

The science of **CAR T-CELLS**

WWW.PHARMASTAR.IT

PDF INTERATTIVO



**204 PAGINE
26 CAPITOLI
9 INTERVISTE
9 VIDEO**



Presentazione

Introduzione

**CAR T-cells:
che cosa
sono e come
funzionano**

**Attuali
applicazioni
delle CAR T-cells
e aspetti clinici**

**CAR T-cells
'industriali'
approvate o
di prossima
approvazione**

**CAR T-cells:
la ricerca italiana**



Presentazione

Se ne parla ormai da un po' di tempo e hanno conquistato già tanti titoli di giornale, generando attese e speranze. Sono le CAR T-cells: una terapia antitumorale innovativa e rivoluzionaria, che in alcuni casi ha già permesso di raggiungere risultati straordinari in pazienti affetti da alcuni tipi di tumori ematologici.

Non per niente, l'anno scorso, l'American Society of Clinical Oncology le ha nominate 'progresso clinico dell'anno' in oncologia.

La terapia con CAR T-cells (o, più semplicemente, CAR T), protagonista di questo quaderno di PharmaStar, rappresenta in effetti una rivoluzione, perché introduce un cambio di paradigma: non si tratta, infatti, di un nuovo farmaco di sintesi, ma di cellule modificate geneticamente e preparate a partire dai linfociti T del paziente, che sono state definite 'il primo farmaco vivente' e rappresentano un perfetto esempio di medicina personalizzata; inoltre, come vedremo, si utilizzano in pazienti con tumori in stadio avanzato, nei quali ci si è giocati tutte le cartucce disponibili, con l'ambizione di guarirli. Per giunta con un trattamento una tantum: una sola infusione di queste cellule. Nessun farmaco, nemmeno quelli più innovativi, riesce al momento a ottenere questo risultato nelle patologie per le quali le CAR T-cells sono attualmente indicate.

Con le CAR T-cells, due delle quali sono state già approvate dalle agenzie regolatorie, Aifa compresa, inizia, comunque, una nuova era: l'immunoterapia cellulare entra per la prima volta nel campo dell'ematologia, e lo fa con l'obiettivo di guarire una volta per tutte patologie per le quali, finora, non esisteva una cura definitiva.

Certamente, sia le strutture autorizzate a somministrarle sia il Sistema sanitario nazionale dovranno imparare molto e attrezzarsi adeguatamente per gestire al meglio, in tutti i suoi aspetti, questa terapia innovativa e le molteplici sfide che essa implica.

Nel nostro Quaderno troverete inizialmente riassunte le principali domande alle quali cerchiamo di dare risposta con questa iniziati-

va editoriale e un capitolo di ripasso sul sistema immunitario, in quanto le CAR T-cells agiscono proprio a questo livello, rappresentando, a tutti gli effetti, una forma di immunoterapia. Vi raccontiamo, inoltre, la storia alla base di questa rivoluzione, come vengono prodotte le CAR T-cells e quali sono le attuali applicazioni cliniche e le prospettive di ricerca. Senza dimenticare la gestione degli eventi avversi, che in alcuni casi possono essere particolarmente gravi.

Troverete poi una sezione dedicata alle cinque CAR T-cells 'industriali' già approvate o in fase più avanzata di sviluppo, delle quali vengono descritti i principali studi clinici condotti finora o in corso, e i risultati ottenuti. Per ciascuna di esse, abbiamo inserito anche un'intervista al direttore medico della relativa azienda, con l'obiettivo di dare voce allo sforzo industriale.

Infine - ma certo non meno importante - troverete una sezione dedicata alla ricerca italiana sulle CAR T-cells, che è tra le più avanzate al mondo. Abbiamo incontrato i responsabili dei centri che stanno lavorando allo sviluppo di nuove CAR T-cells per farci raccontare i loro studi e le grandi sfide che vanno affrontate. La via italiana alle CAR T-cells è, certamente, un obiettivo ambizioso, che merita di essere valorizzato al massimo.

