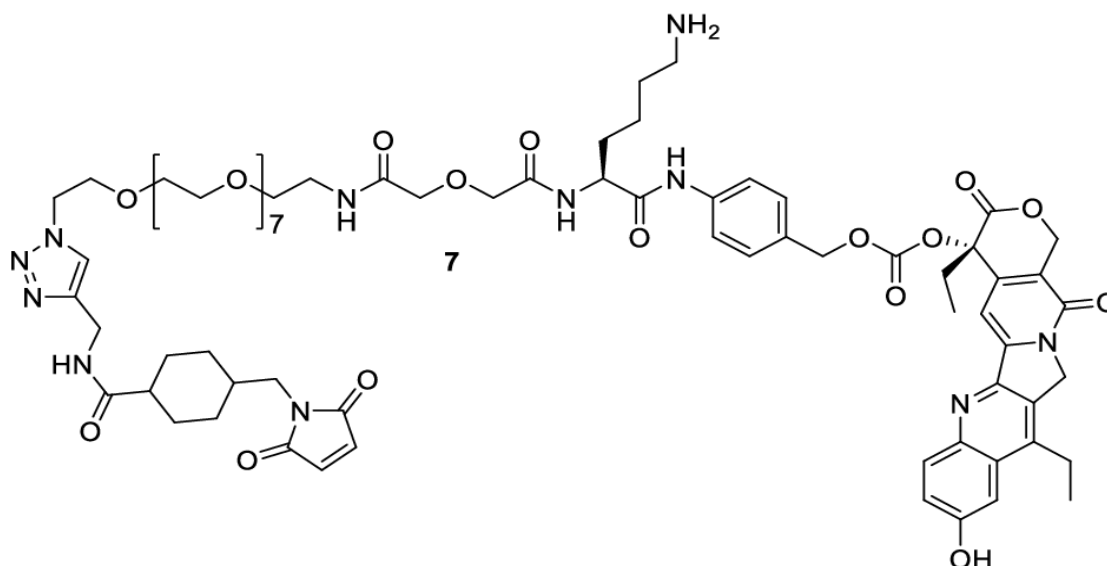
La terza generazione è caratterizzata dalla coniugazione sito-specifica, i linker attivati dall'ambiente tumorale, i nuovi payload come gli inibitori della topoisomerasi I (DXd, SN-38). Questi nuovi agenti presentano spesso un effetto “bystander”, che consente di eliminare anche le cellule tumorali adiacenti con bassa o eterogenea espressione dell'antigene.

Esempi significativi sono **Trastuzumab deruxtecan** (Enhertu®), Il componente citotossico del **deruxtecan (6)** è l'exatecan, un analogo strutturale della camptotecina, che viene isolato dall'albero *Camptotheca* utilizzato nella medicina tradizionale cinese. È stata riportata una vasta gamma di metodi per l'assemblaggio di questo tipo di molecole Chen, L.; Chen, F.-E. Total Synthesis of Camptothecins: An Update. Synlett 2017, 28, 1134-1150, <https://doi.org/10.1055/s-0036-1588738>.. Il linker scindibile è attaccato all'exatecan in un unico passaggio mediante la formazione di un legame amidico [2].



Sacituzumab govitecan (Trodelvy®), è un altro analogo strutturale della camptotecina, SN-38, è utilizzato come componente citotossico del **govitecan**

(7). Il linker è attaccato in due fasi: prima viene installato il gruppo carbonato scindibile, e poi il linker viene esteso mediante una reazione “click” per aggiungere il gruppo maleimide coniugabile [2].



● Applicazioni cliniche nelle neoplasie ematologiche

L'introduzione degli ADC nella pratica clinica ha rappresentato un'evoluzione sostanziale nel trattamento oncologico, consentendo d' integrare i principi della terapia target con la potenza della chemioterapia citotossica. L'interesse clinico verso questa classe di farmaci deriva dalla possibilità di migliorare l'indice terapeutico, ossia il rapporto tra efficacia antitumorale e tossicità sistemica, attraverso un rilascio selettivo del farmaco nelle cellule tumorali.

Le prime applicazioni cliniche degli ADC hanno riguardato le neoplasie ematologiche, contesto biologicamente favorevole per diverse ragioni:

- Elevata e relativamente omogenea espressione del target antigenico;
- Maggiore accessibilità delle cellule tumorali circolanti;
- Minori barriere fisiche alla distribuzione del farmaco rispetto ai tumori solidi.

Un esempio emblematico è rappresentato da **Gemtuzumab ozogamicin** (Mylotarg®) primo ADC approvato in oncologia. Dopo un iniziale ritiro dal mercato per tossicità epatica, è stato successivamente reintrodotta con

schema posologico ottimizzato diretto contro l'antigene CD33, espresso nella maggior parte dei casi di leucemia mieloide acuta (LMA). L'introduzione di questo ADC ha fornito un'opzione terapeutica mirata nei pazienti CD33-positivi, in particolare in combinazione con regimi chemioterapici standard.

Analogamente, Brentuximab vedotin (Adcetris®), diretto contro CD30, ha dimostrato un significativo beneficio clinico nel linfoma di Hodgkin e in altre neoplasie CD30-positive, ha dimostrato elevati tassi di risposta.

In ambito ematologico, gli ADC hanno quindi consolidato il loro ruolo soprattutto nei pazienti recidivanti o refrattari, offrendo alternative terapeutiche laddove le opzioni tradizionali risultavano limitate [1].

- **Applicazioni cliniche nei tumori solidi**

L'estensione degli ADC ai tumori solidi ha rappresentato una sfida più complessa, principalmente a causa dell'eterogeneità antigenica e delle barriere fisiche che limitano la penetrazione tissutale. Tuttavia, i progressi tecnologici nelle strategie di coniugazione e nello sviluppo di payload più potenti hanno consentito risultati clinici rilevanti.

Nel carcinoma mammario HER2-positivo, Trastuzumab emtansine T-DM1 (Kadcyla®) ha dimostrato superiorità rispetto ad alcune terapie standard, combinando l'attività anti-HER2 dell'anticorpo con l'azione citotossica del DM1. Successivamente, Trastuzumab deruxtecan T-DXd (Enhertu®) ha ulteriormente ampliato le possibilità terapeutiche, mostrando efficacia anche in pazienti con bassa espressione di HER2 (HER2-low) precedentemente non candidabili a terapia anti-HER2, carcinoma gastrico, carcinoma mammario HER2-positivo.

Un ulteriore esempio è Sacituzumab govitecan (Trodelvy®), diretto contro TROP-2, che ha evidenziato benefici clinici nel carcinoma mammario triplo negativo, carcinoma uroteliale, ampliando l'impiego degli ADC in sottotipi tumorali ad elevato bisogno terapeutico.

L'impiego clinico degli ADC nei tumori solidi ha quindi dimostrato come l'ottimizzazione di linker, DAR e payload possa compensare parzialmente le limitazioni legate alla distribuzione e all'eterogeneità tumorale [1].

- **Profilo di sicurezza e gestione clinica**

Trastuzumab deruxtecan T-DXd (Enhertu®) ha migliorato significativamente la sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS) nei pazienti con carcinoma mammario HER2-basso nello studio DESTINY-Breast04, estendendo la sopravvivenza libera da progressione mediana da 5,1 a 9,9 mesi e la sopravvivenza globale da 16,8 a 23,4 mesi, con un tasso di risposta obiettiva (ORR) del 52,6%. Allo stesso modo, Sacituzumab govitecan (Trodelvy®) ha raggiunto una sopravvivenza libera da progressione (PFS) mediana di 5,6 mesi e un tasso di risposta obiettiva del 35% nello studio ASCENT per il Tumore al seno triplo negativo (TNBC) refrattario, superando la chemioterapia convenzionale [1].

Nonostante la maggiore selettività rispetto alla chemioterapia convenzionale, gli ADC presentano un profilo di tossicità non trascurabile, strettamente correlato alla natura del payload e alla stabilità del coniugato. Le tossicità più frequentemente osservate includono:

- Mielosoppressione (neutropenia, anemia, trombocitopenia);
- Tossicità gastrointestinale;
- Complicazioni oculari;
- Epatotossicità;
- Neuropatia periferica (soprattutto con inibitori dei microtubuli);
- Malattia polmonare interstiziale, descritta in particolare con alcuni ADC di nuova generazione (T-DXd).

Dal punto di vista farmacologico, la tossicità può derivare da:

- Rilascio prematuro del payload in circolo;
- Espressione del target in tessuti sani (effetto on-target off-tumor);
- Effetto bystander e diffusione del farmaco in cellule non tumorali.

