

TRIANGOLAZIONE PERFETTA DALLA RICERCA ALLA TERAPIA

La biologa molecolare Renata Grifantini racconta come da un'alleanza tra laboratorio, biotech e industria farmaceutica si è arrivati alla sperimentazione di una nuova terapia per il trattamento dei tumori. E come le "non scelte" possano aiutare a trovare la propria strada

Elena Cattaneo

Dal 2015 il nostro laboratorio dell'Università degli Studi di Milano è ospitato nell'Istituto Nazionale di Genetica Molecolare "Romeo ed Enrica Invernizzi" (INGM) grazie a una convenzione che mira a condividere personale e progettualità. Un'occasione, che non ci siamo lasciati sfuggire, di lavorare accanto ai primi studiosi in Italia ad utilizzare le tecnologie genomiche per identificare mediante sequenziamento tutte le molecole di RNA esistenti in una singola cellula in un preciso momento. Oggi racconto una storia affascinante che ha preso forma proprio lì, accanto ai nostri laboratori, e che rappresenta l'esito di una triangolazione perfetta tra ricerca di base, ricerca traslazionale e industria farmaceutica: preziosa testimonianza della filiera della ricerca biomedica, dalla scintilla di "base" alla proiezione "clinica". Una storia di successo – per quanto di mia conoscenza – davvero unica in Italia.

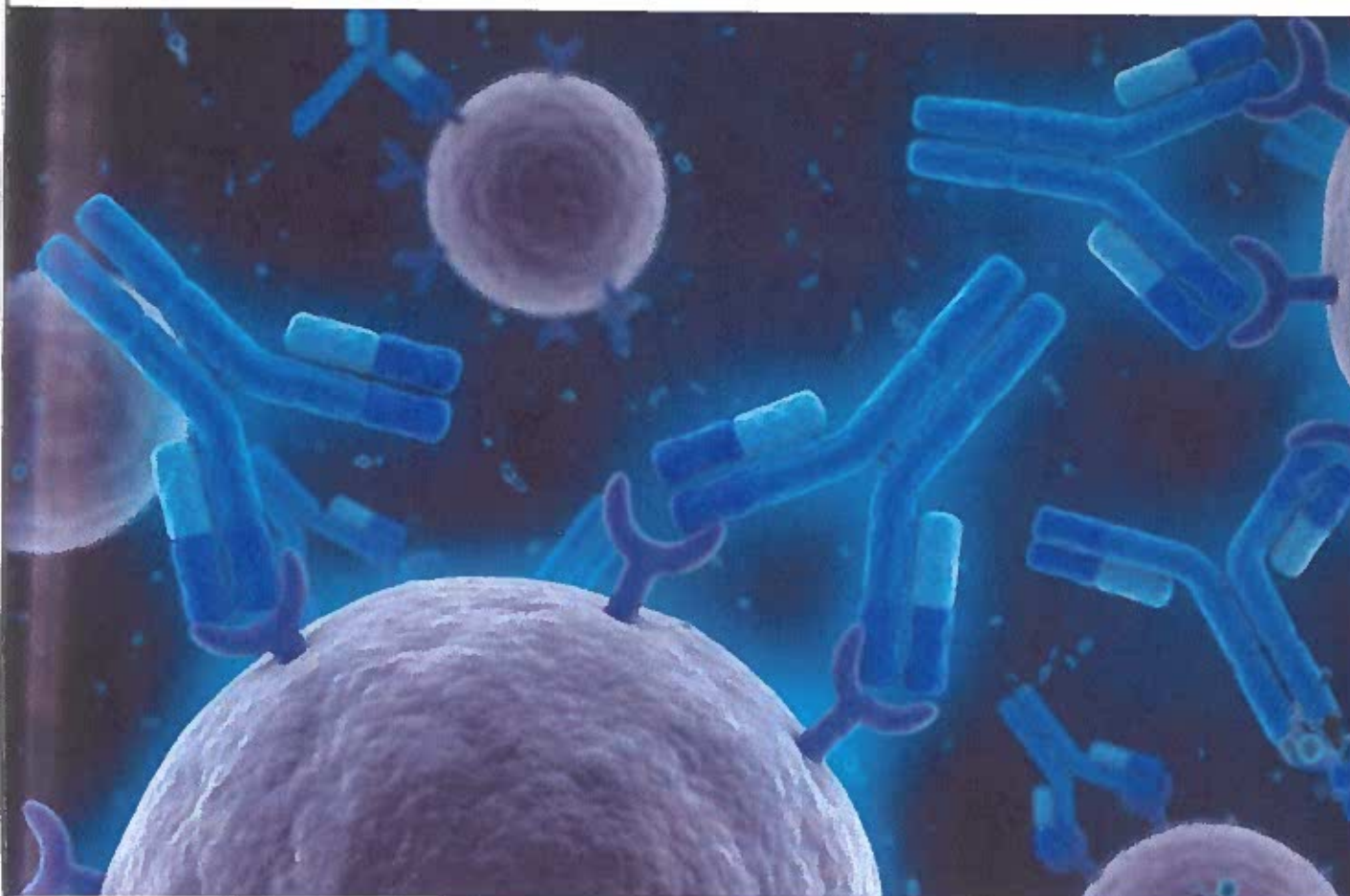
Fra i protagonisti c'è Renata Grifantini, biologa molecolare dell'INGM e direttrice scientifica e generale della start up CheckmAb. "È successa una cosa straordinaria!" La nostra conversazione inizia con questo entusiasmo per una notizia ricevuta solo qualche giorno prima: l'anticorpo monoclonale per immunoterapia oncologica messo a punto da CheckmAb, qui in INGM, dopo sette anni di ricerca incessante, stava infatti per intraprendere la sperimentazione clinica nell'uomo, condotta dall'azienda