Il Quaderno, che consta di 204 pagine, è suddiviso in cinque sezioni e contiene 26 capitoli più 9 interviste ad alcuni dei più qualificati ematologi italiani. Un comodo menù interattivo in fondo a ogni pagina vi consentirà un'agevole navigazione.

Ci auguriamo di aver realizzato un prodotto editoriale utile per tutti coloro che, a vario titolo, si occupano di CAR T-cells, siano essi studenti, clinici, ricercatori, farmacisti, personale delle aziende farmaceutiche o altro ancora.

A tutti auguriamo una buona lettura.

Alessandra Terzaghi



10 cose da sapere sulle CAR T-cells

- 1 Che cosa sono le CAR T-cells?**
- 2 Sono già disponibili per i pazienti o si tratta solo di terapie sperimentali?**
- 3 Per quali tumori si possono utilizzare?**
- 4 Nell'ambito di queste malattie, quali pazienti possono essere trattati con le CAR T-cells?**
- 5 Che risultati si possono ottenere con questo trattamento?
Si può guarire con le CAR T-cells?**
- 6 La terapia con CAR T-cells è sicura?**
- 7 Le CAR T-cells possono essere utilizzate da tutti i pazienti per le quali sono indicate?**
- 8 Su quali fronti dovrà muoversi la ricerca sulle CAR T-cells nel prossimo futuro e che ruolo potrà avere l'Italia nella ricerca clinica su queste cellule?**
- 9 Quali sfide si dovranno affrontare per garantire ai pazienti l'accesso a questa terapia?**
- 10 L'importanza del 'CAR T-cells team'**



1 Che cosa sono le CAR T-cells?

Le CAR T-cells rappresentano una forma di immunoterapia cellulare, nella quale si sfruttano cellule del sistema immunitario 'potenziate' per combattere un tumore, al momento attuale un tumore ematologico. Sono, infatti, linfociti T (o cellule T) prelevati dal paziente e 'ingegnerizzati', cioè manipolati in laboratorio inserendovi un gene estraneo sintetico che codifica per un recettore chimerico (non esistente normalmente in natura) capace di riconoscere un antigene bersaglio presente sulle cellule tumorali e chiamato CAR, acronimo dell'espressione inglese *Chimeric Antigen Receptor*. Il CAR è una proteina transmembrana che sporge all'esterno della cellula con una porzione, una sorta di 'antenna', in grado di individuare l'antigene tumorale e legarsi ad esso. Nella porzione intracellulare del CAR si trovano, invece, due o più porzioni responsabili dell'attivazione, proliferazione ed espansione di queste cellule, una volta che si sono legate alle cellule tumorali. In un certo senso, le CAR T-cells possono essere considerate come 'super killer, nei quali, grazie al CAR, è stata potenziata la loro capacità di espandersi ed uccidere le cellule malate quando vengono somministrate al paziente. Una volta reinfuse nell'organismo, le CAR T-cells riconoscono le cellule tumorali che presentano sulla loro superficie l'antigene bersaglio, vi si legano e le eliminano attraverso diversi meccanismi.

2 Sono già disponibili per i pazienti o si tratta solo di terapie sperimentali?

La Food and drug administration (Fda), negli Stati Uniti, e la European medicines agency (Ema), in Europa, hanno già dato il loro via libera a due prodotti commerciali a base di CAR T-cells: tisagenlecleucel (di Novartis) e axi-cel (di Gilead). Un terzo, liso-cel (di Celgene), è in fase avanzata di sperimentazione, ma non ha ancora avuto il nulla osta di nessuna agenzia regolatoria, e vi sono anche altri prodotti all'orizzonte, seppure un po' più indietro nello sviluppo clinico. Per quanto riguar-