Per migliorare l'indice terapeutico degli ADC, gli sforzi di ricerca in corso si concentrano sul miglioramento della stabilità del linker, sulla riduzione del rilascio prematuro del carico utile sistemico, sull'ottimizzazione del DAR e sulla selezione di target con elevata specificità tumorale ed efficiente internalizzazione [1].

La gestione clinica richiede un attento monitoraggio laboratoristico e clinico, nonché eventuali riduzioni di dose o sospensione del trattamento in presenza di eventi avversi significativi. In questo contesto, il farmacista ospedaliero svolge un ruolo fondamentale nel controllo della corretta preparazione, conservazione e somministrazione di tali farmaci complessi.

- **Limiti biologici e farmacologici**

Uno dei principali limiti degli ADC è rappresentato dall'eterogeneità dell'espressione del target all'interno del tumore. La presenza di sottopopolazioni cellulari con bassa o assente espressione antigenica può determinare una risposta terapeutica parziale e favorire la selezione clonale di cellule resistenti.

La resistenza agli ADC può insorgere attraverso diversi meccanismi: Downregolazione o perdita dell'antigene target; Alterazioni nei processi di internalizzazione; Modificazioni del traffico endolisosomiale; Sovraespressione di pompe di efflusso; Alterazioni delle vie apoptotiche. Tali fenomeni possono ridurre l'efficacia del trattamento e limitarne la durata nel tempo.

Nei tumori solidi, la penetrazione dell'ADC può essere ostacolata da: Un'elevata pressione interstiziale; una struttura vascolare disorganizzata; la presenza di matrice extracellulare densa.

Questi fattori possono limitare la distribuzione omogenea del farmaco all'interno della massa tumorale.

- **Limiti industriali e regolatori**

Gli ADC sono biofarmaci altamente complessi dal punto di vista produttivo. La loro sintesi richiede il controllo rigoroso del DAR , la riduzione dell'eterogeneità strutturale, una stabilità chimico-fisica adeguata, la standardizzazione dei processi di coniugazione.

Inoltre, i costi di sviluppo e produzione risultano elevati, influenzando l'accessibilità terapeutica e le decisioni di rimborsabilità nei diversi sistemi sanitari. Dal punto di vista regolatorio, la valutazione di qualità, sicurezza ed efficacia richiede un approccio integrato che tenga conto della natura ibrida del prodotto, biologico e citotossico al tempo stesso.

Gli ADC rappresentano una delle più promettenti strategie terapeutiche nel panorama oncologico contemporaneo. Le evidenze cliniche disponibili confermano il loro potenziale nel migliorare l'outcome di pazienti affetti da neoplasie complesse, sia ematologiche sia solide. Tuttavia, la loro piena integrazione nella pratica clinica richiede un'attenta valutazione del rapporto beneficio-rischio, una selezione accurata dei pazienti e un continuo miglioramento tecnologico volto a superare i limiti biologici e farmacologici attualmente esistenti [1].

- **Strategie di combinazione terapeutica e prospettive future**

L'evoluzione degli ADC è orientata verso una maggiore personalizzazione terapeutica, l'identificazione di biomarcatori predittivi e l'integrazione con altre strategie antitumorali, nell'ottica di una medicina sempre più mirata e razionale.

Le attuali ricerche cliniche stanno esplorando combinazioni con:

- Inibitori dei checkpoint immunitari (anti-PD-1 / anti-PD-L1)
- Chemioterapia standard
- Terapie target
- Inibitori di PARP

L'obiettivo è di Superare la resistenza; Potenziare la risposta immunitaria; Prolungare la durata della risposta. L'evoluzione degli ADC sta entrando in una fase altamente sofisticata.

- **ADC di quarta generazione:** Con le seguenti caratteristiche in sviluppo; Coniugazione ultra-stabile e completamente sito-specifica, DAR modulabile e controllato dinamicamente, Payload multi-funzionali, Miglior penetrazione nei tumori solidi.
- **ADC bispecifici:** Progettati per riconoscere due antigeni differenti, affrontare la resistenza tumorale, migliorare selettività e internalizzazione.
- **Immuno-ADC:** Una nuova frontiera che combina; Payload citotossici, Modulatori immunitari. L'obiettivo è trasformare il microambiente tumorale da immunosoppressivo a immunoattivo.
- **ADC con carichi non citotossici:** mirano a sbloccare bersagli precedentemente non trattabili farmacologicamente [1]

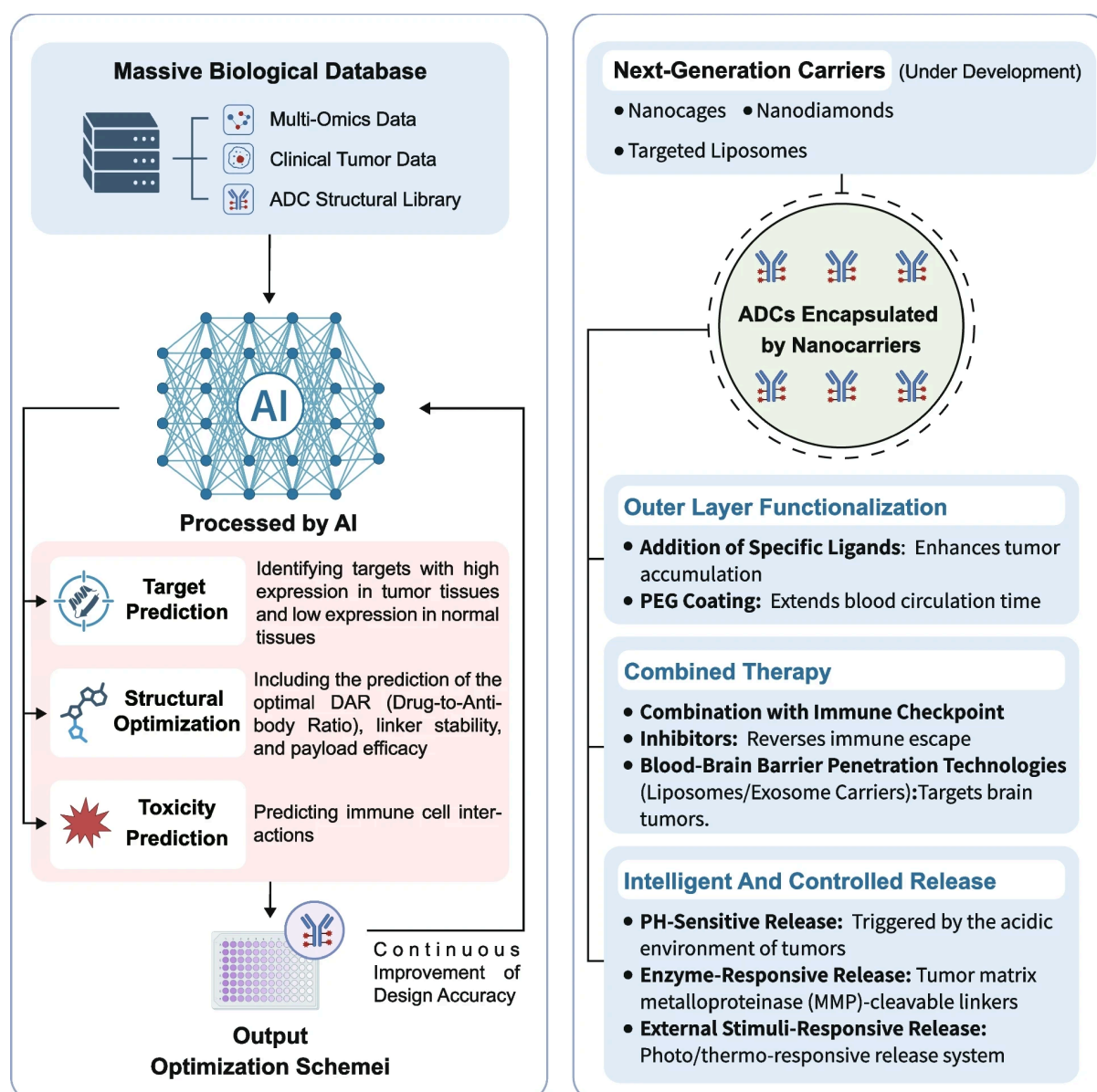


Fig 4: Strategie emergenti per migliorare la precisione e la somministrazione degli ADC. Due principali approcci sono in fase di studio per ottimizzare l'efficacia degli ADC. A sinistra, le piattaforme basate sull'intelligenza artificiale integrano dati multi-omici, profili clinici del tumore e librerie strutturali per guidare l'identificazione del bersaglio, il perfezionamento strutturale (ad esempio, DAR, tipo di linker) e la previsione della tossicità. Ciò facilita l'ottimizzazione iterativa della progettazione degli ADC. A destra, i sistemi basati su nanovettori, tra cui nanocage, nanodiamanti e liposomi mirati, sono in fase di sviluppo per migliorare l'accumulo nel tumore, prolungare la circolazione e supportare il rilascio controllato del farmaco. Strategie di funzionalizzazione, come l'aggiunta di ligandi e la PEGilazione, insieme a meccanismi di rilascio intelligenti attivati dal pH, dall'attività enzimatica o da stimoli esterni, offrono promettenti prospettive per migliorare la precisione terapeutica e la biodisponibilità [1].