farmaceutica Boehringer Ingelheim. Quell'anticorpo è nato da un'intuizione scientifica di Sergio Abrignani, professore di Patologia all'Università Statale di Milano e direttore dello stesso INGM e Massimiliano Pagani, professore di Biologia Molecolare all'Università Statale di Milano, fondatori di CheckmAb, costituita grazie al finanziamento del fondo Health di Primo Capital.

"Amo la ricerca che faccio perché è finalizzata ad avere sempre risvolti pratici", spiega. Ma la storia di Grifantini, il cui "fuoco per la ricerca" – confessa – è molto più vivo oggi che 30 anni fa, parte da lontano. E senza quelle che lei oggi definisce "non scelte" avrebbe potuto essere molto diversa.

LE "NON SCELTE" UTILI A ORIENTARSI

A 18 anni Renata Grifantini aveva le idee chiare solo sulle scelte che non avrebbe voluto fare: non voleva seguire le orme professionali del padre, avvocato con uno studio ben avviato, non voleva vivere nella sua città natale, Camerino, e in generale in un piccolo centro, non voleva accontentarsi della conoscenza acquisita sui libri al liceo classico, dove si era diplomata con il massimo dei voti. "Ero contenta dei risultati scolastici ma stordita: sapevo tutto tranne quello che volevo fare nella vita. Sentivo che quello che avevo appreso, in quel momento almeno, non mi era utile per capire cosa volessi fare. Mi sentivo completamente spaesata", mi racconta.



Anticorpi che colpiscono le cellule bersaglio.

La scienza, quindi, è arrivata per esclusione. “Mi sono iscritta in Biologia, a Camerino. Con fisica, chimica e matematica all’inizio ho faticato ma con il tempo, e grazie al mio professore di biologia molecolare, ho capito che la pura teoria non mi interessava e che ero fatta per le cose che si possono mettere in pratica”. Durante il periodo universitario Grifantini ha fatto un’esperienza di studio all’istituto Max Planck di Berlino, presso il laboratorio del Prof. Claudio Gualerzi. Dopo la laurea è arrivato il dottorato in Biologia molecolare e cellulare all’Università di Bologna.