da l'Italia, l'Agenzia italiana del farmaco (Aifa) ha autorizzato nell'agosto scorso l'impiego di tisagenlecleucel anche nel nostro Paese secondo le indicazioni approvate dall'Ema e a questa approvazione è seguito nel novembre scorso anche il via libera ad axi-cel; quest'ultimo, tuttavia, era già disponibile per i pazienti italiani attraverso un programma di 'uso compassionevole', consistente nella fornitura gratuita al Sistema sanitario nazionale (Ssn) di un certo numero di dosi per trattare i casi più urgenti, in attesa che si chiudesse l'iter negoziale. Grazie a questo programma, presso l'Istituto Nazionale dei tumori di Milano, il 18 marzo scorso è stato trattato con axi-cel il primo paziente italiano, un uomo di 50 anni affetto da linfoma diffuso a grandi cellule B. Tisagenlecleucel e axi-cel potranno essere somministrati ai pazienti candidabili a questa terapia, a spese dell'Ssn, presso centri individuati dalle Regioni e accreditati secondo criteri individuati dalla commissione tecnico-scientifica dell'Aifa.

3 Per quali tumori si possono utilizzare?

Sia tisagenlecleucel sia axi-cel sia liso-cel sono stati sviluppati per il trattamento di alcuni linfomi non-Hodgkin, in particolare il linfoma diffuso a grandi cellule B, mentre tisagenlecleucel è indicato anche per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta a cellule B nei bambini e nei giovani fino a 25 anni. In tutti e tre questi prodotti, l'antigene bersaglio è CD19, ma in questo momento sono in corso molti studi sulle CAR T-cells nei quali si stanno vagliando anche altri target. Una delle sfide maggiori per i ricercatori è quella di trovare bersagli che consentano di migliorare ulteriormente l'efficacia di questa terapia e di eliminare nel modo più specifico possibile le cellule tumorali, senza arrecare danno a quelle normali. Al di là delle applicazioni sopra citate, ce ne sono altre possibili sulle quali si sta lavorando, non ancora autorizzate. La prima è la leucemia linfatica cronica e si inizia ad aprire qualche nuova prospettiva anche per il mieloma multiplo, per il quale le

CAR T-cells in sviluppo hanno come bersaglio non CD19, ma un antigene diverso: l'antigene di maturazione delle cellule B, o BCMA, che è ampiamente espresso sulla superficie delle cellule mielomatose. Si stanno facendo, inoltre molti studi, che sono però in una fase ancora preliminare, anche per il trattamento dei tumori solidi.

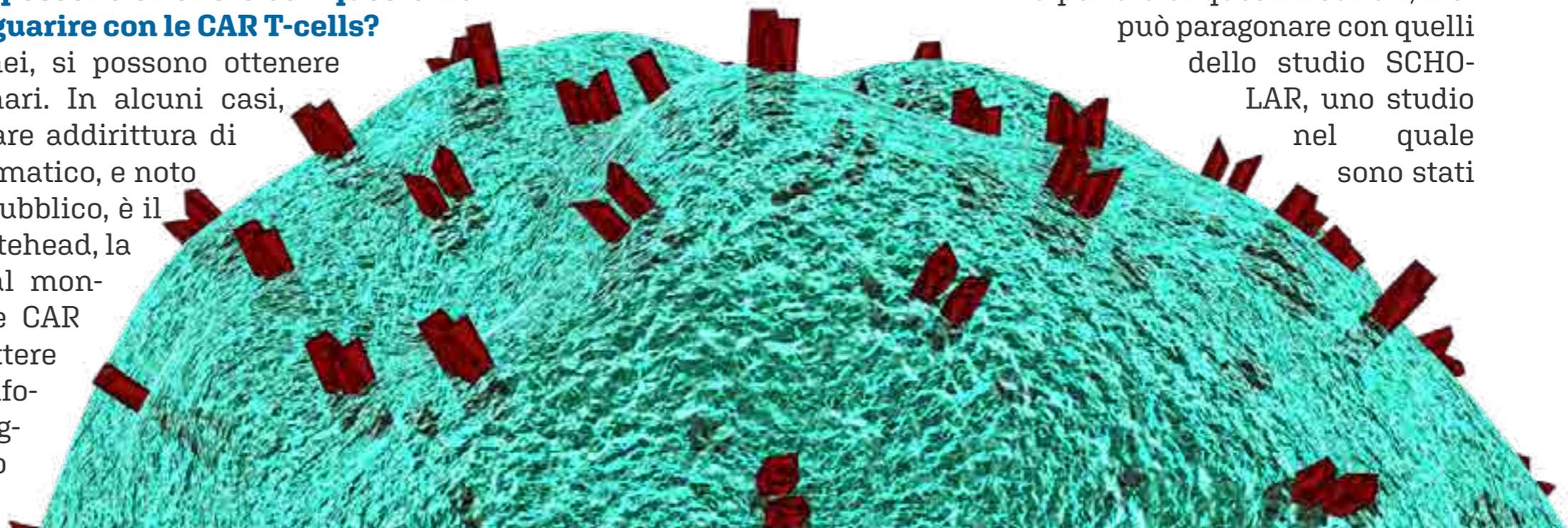
4 Nell'ambito di queste malattie, quali pazienti possono essere trattati con le CAR T-cells?