PARTE II : METODI ANALITICI PER LA CARATTERIZZAZIONE DEGLI Antibody-Drug Conjugates

5. Tecniche Analitiche per la Caratterizzazione

Nessuna singola tecnica analitica è in grado di fornire una caratterizzazione esaustiva del prodotto. È pertanto necessario un approccio multidimensionale che combini metodologie separative, spettroscopiche e bioanalitiche, al fine di garantire il controllo di qualità, la riproducibilità, la purezza e la sicurezza del farmaco.

- **Tecniche Cromatografiche**

Le tecniche cromatografiche rappresentano uno dei pilastri fondamentali nell'analisi degli ADC, grazie alla loro capacità di separare specie molecolari complesse sulla base di proprietà fisico-chimiche differenti.

- **Cromatografia di esclusione dimensionale (SEC)**

Una promettente strategia analitica emersa di recente prevede l'uso di SEC-UV per l'analisi simultanea di DAR (Drug to Antibody Ratio), impurità correlate al farmaco libero e purezza complessiva degli ADC. Questo metodo è applicabile solo se l'anticorpo e il linker-payload presentano massimi di assorbimento UV/visibile distinti. Può essere considerato un metodo multi-attributo (MAM) perché un'unica corsa cromatografica fornisce più informazioni indipendenti sullo stato del campione, permette anche di monitorare contemporaneamente diversi aspetti della qualità del prodotto.

Oltre alla quantificazione di aggregati e frammenti, la SEC esclude efficacemente le impurità del farmaco libero dai picchi correlati agli ADC e migliora l'accuratezza della determinazione del DAR attraverso la rilevazione UV a doppia lunghezza d'onda. Il contenuto relativo di impurità del farmaco libero può quindi essere determinato confrontando i picchi correlati al farmaco

libero e quelli correlati agli ADC a una lunghezza d'onda in cui l'assorbimento UV è attribuito esclusivamente al linker-payload. L'applicabilità del metodo SEC-UV sviluppato è stata dimostrata su intermedi di processo ADC e ADC foto-degradati, evidenziandone l'utilità per supportare il monitoraggio in corso di processo e lo sviluppo di processi in fase iniziale in vari programmi ADC (Fig.5). È interessante notare che gli autori hanno impiegato colonne SEC bioinerti (Waters Acquity Premier), un aspetto cruciale per le biomolecole sensibili, al fine di minimizzare il potenziale adsorbimento e soprattutto in condizioni di fase mobile altamente acquosa. Tuttavia, è importante tenere presente che questo metodo non fornisce una caratterizzazione esaustiva del DLD e la profilazione delle singole specie di impurità del farmaco libero. Inoltre, un grave svantaggio è la sua incompatibilità con la MS, dovuta all'utilizzo di una fase mobile non volatile composta da 50 mM di fosfato di sodio, 200 mM di arginina-HCl, 10% di ACN a pH 6,8 [3].

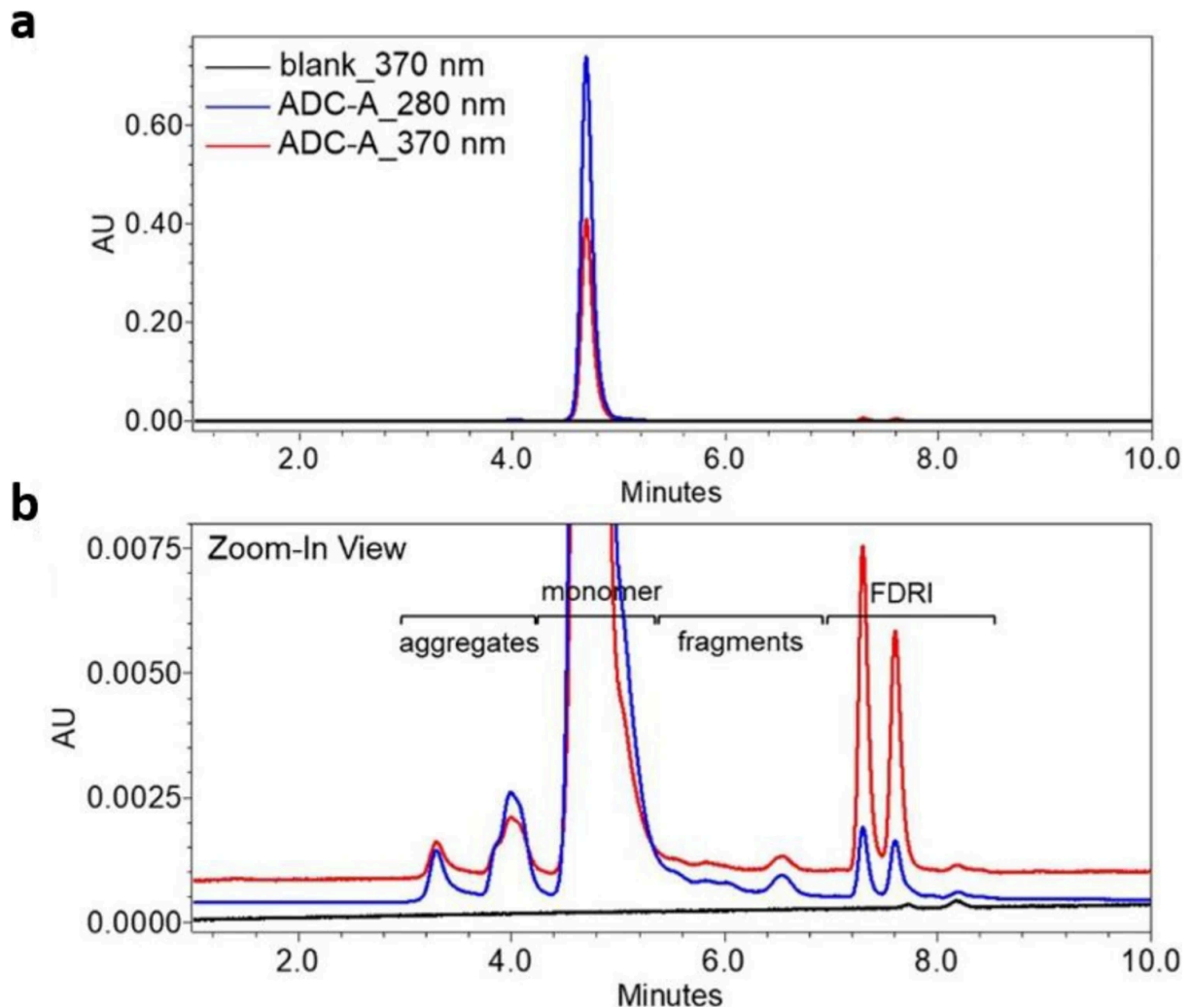


Fig.5: **a.** Cromatogrammi SEC di ADC-A con rilevamento UV a 280 e 370 nm. È incluso un cromatogramma del bianco rilevato a 370 nm per illustrare i picchi del sistema. **b.** Vista ingrandita per focalizzare l'attenzione su aggregati, frammenti e picchi di impurità correlati al farmaco libero [3].

- Cromatografia a interazione idrofobica (HIC)

La cromatografia a interazione idrofobica (HIC) utilizza l'idrofobicità per separare i composti senza perdere le loro conformazioni proteiche. La HIC viene spesso utilizzata prima di altri approcci analitici, per garantire il DAR (Drug to Antibody Ratio) e la coniugazione effettiva ma anche nell'industria farmaceutica. L'HIC è il gold standard per la valutazione della qualità e rappresenta lo standard di riferimento per la sua accuratezza e rapidità nella quantificazione del DAR, ed è importante sottolineare che le condizioni utilizzate per l'HIC sono blande e non denaturanti, preservando l'integrità

strutturale dell'ADC, in particolare la struttura a Y (lo stato nativo) dell'anticorpo [4].

Negli ultimi anni, Eeltink et al. hanno approfondito la comprensione meccanicistica della ritenzione e della selettività dell'HIC, ma soprattutto per i mAb. Il loro lavoro ha sottolineato l'importanza della composizione della fase mobile per regolare la selettività/ritenzione, dimostrando che gli ioni cloruro possono sostituire efficacemente il solfato di ammonio. Hanno anche dimostrato che l'aumento della lunghezza della colonna migliora la risoluzione, poiché la ritenzione HIC non segue un meccanismo di ritenzione on-off. Inoltre, hanno sottolineato l'importanza di utilizzare colonne HIC avanzate, leggermente idrofobiche, idealmente impaccate con particelle di piccole dimensioni (inferiori a 3 μm) e di valutare diversi sali (ad esempio solfato di ammonio, acetato di sodio e cloruro di sodio) durante lo sviluppo del metodo. In alcuni casi, l'incorporazione di modificatori organici e l'uso di un gradiente logaritmico anziché lineare possono ulteriormente migliorare le prestazioni di separazione ADC [3].