La prima esperienza lavorativa è stata in ENI-Ricerche, presso la sede di Monterotondo: “Non avevo ancora programmi a lungo termine – ricorda – volevo un lavoro e volevo applicare le mie nuove conoscenze scientifiche”. Si occupa di microbiologia ambientale e studia i batteri che decontaminano l’ambiente (“si era agli albori di quel tipo di ricerche”) ma non se ne appassiona: voleva tornare alla biologia molecolare. I colleghi le dissero che quegli studi si facevano nella sede di Milano e le consigliarono di parlare con Guido Grandi, allora direttore della Ricerca Biotecnologica di ENI-Ricerche: “Un giorno incrociai in corridoio un uomo che rispondeva alla descrizione che mi era stata fatta, lo bloccai, gli consegnai il mio curriculum e dissi che volevo lavorare con lui. Mi guardò interdetto, ma dopo pochi giorni mi chiamò e mi

propose di trasferirmi nella sede di Milano”.

Per sei anni Grifantini lavora al fianco di Grandi (“apprezzava la precisione con cui rappresentavo le mie sequenze sulle lastre”) e le sue conoscenze crescono: “Facevamo quella parte di ricerca che è il presupposto per il futuro sviluppo industriale, ad esempio ottimizzando gli enzimi che poi si utilizzano nella catena di produzione degli antibiotici o modificando gli inibitori delle citochine che potevano servire per futuri farmaci, con approcci di ingegneria genetica e proteomica strutturale”.

Nel 1996 Grandi lascia ENI per la Chiron Vaccines di Siena, una nuova biotech che si occupava di vaccini, di cui Rino Rappuoli è stato direttore scientifico, e propone a Grifantini di seguirlo. “Ho iniziato un percorso nell’ambito dei vaccini che mi è piaciuto tantissimo e ho imparato le basi dell’immunologia – racconta Grifantini – Chiron era in crescita e potevamo fare molta ricerca fondamentale, soprattutto per identificare e validare nuovi antigeni, come presupposti per nuove scoperte nel mondo dei vaccini. Abbiamo anche partecipato allo sviluppo del vaccino per il meningococco B”.

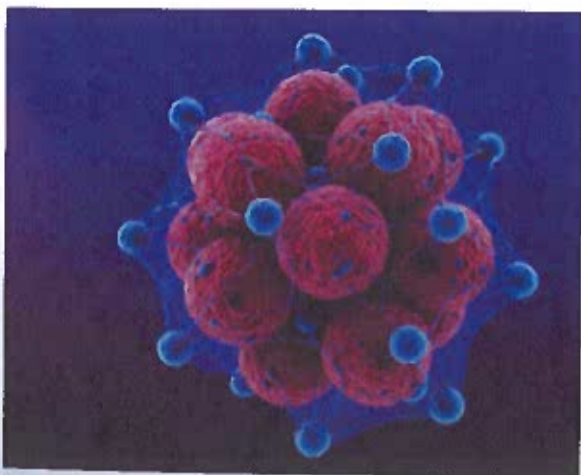
Nel 2004 la società viene acquisita da Novartis: “C’era un’enorme disponibilità economica – spiega Grifantini che nel frattempo era diventata project leader – non mi sono mai preoccupata di applicare a un *grant* per avere fondi, ma iniziavo a sentire che quello non era più il

mio posto. Le decisioni si prendevano su presupposti che non erano solo scientifici: si valutava la possibile commercializzazione dei prodotti, la competizione con altre aziende e se ci mancavano competenze si cercavano all'esterno. I progetti si chiudevano non per mancanza di risultati ma perché i competitor o le previsioni di mercato li avevano interrotti. Io, invece, avevo capito che volevo essere più protagonista nel processo decisionale e non dipendere solo da logiche di mercato. Inoltre, tutti noi eravamo sempre più specializzati in una singola attività e ci veniva chiesto di applicarla in modo trasversale per tutte le progettualità. Quel tipo di super specializzazione non mi interessava”.