Va detto con estrema chiarezza, per non generare aspettative inutili, che le CAR T-cells attualmente disponibili non sono per tutti. Al momento, non sono indicate per un paziente all'esordio della malattia, come primo trattamento. Al contrario, sono state autorizzate dalle agenzie del farmaco solo per i pazienti recidivati/refrattari, cioè che non hanno risposto ai trattamenti precedenti oppure hanno risposto inizialmente, ma ogni volta hanno avuto una ricaduta; casi, insomma, nei quali si era già provato di tutto, compreso il trapianto di cellule staminali emopoietiche, e per i quali non vi erano più altre opzioni terapeutiche disponibili.

5 Che risultati si possono ottenere con questo trattamento? Si può guarire con le CAR T-cells?

Nei pazienti idonei, si possono ottenere risultati straordinari. In alcuni casi, forse, si può parlare addirittura di guarigione. Emblematico, e noto anche al grande pubblico, è il caso di Emily Whitehead, la prima bambina al mondo trattata con le CAR T-cells per combattere una leucemia linfoblastica acuta aggressiva, in stadio

ormai terminale: ancora oggi, dopo oltre 7 anni dall'infusione, la bambina sta bene e non mostra segni di malattia. Per quanto riguarda il linfoma diffuso a grandi cellule B, per esempio, nei tre studi registrativi condotti finora (JULIET per tisagenlecleucel, ZUMA-1 per axi-cel e TRANSCEND NHL-001 per liso-cel, ndr) i risultati non sono molto dissimili e si è visto che una percentuale di pazienti compresa all'incirca tra il 30 e il 40% ottiene una remissione completa, ovvero una scomparsa completa del tumore, che sulla base dei dati finora disponibili sembra essere duratura. Questi pazienti, con un trattamento 'one shot', quale è la singola infusione di CAR T-cells alla quale sono sottoposti, potrebbero essere guariti dalla malattia. Ovviamente, occorre proseguire il follow-up per confermare questi risultati, ma negli studi sopra citati si è visto che i pazienti ancora in remissione completa a 6 mesi dall'infusione, nella maggior parte dei casi la mantengono nel tempo. Una volta raggiunto questo traguardo, le ricadute in seguito sono poche. Chi ha partecipato agli studi registrativi è stato osservato in media per 2 anni dopo il trattamento, ma ci sono dati anche su pazienti seguiti molto più a lungo, anche a fino a 5 anni o più, come la stessa Emily. Per avere un'idea della portata di questi risultati, li si può paragonare con quelli dello studio SCHOLAR, uno studio nel quale sono stati