Il processo inizia con l'iniezione del campione in una fase mobile ad alta concentrazione salina, che facilita il legame delle proteine alla superficie di una fase stazionaria moderatamente idrofobica. Spesso viene utilizzata un'eluizione a gradiente, al fine di ridurre la concentrazione salina (gradiente salino inverso). Solitamente, la fase mobile A è costituita da 1,5-2 M di solfato di ammonio o acetato di ammonio più 0,1 M di tampone fosfato, che rappresenta la fase mobile B. Il pH deve essere il più vicino possibile al punto isoelettrico della proteina, mentre la temperatura della colonna deve essere inferiore a 30 °C. Il solfato di ammonio è il tampone più comunemente utilizzato per l'HIC [4].

Zhang et al. hanno ulteriormente semplificato la configurazione HIC-MS integrando un sistema di make-up e split-flow. Un flusso di make-up (100% acqua, 1,5 mL/min) viene introdotto tra la colonna HIC e la cella di flusso UV per diluire la concentrazione di sale prima dell'analisi MS. Il flusso elevato (1,8 mL/min) viene quindi suddiviso in un flusso di scarto (~ 1,6 mL/min) e un flusso diretto alla MS tramite una sorgente HESI (~ 0,2 mL/min). I ricercatori hanno inoltre, introdotto una denaturazione post-colonna (PCD), per caratterizzare direttamente gli isomeri posizionali dell'ADC, sostituendo l'acqua con una soluzione denaturante come flusso di make-up. È stata ottenuta un'efficace HIC-MS assistita da PCD utilizzando una soluzione di ACN al 30% con FA al 2%, che ha permesso la completa denaturazione dell'ADC, mantenendo al contempo una sensibilità MS sufficiente a fornire le

informazioni sui frammenti delle subunità per facilitare l'identificazione degli isomeri posizionali (Fig.6) [3].

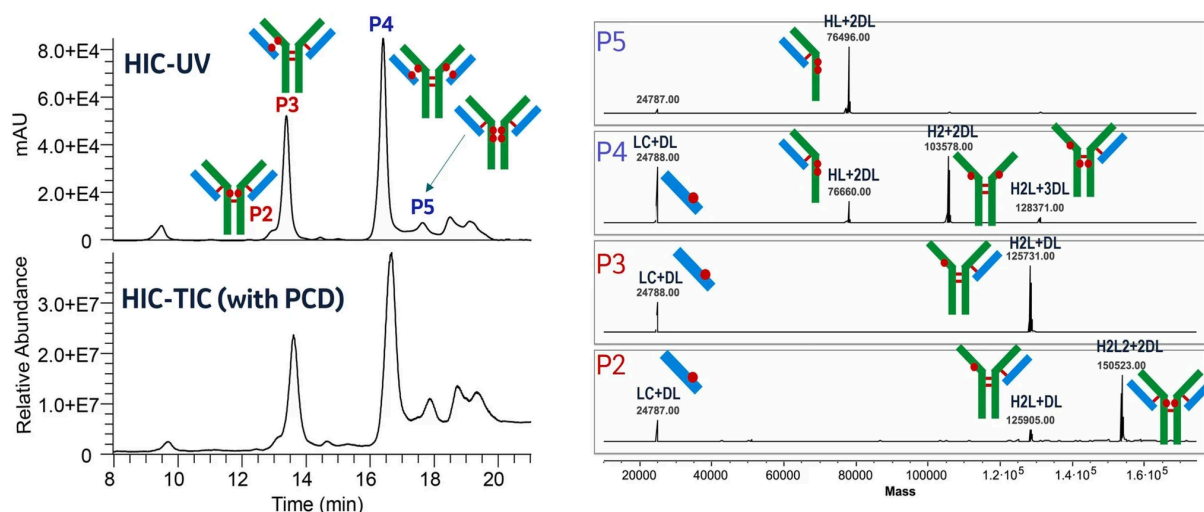


Fig.6: Pannello di sinistra: profili di separazione HIC-UV e HIC-TIC in condizioni PCD. Pannello di destra: spettri di massa deconvoluti dei quattro picchi HIC-TIC P2, P3, P4 e P5, che mostrano i frammenti caratteristici generati da diversi isomeri posizionali [3].

- Cromatografia a fase inversa (RP-HPLC)

Un tipo di cromatografia liquida più comune e utilizzato è quello a fase inversa. La cromatografia liquida a fase inversa nativa (nRPLC) è stata suggerita come una modalità cromatografica valida per la caratterizzazione delle specie DAR. Essa consente di identificare il farmaco libero; quantificare impurità correlate al payload; studiare i processi di deconiugazione. I vantaggi intrinseci della nRPLC risiedono nella sua compatibilità diretta con la MS utilizzando una concentrazione di sale significativamente inferiore, tipicamente intorno a 50 mM di acetato di ammonio.

Per supportare questo metodo, Phenomenex ha sviluppato due tipi di colonne, ciascuna con una diversa idrofobicità, che consentono l'eluizione con una bassa concentrazione di sale compatibile con la MS e tampone organico. Per facilitare l'eluizione di specie DAR altamente idrofobiche, è stato impiegato un gradiente con una percentuale crescente di isopropanolo. Tuttavia, la concentrazione di solvente organico è stata attentamente limitata a un massimo del 25% per evitare la denaturazione delle proteine. Questa strategia è stata applicata con successo a un'ampia gamma di ADC, comprese le specie legate tra catene (con valori DAR eterogenei che vanno

da 0 a 8) e gli ADC sito-specifici. È stata osservata una forte correlazione tra i risultati ottenuti con questo metodo e quelli della HIC convenzionale. È interessante notare che l'anticorpo non coniugato (DAR0) è stato trattenuto con successo con un sale a bassa forza ionica utilizzando questo metodo, e il metodo ha facilitato la separazione cromatografica degli isomeri posizionali delle specie DAR4 con diversi legami di coniugazione, cosa non realizzabile con la HIC tradizionale. È importante sottolineare che, nonostante l'assenza di legami disolfuro intercatena per il collegamento tra la catena pesante (HC) e la catena leggera (LC) in diverse specie DAR, l'integrità strutturale è stata ben preservata utilizzando il metodo, confermando la natura non denaturante della nRPLC [3].

L'analisi di molecole ad alto peso molecolare come l'ADC può comportare problemi associati al forte adsorbimento nella fase stazionaria, alla denaturazione o alla bassa sensibilità. Inoltre, la dimensione dei pori e il diametro delle particelle sono variabili e potrebbero influenzare i risultati. Per evitare questi problemi, alcuni scienziati hanno deciso di utilizzare temperature molto elevate o fasi stazionarie a catena più corta, come ad esempio C4, o di aggiungere un acido forte come l'acido trifluoroacetico (TFA). Uno degli approcci ampiamente utilizzati per la RPLC è la digestione proteolitica o la riduzione mediante aggiunta di ditiotreitolo (DTT). In questo modo, attraverso vari calcoli basati sull'analisi quantitativa del farmaco, è possibile tracciare il calcolo del DAR [4].

La separazione mediante RP-HPLC funziona bene per le forme coniugate in siti specifici (le cisteine intercatena); tuttavia, la risoluzione dei coniugati più eterogenei legati alla lisina non è stata ottenuta con RP-HPLC. La figura mostra esempi di separazione mediante RP-HPLC applicata a campioni di un coniugato cAC10-vcMMAE ridotto con DTT, prodotto in diverse condizioni di fabbricazione [5] (Fig.7).