L'occasione per “uscire” da questo meccanismo arriva nel 2008 quando le fu proposto di assumere il ruolo di direttore delle ricerche presso la Externautics SpA, società di biotecnologia finalizzata allo sviluppo di nuovi marcatori tumorali e bersagli terapeutici, nonché alla generazione e allo sviluppo preclinico di anticorpi monoclonali terapeutici. “L'azienda andava benissimo ed eravamo vicini a ottenere dei risultati ma con la crisi del Monte dei Paschi di Siena, che era il principale investitore, non fu possibile continuare”.

Era il 2016. In quello stesso anno Sergio Abrignani e Massimiliano Pagnani pubblicavano un importante paper sulla rivista scientifica *Immunology* dal titolo “*Transcriptional Landscape of Human Tissue Lymphocytes Unveils Uniqueness of Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells*”. Nella pubblicazione descrivevano per la prima volta l'azione dei linfociti T regolatori (Treg) nel tumore, ovvero cellule che per loro natura sopprimono la risposta immunitaria, ma che nel tumore assumono delle caratteristiche molecolari specifiche.

Linfociti che aggrediscono il tumore.



DALL'INTUIZIONE, AL RISULTATO, FINO ALL'IDEA DI START UP

“Le Treg presenti nel tumore – spiega Grifantini – hanno caratteristiche molto diverse dalle stesse cellule presenti in un tessuto sano, anche molto vicino, o nel sangue. Nel tumore infatti agiscono da freno bloccando la risposta immunitaria antitumorale. Succede cioè che impediscono alle cellule del sistema immunitario di riconoscere il tumore come elemento “non-self”, cioè estraneo o pericoloso, e quindi di ucciderlo”.

La scoperta di Abrignani e Pagnani forniva le prove della *signature* (anche detta “firma genetica”) di quelle Treg infiltranti il tumore: un insieme di geni la cui espressione (in RNA e proteine) era cambiata come conseguenza della loro localizzazione nel tessuto malato. Nel paper si comparava questa *signature*, che corrispondeva a un gruppo di 300 geni, con quella di altri gruppi di cellule del sistema immunitario.

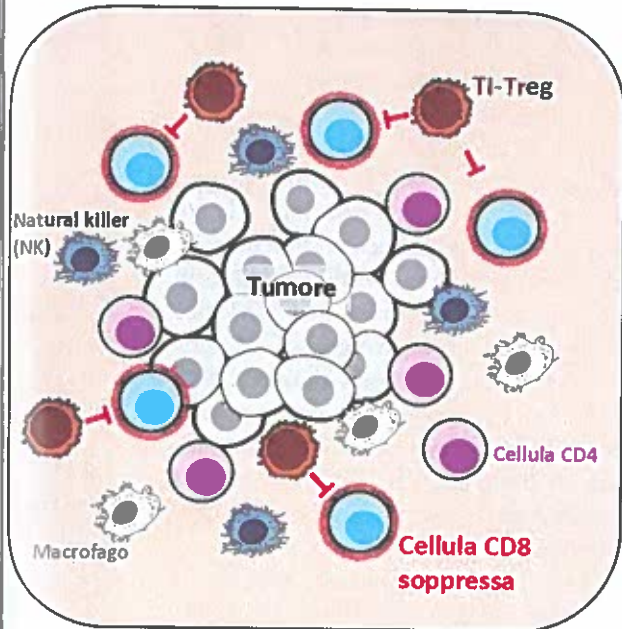
Quella pubblicazione e l'intuizione di Abrignani di trasformare la ricerca in impresa hanno contribuito a segnare una nuova inaspettata svolta nella vita di Grifantini che aveva ormai acquisito competenze che spaziavano dalla biologia molecolare alla gestione di progetti industriali complessi. Quella serie iniziale di *non scelte*, intrecciate alle scelte compiute lungo il percorso, l'aveva portata esattamente dove desiderava essere, dotandola di un curriculum e di un expertise oggi rari non solo in Italia ma nel panorama internazionale.