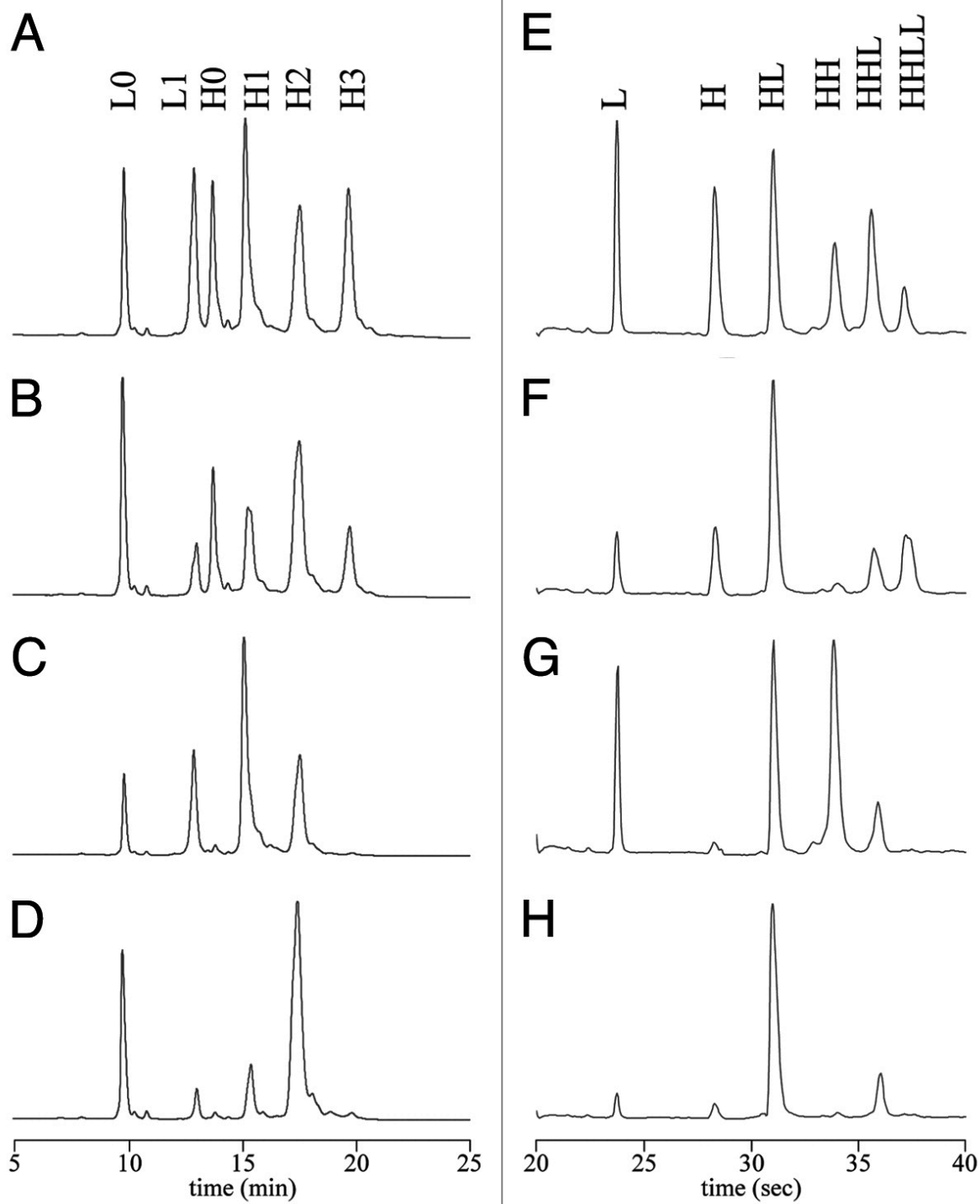


Fig.7: (A–D) Analisi HPLC in fase inversa di coniugati ridotti con DTT prodotti utilizzando diversi protocolli di riduzione/riossidazione. (E–H) Analisi degli stessi campioni di coniugato in (A–D), in condizioni non riducenti, utilizzando l'Agilent Bioanalyzer™, un sistema basato su chip di silicio per l'elettroforesi capillare in presenza di SDS (CE-SDS) [5].

- Cromatografia a scambio ionico (IEX)

La cromatografia a scambio ionico è impiegata per l'analisi delle varianti di carica dell'anticorpo, derivanti da modificazioni chimiche o post-traduzionali. Tali varianti possono influenzare la stabilità e l'attività biologica del coniugato. Ad esempio: Khawli e colleghi hanno scelto di utilizzare la cromatografia a scambio ionico (cationico) per separare le varianti di carica negli anticorpi monoclonali. Il gruppo ha separato tre diverse varianti di carica [4].

● **Elettroforesi capillare**

L'elettroforesi capillare (CE) è una tecnica in grado di separare le molecole in un campo elettrico in base alle dimensioni e alla carica. Gli analiti sono separati a causa delle differenze nella mobilità elettroforetica, che varia con la carica, la viscosità del solvente e le dimensioni. L'elettroforesi capillare è utile per separazioni ad alte prestazioni. La CE trova la sua principale applicazione nell'analisi di farmaci a base di macromolecole, dove il suo meccanismo di separazione elettroforetica offre una separazione distinta e spesso superiore delle macromolecole rispetto alle classiche tecniche cromatografiche.

Diverse modalità di CE, tra cui l'elettroforesi capillare con dodecil solfato di sodio (CE-SDS), l'elettroforesi capillare zonale (CZE) e la focalizzazione isoelettrica capillare (CIEF)/focalizzazione isoelettrica capillare con immagini (icIEF), sono comunemente utilizzate nella caratterizzazione degli attributi critici di qualità (CQA) dei farmaci a base di anticorpi monoclonali. L'eterogeneità di carica si riferisce alla presenza di varianti correlate al prodotto all'interno di un biofarmaco che differiscono dalla molecola principale nella loro carica netta e la loro presenza può avere un impatto negativo sull'efficacia e sul profilo farmacocinetico del prodotto [4]. Diverse modalità di separazione mediante elettroforesi capillare (CE) si sono dimostrate efficaci nell'identificazione delle varianti di carica:

- **L'elettroforesi capillare con dodecil solfato di sodio (CE-SDS)** per caratterizzare gli ADC focalizzandosi sulle varianti di carica e la profilazione del punto Isoelettrico. I principali vantaggi sono rappresentati dal basso volume del campione e dalla rapidità del metodo [4]. Liu et al hanno utilizzato questo metodo per la separazione e l'analisi dell'anticorpo monoclonale chimerico BR96, del corrispondente immunoconiugato preparato tra BR96 e il farmaco antitumorale doxorubicina (BR96-DOX). L'SDS-PAGE è stata eseguita in una colonna capillare rivestita, riempita con una matrice di gel a base

di soluzione polimerica. Un rivelatore di assorbanza UV e un rivelatore di fluorescenza basato su laser a ioni di argon, sono stati integrati in questo sistema, fornendo informazioni complementari per la determinazione delle specie coniugate. Sia l'anticorpo monoclonale che gli immunoconiugati sono stati studiati rispettivamente nei loro stati nativo, denaturato e ridotto. Sei picchi sono stati identificati dopo la separazione del BR96-DOX denaturato, ed è stato confermato che questi picchi corrispondono a tutte le possibili specie coniugate [5].

- L'**elettroforesi capillare zonale (CZE)** consente la separazione delle varianti di una proteina sulla base delle differenze di mobilità elettroforetica. Questa tecnica risulta particolarmente interessante perché è facilmente accoppiabile con la spettrometria di massa mediante ionizzazione elettrospray (ESI-MS), caratteristica che ne ha favorito un intenso sviluppo nell'ambito della caratterizzazione delle proteine terapeutiche.
- La **CZE-MS sheathless**, configurazione dell'accoppiamento tra **CZE** e **spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (ESI-MS)** in cui non viene utilizzato il tradizionale *sheath liquid* all'interfaccia tra capillare ed elettrospray, può essere impiegata per caratterizzare la struttura primaria di ADC coniugati tramite residui di cisteina utilizzando un approccio *bottom-up*. In particolare, l'analisi **CZE-MS/MS** focalizzata sui peptidi permette contemporaneamente:
 - la localizzazione dei payload,
 - la determinazione della sequenza amminoacidica,
 - la profilazione della glicosilazione.
 - L'applicazione della CZE-MS può inoltre essere sfruttata per monitorare l'eterogeneità degli ADC a livello di proteina intatta.

Questo approccio è stato utilizzato per sei ADC ingegnerizzati tramite cisteina, incluso un coniugato anticorpo-oligonucleotide. In condizioni denaturanti, la CZE-MS ha consentito la separazione delle varianti di carica intatte e dei frammenti degli ADC. Il confronto dei dati ottenuti ha evidenziato che sia la natura dell'anticorpo monoclonale di partenza sia il tipo di payload influenzano la separazione in CZE e l'eterogeneità delle varianti del prodotto.

Recentemente è stato sviluppato un nuovo metodo per determinare la distribuzione del farmaco nell'ADC HER3-DXd mediante CZE-MS. In

questo approccio è stata introdotta una fase di preconcentrazione innovativa, definita stacking a doppio campione di grande volume, che consente l'isolamento online del farmaco dalla matrice biologica prima della separazione CZE, evitando ulteriori procedure di preparazione del campione [3].

- **La focalizzazione isoelettrica capillare con imaging (icIEF)** per la caratterizzazione di ADC legati alla cisteina in condizioni native. Utilizzando questo metodo, sono stati caratterizzati due ADC: polatuzumab vedotin, un ADC di nuova generazione legato alla cisteina, e brentuximab vedotin, il primo ADC legato alla cisteina approvato dalla FDA utilizzando il rilevamento ultravioletto (UV) comunemente implementate nei laboratori di controllo qualità (QC) [4]. **(Fig.8)**

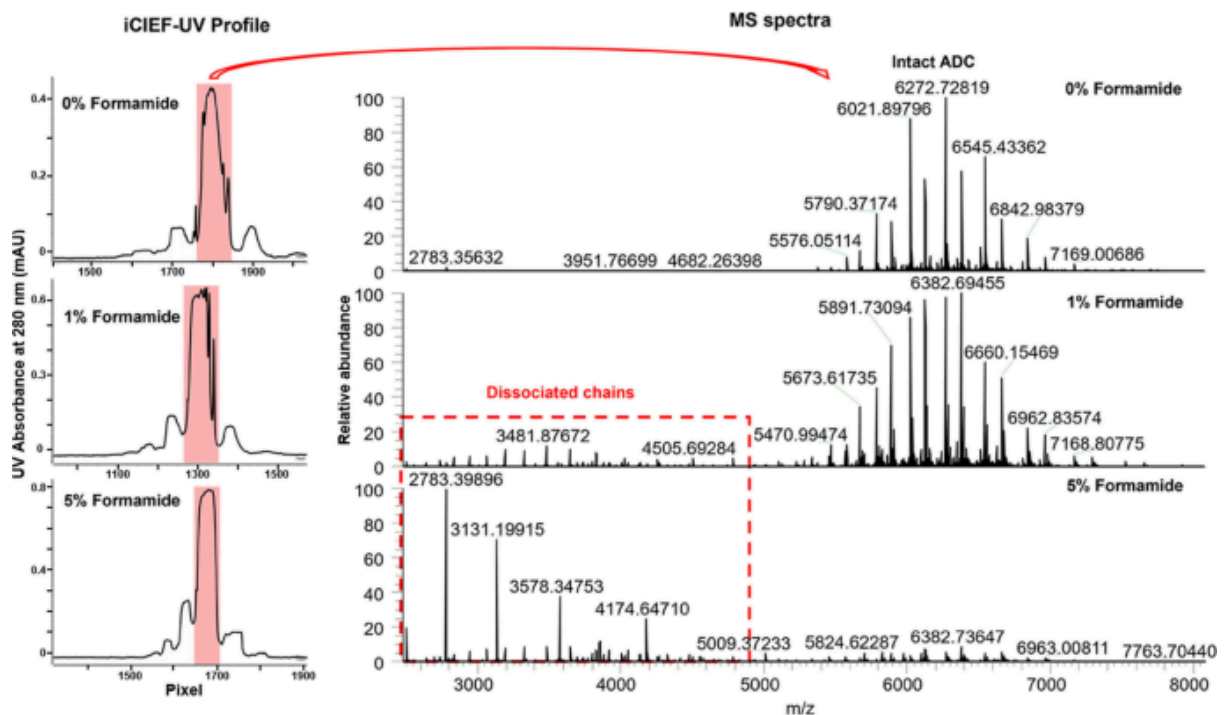


Fig.8: Influenza della percentuale di formammide (v/v) nella soluzione del campione sull'analisi icIEF-MS nativa per polatuzumab vedotin [3].

- **Spettrometria di massa (MS) accoppiata alla cromatografia liquida (LC)**

Numerosi studi hanno evidenziato il ruolo preponderante della spettrometria di massa (MS) nella valutazione dell'eterogeneità/omogeneità strutturale degli ADC. La notevole risoluzione, sensibilità e capacità di trasmissione ionica delle piattaforme MS rendono questa tecnica un'opzione altamente adatta per determinare il Drug Load Distribution (DLD), calcolare il DAR medio e identificare le impurezze correlate al farmaco libero durante l'intero processo di sviluppo dell'ADC. La spettrometria di massa nativa (nMS), con l'uso di soluzioni tampone volatili con forza ionica e pH controllati, è più comunemente utilizzata nella caratterizzazione degli ADC, soprattutto quando la strategia di bioconiugazione viene eseguita sui residui di cisteina coinvolti nei ponti disolfuro intercatena dell'anticorpo monoclonale. Inoltre, poiché lo stato di carica netta complessivo della proteina è ridotto nella nMS, le diverse popolazioni DAR sono separate in modo più efficiente, consentendo una migliore rilevazione e quantificazione relativa delle popolazioni DAR. Attualmente, nella stragrande maggioranza delle analisi di ADC con nMS, la piattaforma MS è interfacciata con diversi tipi di separazioni per un duplice scopo: i) aggiungere una dimensione complementare di caratterizzazione, ii) migliorare la produttività complessiva eseguendo uno scambio di tampone on-line per eliminare i sali non volatili contenuti nella formulazione degli ADC ed evitare così qualsiasi preparazione del campione. La conferma della sequenza degli ADC, la localizzazione delle PTM e l'identificazione dei siti di coniugazione sono state ottenute a livello peptidico con l'uso di approcci bottom-up (BU).

Tuttavia, i miglioramenti nella risoluzione MS, l'implementazione di tecniche di frammentazione complementari e lo sviluppo di software dedicati hanno permesso la frammentazione delle proteine terapeutiche a livello intatto (Top-Down, TD) o di subunità (Middle-Down, MD) (**Fig.9**). L'idea principale di queste strategie innovative è quella di evitare la fase di preparazione del campione, o di ridurla significativamente con un protocollo di digestione limitato, per fornire una correlazione diretta tra le masse della proteina intatta o delle subunità e lo spettro di frammentazione. Tra i vantaggi più rilevanti dei flussi di lavoro TD/MD-MS vi sono la riduzione dei tempi di preparazione del campione, la prevenzione dell'introduzione di artefatti e una migliore capacità di identificare le proteoforme proteiche [3].

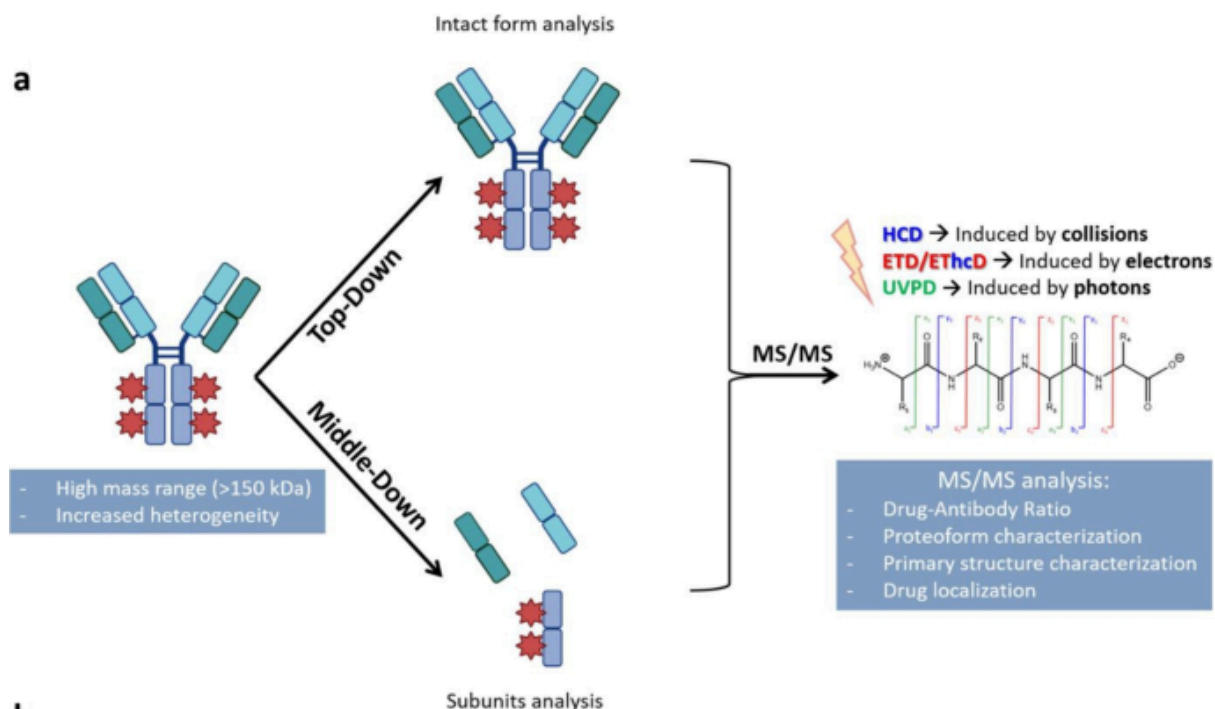


Fig.9: Flussi di lavoro intatti, ossia spettrometria di massa Top-Down e Middle-Down [3].