“Abrignani credeva fermamente nel valore della scoperta sulle Treg – racconta – e voleva valorizzarla. Mi chiese se fossi interessata ad aprire un filone di ricerca traslazionale in INGM che avesse quell'obiettivo e contemporaneamente essere direttore scientifico e generale di una start up e farla decollare”. Una sfida che Grifantini ha accettato con entusiasmo: “La prima cosa che ho pensato accettando è stata che se avessimo trovato il giusto target terapeutico avremmo potuto favorire lo sviluppo di una terapia con un potenziale di impiego enorme perché, diversamente da altre caratteristiche dei tumori, quali l'eterogeneità e le mutazioni che cambiano ed evolvono, le cellule Treg infiltranti il tumore sono molto simili in tutti i tumori, specie se solidi (polmone, colon...). L'obiettivo era trovare il modo di riattivarle affinché facessero fuori la malattia”. Ma come raggiungerlo? Da un lato continuando a fare ricerca in laboratorio, dall'altro andando alla ricerca di un partner industriale.

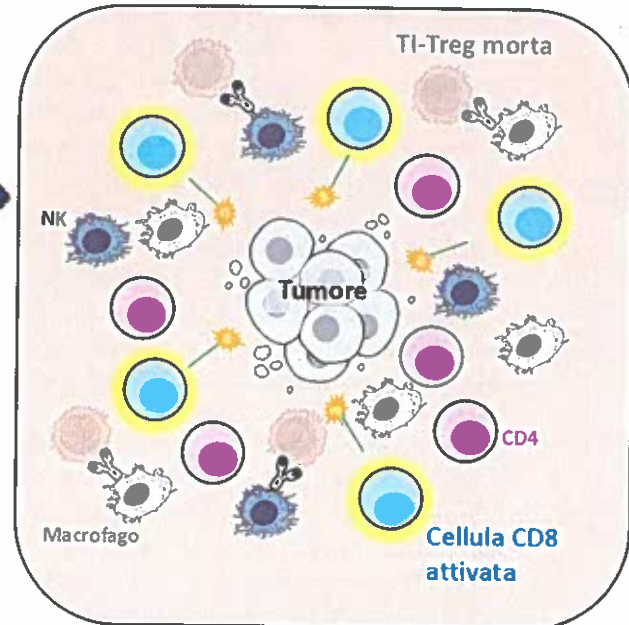
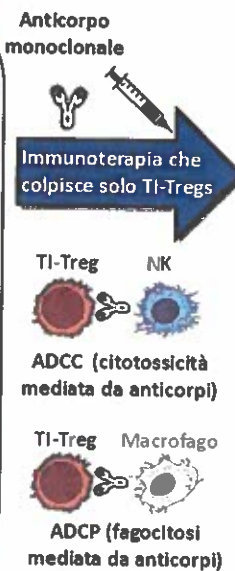
LA RICERCA: DA 300 GENI A UNO, “PER CASO”

Il nuovo obiettivo era scavare in quella “signature

I linfociti T regolatori intratumorali (TI-Tregs) sopprimono la risposta immunitaria nel microambiente tumorale e favoriscono la crescita del tumore



Anticorpi monoclonali che colpiscono specificamente cellule TI-Tregs consentono una riattivazione dei linfociti T intratumorali che uccidono le cellule tumorali



Schema grafico della strategia terapeutica scelta di CheckmAb. A sinistra, i linfociti T regolatori presenti nel tumore (TI-Treg) sopprimono la risposta immunitaria consentendo al tumore di crescere. A destra, gli anticorpi monoclonali contro la proteina bersaglio eliminano i linfociti TI-Treg, consentendo la riattivazione della risposta immunitaria (cellula CD8) presente nel tessuto malato e l'eliminazione delle cellule tumorali. Le immagini sono state generate da Luca Sorrentino, collaboratore della dott.ssa Grifantini.