Yolder e colleghi hanno utilizzato il metodo LC-MS per confrontare due diversi tipi di coniugazione sito-specifica, come potrebbe essere la coniugazione della cisteina, e quella legata alla lisina, che è una coniugazione più eterogenea. La possibilità di utilizzare una coniugazione sito-specifica offre un maggiore controllo sulla composizione, l'analisi e l'attività. Ad esempio, l'anticorpo IgG1 ha più di 40 residui di lisina modificabili. Invece, la modifica della cisteina si ottiene attraverso una coniugazione 1-4 a maleimmidi N-sostituite. L'accoppiamento tra cromatografia liquida e spettrometria di massa (LC-MS) consente una caratterizzazione ancora più approfondita, combinando separazione e identificazione molecolare. Tale approccio è fondamentale per l'analisi di campioni complessi e per il controllo qualità avanzato [4].

La spettrometria di massa viene utilizzata anche per caratterizzare le modifiche post-traduzionali (PTM), che sono analisi di routine nel campo degli ADC per caratterizzare le modifiche per anticorpi monoclonali e proteine più in generale [4].

● Metodi immunochimici (ELISA) e Bioanalitici

I metodi immunochimici, in particolare gli assay ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), sono ampiamente utilizzati nello studio degli ADC per la quantificazione, la caratterizzazione e il monitoraggio farmacocinetico del coniugato in matrici biologiche. I metodi immunochimici consentono di comprendere i processi di distribuzione, metabolismo ed eliminazione del farmaco: ADC intatto; anticorpo totale; frazione libera del payload [4].

È stato utilizzato il test ELISA competitivo per determinare la Monometil Auristatina E libera, rilasciata da cAC10-vc-MMAE, un ADC composto da un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina CD30 (cAC10) legato tramite un linker peptidico valina-citrulina (vc) a un potente agente citotossico antineoplastico, la Monometil Auristatina E (MMAE)), dopo incubazione con catepsina B nel plasma.

Il principio chiave è la competizione tra il principio attivo libero (MMAE) presente nel campione e una quantità nota dello stesso principio attivo legato a un enzima tracciante (MMAE-HRP) per legarsi a un numero limitato di siti sugli anticorpi (anti-MMAE) che rivestono la piastra.

Allo stesso modo, La quantità del farmaco maytansinoide rilasciato da huC242-SPP-DM1 o huC242-SMCC-DM1 è stata quantificata con un ELISA competitivo dopo aver trattato le cellule antigene-positive o le cellule di controllo con i coniugati. In questo caso, dopo la precipitazione delle proteine utilizzando acetone ghiacciato, campioni del surnatante o di una soluzione standard di maytansina sono stati miscelati con mAb murino anti-maytansinoide biotinilato. I maytansinoidi liberi nel campione competono con il legame del reporter a una piastra rivestita con BSA-DM1. Il mAb anti-maytansinoide biotinilato legato è stato quindi rilevato con streptavidina-HRP per determinare la quantità di maytansinoidi liberi nel campione [5].

Le tecniche LC-MS bioanalitiche applicate a matrici biologiche consentono la quantificazione accurata del payload libero degli ADC e dei relativi metaboliti, fornendo informazioni fondamentali sulla sicurezza del trattamento e sull'esposizione sistemica del farmaco.

Questi approcci sono particolarmente importanti perché il rilascio non controllato del payload citotossico può determinare effetti tossici sistemici. Per questo motivo, il monitoraggio del farmaco libero nel plasma rappresenta un aspetto cruciale nello sviluppo e nella valutazione degli ADC [4].

6. Studi di Stabilità e Controllo Qualità

Gli ADC sono sensibili a una serie di condizioni ambientali e di processo. L'incapacità di mantenere condizioni adeguate può portare ad aggregazione, perdita del carico citotossico o altri processi di degradazione. Gli studi di stabilità e controllo qualità mirano a caratterizzare il modo in cui gli ADC resistono a queste problematiche e mantengono l'integrità del prodotto durante la produzione, lo stoccaggio, la somministrazione e tali studi vengono condotti in diverse condizioni ambientali. La stabilità e la qualità degli ADC rappresentano aspetti essenziali per garantire sicurezza ed efficacia lungo tutto il ciclo di vita del farmaco. Le linee guida della FDA e dell'EMA sottolineano la necessità di sviluppare metodi analitici validati per valutare i CQA (Attributi di Qualità Critici) e rilevare potenziali percorsi di degradazione.

Gli studi di stabilità sono finalizzati a valutare:

- Degradazione del linker;
- Rilascio prematuro del payload;
- Aggregazione proteica;
- Modificazioni chimiche dell'anticorpo [3]

Test Category/ Quality Attribute	Impacts	Key Monitoring/Assessment	Tests that can be employed
-------------------------------------	---------	---------------------------	-------------------------------

Physicochemical Parameters

Drug-to-Antibody Ratio (DAR)	Potency and pharmacokinetics	Stability testing monitors any changes in DAR over time, as these may indicate degradation or payload loss.	Hydrophobic interaction chromatography (HIC) or mass spectrometry
Charge variants	Immunogenicity, antigen binding (efficacy), and payload stability*	Changes in the ADC's charge profile due to deamidation, oxidation, or glycosylation are tested.	Ion-exchange chromatography (IEX) and capillary electrophoresis
Purity	Potency and pharmacokinetics	Purity testing complements stability studies by establishing the product's quality at the start. However, stability-indicating tests are needed to identify and monitor specific degradation pathways (e.g., linker cleavage, protein oxidation).	SEC-HPLC, CE-SDS
Free payload	Potency, toxicity, and pharmacokinetics	High free payload levels can signal linker instability or degradation.	LC-MS or HPLC can be used to ensure the linker does not prematurely release the payload.
Aggregates	safety (e.g., immunogenicity risks) and efficacy	Structural Instability: The presence of aggregates signals instability in the ADC's protein structure, potentially indicating degradation pathways like oxidation, deamidation, or fragmentation. Conjugation Integrity: Aggregation may be linked to issues in linker or payload attachment, affecting the overall stability of the ADC.	Size-exclusion chromatography (SEC) or dynamic light scattering (DLS)
Unconjugated antibody	Potency, pharmacokinetics, and process consistency	Linker Instability: Over time, the linker-payload may degrade or detach from the antibody, leading to an increase in unconjugated antibodies during storage. This signals possible instability of the ADC under specific storage conditions.	Size-Exclusion Chromatography (SEC), Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)

Biological Parameters

Antigen/target binding activity	Potency and efficacy	Changes in binding activity over time can indicate degradation pathways affecting the antibody, such as glycosylation shifts or conformational changes. The conjugation process itself may alter the antibody's binding regions, making it important to monitor this attribute throughout stability studies.	Tested using ELISA, flow cytometry, or surface plasmon resonance (SPR).
Cytotoxicity	Potency and efficacy	Declining cytotoxicity may suggest instability of the linker or degradation of the cytotoxic payload, impacting its ability to release the drug at the target site. Cytotoxicity testing ensures that the ADC retains its functional capability to induce cell death in target cells, confirming the therapeutic potency. Cytotoxicity tests can reveal premature drug release caused by linker instability, which may lead to off-target effects or reduced efficacy.	Cell based cytotoxicity bioassay

General Tests

Appearance and color	Safety and efficacy	Changes in color, clarity, or presence of visible particles often serve as the first signs of product instability. Instability in the linker, payload, or antibody may result in visual changes such as precipitation, formation of aggregates or particles, and/or changes in solution color.	Visual Inspection
pH	Safety and efficacy	FDA and EMA emphasize pH testing in stability studies to ensure product quality, consistency, and safety over the ADC's shelf life. pH testing supports determination of optimal storage conditions, establishment of the drug's shelf life, and label claims.	Potentiometry
Particulate matter	Safety and efficacy	Subvisible particulate: Dynamic Light Scattering (DLS) and Analytical Ultracentrifugation (AUC) Visible Particulate: Manual visual inspection under controlled lighting conditions.	DLS

Linker Stability Testing

Free linker quantity**	Safety, efficacy, and pharmacokinetics	Linkers can degrade under stress conditions like pH changes, elevated temperatures, or exposure to light. Stability testing ensures the linker retains its structural integrity under various conditions. Linker instability can lead to unconjugated antibodies or free payload, affecting the overall composition and consistency of the ADC product. Unintended release can harm healthy tissues and organs.	HPLC, mass spectrometry
-------------------------------	--	---	-------------------------

*Charge modifications can make the ADC more susceptible to enzymatic or chemical degradation, reducing stability.

**Free linker quantity is not usually a direct result of these tests because the focus is on ensuring the linker's functionality and its role in maintaining the overall ADC structure. However, indirect evidence of linker instability is derived from the levels of free payload and unconjugated antibodies.

7. Validazione dei Metodi e Aspetti Regolatori

La validazione dei metodi analitici è un requisito essenziale per l'approvazione degli ADC da parte delle autorità regolatorie. Le linee guida internazionali richiedono la valutazione di parametri quali: L'Accuratezza; la Precisione; la Specificità; la Sensibilità; la Robustezza.

Essendo una combinazione di molecole grandi e piccole, gli ADC pongono alcune sfide alla supervisione CMC (Chemistry, Manufacturing and Controls) a causa delle loro complesse caratteristiche strutturali e del processo di produzione. Attualmente non esistono linee guida specifiche per la parte CMC dei prodotti ADC. Negli Stati Uniti, le aziende farmaceutiche presentano le domande di autorizzazione all'immissione in commercio degli ADC tramite la Biologics License Application (BLA), ma gli ADC sono regolamentati dal Center for Drug Evaluation and Research (CDER). La revisione CMC dei prodotti ADC coinvolge due dipartimenti: l'Office of Biotechnology Products (OBP) responsabile della revisione del componente anticorpale degli ADC e l'Office of New Drug Quality Assessment (ONDQA) che si occupa della revisione del payload e dell'intermedio payload-linker. Il Drug Substance e il Drug Product dell'ADC vengono esaminati congiuntamente da entrambi gli uffici sotto la guida di un revisore.

Il modulo 3 (Modulo di Qualità) del documento tecnico comune (CTD) deve essere completo e riflettere i processi di produzione e il controllo di qualità generale per ogni componente dell'ADC, inclusi l'anticorpo, l'intermedio payload-linker, la sostanza farmacologica e il prodotto farmaceutico. È essenziale concentrare il controllo di processo sulle aree critiche di qualità e ridurre al minimo studi o analisi di comparabilità non necessari, sfruttando una comprensione scientifica del processo produttivo e un approccio basato sul rischio durante l'intero ciclo di vita dello sviluppo del prodotto.

Attualmente non esiste un formato di dichiarazione CMC armonizzato a livello globale per i prodotti ADC. Questa difficoltà impedisce agli sponsor di creare documenti validi in tutto il mondo [3].

CONCLUSIONI

La presente tesi ha evidenziato come la classe degli Antibody-Drug Conjugates (ADC) rappresenti una delle strategie più avanzate nell'ambito della terapia oncologica di precisione. L'integrazione tra la specificità degli anticorpi monoclonali e la potenza citotossica dei payload consente di

superare parzialmente i limiti della chemioterapia convenzionale, introducendo un approccio terapeutico basato sulla veicolazione selettiva del farmaco verso le cellule tumorali.

Tuttavia, l'efficacia di tali farmaci risulta fortemente condizionata da variabili biologiche complesse, tra cui l'eterogeneità dell'espressione antigenica, la capacità di internalizzazione del complesso anticorpo-antigene e le caratteristiche del microambiente tumorale. In particolare nei tumori solidi, la limitata penetrazione del coniugato e l'elevata pressione interstiziale rappresentano ostacoli rilevanti, che possono ridurre l'effettiva concentrazione del payload nelle cellule bersaglio. Un ulteriore elemento critico è rappresentato dallo sviluppo di meccanismi di resistenza, che possono compromettere la durata della risposta terapeutica. La riduzione dell'espressione del target, le alterazioni dei processi intracellulari e l'attivazione di sistemi di efflusso del farmaco contribuiscono a limitare l'efficacia a lungo termine degli ADC, evidenziando la necessità di strategie terapeutiche combinate e di una più approfondita comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti.

Dal punto di vista farmacologico, la complessità strutturale degli ADC costituisce al contempo un vantaggio e una criticità. La presenza di una distribuzione eterogenea del Drug-to-Antibody Ratio (DAR), la variabilità nei siti di coniugazione e la stabilità del linker influenzano significativamente il profilo farmacocinetico e di sicurezza del farmaco. In particolare il rilascio prematuro del payload può determinare tossicità sistemiche, riducendo il margine terapeutico atteso.

In questo contesto emerge il ruolo fondamentale della caratterizzazione analitica approfondita nella seconda parte dell'elaborato. La natura complessa degli ADC richiede un approccio multidimensionale basato sull'integrazione di tecniche cromatografiche, spettrometriche e bioanalitiche.

La caratterizzazione degli ADC presenta sfide uniche relative all'eterogeneità (la variabilità nel grado di coniugazione può comportare differenze di efficacia e sicurezza); alla stabilità gli ADC possono essere sensibili alle condizioni ambientali, il che ne compromette la stabilità e la funzionalità; ostacoli normativi: Garantire la conformità ai requisiti normativi in continua evoluzione può essere complesso.

Tra le tecniche cromatografiche, la cromatografia a fase inversa è una tecnica di separazione robusta grazie alla sua semplicità e versatilità. Viene utilizzata routinariamente nella determinazione strutturale e nei test di stabilità sia per gli ADC che per le componenti farmaco/linker. Recentemente, i metodi analitici basati sulla fase inversa hanno permesso una determinazione accurata del DAR

La HIC (Cromatografia a Interazione Idrofobica) è un'altra tecnica cromatografica che ha suscitato un forte interesse per l'analisi degli ADC. Le nuove strategie di sviluppo dei metodi e la disponibilità di nuove colonne HIC, con una varietà di proprietà chimiche e dimensioni delle particelle, ne ampliano ulteriormente l'utilità. La HIC è stata il metodo di elezione per determinare la distribuzione del carico di farmaco negli ADC sito-specifici. In aggiunta alla cromatografia liquida, le tecniche di separazione per elettroforesi capillare di nuova generazione, come la CE-SDS e la iCIEF, possiedono un grande potenziale come metodi ortogonali; grazie alle loro separazioni ad risoluzione relativamente alta, sono in grado di fornire dati sulla caratterizzazione dimensionale e di carica degli ADC.

Dal punto di vista industriale e regolatorio, gli ADC pongono ulteriori sfide, legate alla complessità dei processi produttivi e alla necessità di garantire elevati standard di qualità e riproducibilità. I costi di sviluppo e produzione rappresentano inoltre un limite alla diffusione su larga scala di queste terapie, sollevando questioni di sostenibilità per i sistemi sanitari. Nonostante tali criticità, le prospettive future degli ADC risultano estremamente promettenti. Lo sviluppo di tecnologie di coniugazione sito-specifica, l'impiego di linker più stabili e l'introduzione di payload innovativi potrebbero migliorare significativamente il profilo terapeutico di questi farmaci. Parallelamente, l'integrazione con altre strategie, quali immunoterapia e terapie target, rappresenta un approccio potenzialmente sinergico per superare i limiti attuali.

In conclusione, gli ADC si configurano come una piattaforma terapeutica in continua evoluzione, il cui successo dipenderà dalla capacità di integrare conoscenze farmacologiche, analitiche e cliniche in un approccio realmente multidisciplinare. In tale contesto, il ruolo del farmacista assume una rilevanza centrale, non solo nella gestione operativa del farmaco, ma anche nella valutazione critica della qualità, della sicurezza e dell'efficacia di queste terapie innovative.

BIBLIOGRAFIA

- [1] : Chen, B., Zheng, X., Wu, J. *et al.* “Antibody–drug conjugates in cancer therapy: current landscape, challenges, and future directions”. *Mol Cancer* **24**, 279 (2025). (<https://doi.org/10.1186/s12943-025-02489-2>)
- [2] : William RF Goundry , Jeremy S. Parker; “Payload per coniugati anticorpo-farmaco”. *Org. Process Res. Dev.* 19 agosto 2022; 26 (8): 2121–2123. (<https://doi.org/10.1021/acs.oprd.2c00227>)
- [3] : Beck, A., D’Atri, V., Verhoev, O. *et al.* “New Frontiers in ADC Analysis: Advances in Chromatography, Electrophoresis, and Mass Spectrometry”. *AAPS J* **28**, 34 (2026). (<https://doi.org/10.1208/s12248-025-01169-9>)
- [4] : Erika Maria Ricci, Enrico Dainese, Vincenzo De Laurenzi, Giulio Lovato, Gianluca Sala, Marcello Locatelli, Miryam Perrucci, “New analytical challenges in characterization of antibody-drug conjugates, *Journal of Chromatography Open*” Volume 8, 2025, 100260, ISSN 2772-3917.
(<https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2025.100260>)
- [5] : Wakankar, A., Chen, Y., Gokarn, Y., & Jacobson, F. S. (2011). “Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates”. *mAbs*, 3(2), 161–172.
(<https://doi.org/10.4161/mabs.3.2.14960>)