genica patologica” composta dai 300 geni descritti nel lavoro su *Immunology*, per trovare il gene (uno) da cui deriva una proteina presente in modo molto più abbondante solo nelle Treg del tumore, per poi produrre un anticorpo monoclonale che la colpisce e grazie a ciò elimina quelle Treg. Serviva una quasi assoluta selettività, cioè passare da 300 a uno: “La nostra ricerca in INGM – racconta Grifantini – si è focalizzata nella ricerca di una proteina da “colpire” come specifico target terapeutico. L’anticorpo monoclonale che volevamo generare – spiega – doveva avere delle affinità molto alte con la proteina bersaglio sulla cellula tumorale. Se riconosce altro, si perde l’effetto terapeutico e produce effetti collaterali”. Le chiedo quindi come hanno trovato la chiave per ridurre il numero di geni potenzialmente utilizzabili per lo sviluppo della terapia. La risposta è forse la più elettrizzante per chi fa ricerca: “Per caso”.

Un anticorpo monoclonale terapeutico, mi spiega Grifantini, per funzionare deve riconoscere una proteina di superficie, cioè la molecola “da colpire” deve essere esposta. Perciò il primo passo è stato selezionare, tra quelli descritti dalla *signature*, solo i geni che codificano per

quel tipo di proteine di superficie. Questo ha permesso di scendere da 300 a 80 geni, da quelli ne hanno poi selezionati 20 basandosi sulla letteratura disponibile. Ancora troppi. “La selettività è fondamentale – sottolinea Grifantini –, si intende che meno del 10% delle altre cellule deve esprimere lo stesso gene/proteina di superficie di interesse. Quando lo trovi hai fatto centro perché procedi a imbuto fino a trovare quella ideale”. Molto più facile a dirsi che a farsi: “Non c’erano tutti gli anticorpi disponibili oggi in commercio e diverse proteine non erano ancora state oggetto di pubblicazioni. Ma soprattutto, dopo circa un anno, abbiamo capito che sbagliavamo protocollo”. In laboratorio ricevevano campioni tumorali dai reparti di chirurgia dell’Istituto Europeo di Oncologia o di altri istituti e utilizzavano una soluzione enzimatica per dissociarli, cioè per separare le singole cellule tumorali dal tessuto. “Le cellule isolate – spiega Grifantini – venivano studiate in vitro per verificare se esprimevano la nostra proteina bersaglio, cioè una delle venti proteine individuate, contro cui volevamo sviluppare anticorpi monoclonali. Ricordo la disperazione – commenta – perché non trovavamo

niente di utile. Poi un giorno, a ridosso di Natale 2018, una delle nostre ricercatrici, Susanna Campagnoli, piombò nel mio ufficio e mi disse: “Non puoi capire cosa è successo”. La sera precedente era in laboratorio quando arriva un campione tumorale di un paziente operato al pomeriggio. Stava già per andare via, quindi espone il campione alla soluzione enzimatica classica usata per “digerire” il tessuto per il periodo indicato, ma non conclude la procedura, e le cellule tumorali restano “a riprendersi”, dopo il trattamento enzimatico, in coltura. La mattina dopo, torna in laboratorio per completare il lavoro e... scopre il bersaglio!”, esclama Grifantini, con gli occhi che le si illuminano. “Eravamo tutti increduli: lasciando le cellule in coltura dopo che l’enzima era stato eliminato, queste avevano avuto la possibilità di riesporre la proteina di superficie di interesse che ricomparivano solo nelle cellule Treg del tumore. La nostra idea era buona, la selezione era giusta ma c’era un elemento che noi non potevamo governare perché dipendeva dal protocollo utilizzato: l’incubazione con quell’enzima distruggeva anche le nostre molecole di interesse!”. Da lì, grazie alle competenze e alla dedizione di tutto il team dei ricercatori, è stato possibile generare anticorpi monoclonali contro quella molecola bersaglio, idonei a colpire una regione specifica della proteina identificata.

SE LO SCRIVI, DEVE POTER ESSERE VERIFICABILE

Fin dalla sua nascita nel 2018, Checkmab ha avviato un dialogo con le più grandi aziende farmaceutiche alla ricerca di qualcuno che credesse nel loro progetto. “Abbiamo fatto un vero tour – ricorda Grifantini – c’era il Covid, perciò si trattava per lo più di teleconferenze: avevamo un’ora a disposizione, a volte anche 55 minuti (i restanti 5 servivano alle aziende per collegarsi alla call successiva) per presentare diapositive molto sintetiche. Anticipavamo i nostri *pre-reads* per ottimizzare i tempi. Quando c’era interesse veniva firmato un *confidentiality agreement* e si passava a una fase di discussione più approfondita”. Fra le aziende interessate, la Boehringer era quella più in linea con i loro obiettivi: “volevamo valorizzare il nostro progetto, non volevamo che fosse uno fra i tanti, e l’azienda tedesca non aveva altri monoclonali per oncologia sul mercato”.

Il primo incontro in presenza con loro è stato nel 2022, a seguito di un anno e mezzo di discussione: “La *due diligence* sui risultati e su tutto il nostro lavoro è stata spietata. Con Abrignani, Pagani, i ricercatori di CheckmAb e in generale in tutto INGM l’impostazione era quella di non mettersi mai nella posizione di essere messi in discussione. Niente era lasciato al

caso: ogni esperimento doveva essere “disegnato”, ogni possibile risultato doveva poter essere immaginato. La più grande soddisfazione è stato vedere che l’interesse di un’azienda del calibro della Boehringer non era legato solo ai possibili aspetti economici, ma anche al rigore, all’affidabilità e alla profondità delle prove scientifiche che mettevamo a disposizione”.

Oggi Checkmab ha un accordo di licenza in esclusiva con Boehringer per lo sviluppo di un anticorpo monoclonale per immunoterapia oncologica la cui sperimentazione sull’uomo partirà nei prossimi mesi: “È uno dei primi con la caratteristica di eliminare i linfociti Treg solo nel tumore e il primo contro quello specifico bersaglio molecolare – sottolinea con orgoglio Grifantini. È una conquista significativa anche per l’Università degli Studi di Milano che, insieme a INGM, è stata partner di questo risultato raggiunto in tempi così contenuti.

Oltre al dato scientifico già di per sé straordinario, a risultare vincente è stata l’accountability: “Quando sottometti una richiesta alle agenzie regolatorie del farmaco, come FDA o EMA, devi sintetizzare tutti gli studi nella *investigation brochure*, un centinaio di pagine zeppe di grafici, ma devi dare la possibilità agli enti di verificare ogni singolo dato e simbolo. Dietro al nostro report ci sono altrettanti file per ogni tipo di saggio e per ogni singolo paziente o campione analizzato. La tracciabilità arriva fino all’archiviazione del dato grezzo perché qualsiasi cosa scrivi o sostieni – conclude Grifantini – deve poter essere sempre verificabile”. Un principio, quest’ultimo, che è il fulcro del metodo scientifico e garanzia della sua affidabilità, da scolpire nella pietra perché è il discriminare, nelle scienze sperimentali, tra quel che è un fatto e quel che è mera opinione. ■

ELENA CATTANEO

«Da circa trent’anni dedico la mia vita alla ricerca su una malattia ereditaria neurodegenerativa, la Còrea di Huntington: molti progetti, molti giovani coinvolti, molti risultati – raggiunti anche dopo vari fallimenti – di cui sentiamo, come ogni studioso sente, tutto l’orgoglio e la responsabilità. Nel 2013 sono stata nominata dal Presidente della Repubblica Senatrice a vita per meriti scientifici. Su queste pagine proverò a portare un po’ di luce nei tanti “coni d’ombra” in cui si trova confinato lo straordinario mondo della ricerca italiana». Nel 2024 Elena Cattaneo ha pubblicato *ScienzeLate*, Cortina Editore.