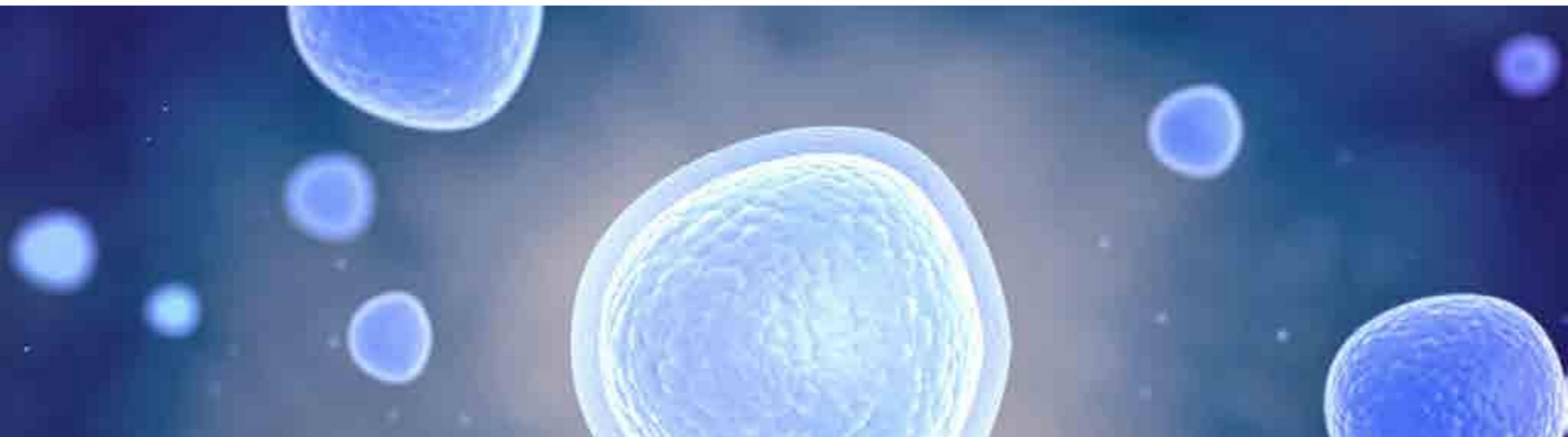


combinati i risultati di altri trial sul linfoma diffuso a grandi cellule B, e nei quali i pazienti erano stati selezionati con gli stessi criteri dello studio registrativo ZUMA-1. In questo studio, è stata riportata una percentuale di risposta complessiva del 26% – risultati già buoni, che difficilmente oggi si riscontrano nella pratica clinica –, e una sopravvivenza mediana di poco più di 6 mesi. Nello studio ZUMA-1, invece, i pazienti che hanno risposto al trattamento sono stati l'82% e la sopravvivenza mediana è risultata di oltre 18 mesi: numeri, dunque, tre volte superiori, con le CAR T-cells.

6 La terapia con CAR T-cells è sicura?

Accanto a tossicità già note per altri trattamenti antitumorali, le CAR T-cells hanno dimostrato di poterne indurre alcune del tutto nuove, come la sindrome da rilascio di citochine, indicata con la sigla CRS, e la neurotossicità, che nei casi più gravi possono richiedere il trasferimento del paziente in terapia intensiva e a volte, per fortuna raramente, hanno portato addirittura al decesso. La tossicità di questa terapia resta un problema da considerare con attenzione, ma i medici stanno imparando a

gestirla e controllarla, via via che aumenta l'esperienza clinica. Oggi, per esempio, si sa che la CRS, una reazione parossistica che è dovuta essenzialmente a un'iperattivazione del sistema immunitario provocata dalle CAR T-cells ed è peraltro un indicatore dell'efficacia della terapia, si può 'spegnere' somministrando farmaci che agiscono come antidoti dell'interleuchina-6; in questo modo si riesce a evitare il ricovero in rianimazione nell'80% dei casi. La neurotossicità spesso si sviluppa in concomitanza con la CRS, ma nel 10-15% dei casi può comparire da sola, in maniera più subdola e quindi molto più difficile per la diagnostica differenziale. Finora l'attenzione dei ricercatori si è concentrata su questi due effetti avversi, che rappresentano una novità rispetto a quelli delle terapie antitumorali convenzionali. Tuttavia, i dati di un anno di esperienza negli Stati Uniti nella cosiddetta 'real life', la pratica clinica quotidiana, stanno rivelando che anche le citopenie persistenti e le infezioni non sono assolutamente da sottovalutare. Le citopenie prolungate, possono avere un'incidenza paragonabile a quella associata alle chemioterapie di salvataggio e, di conseguenza, esporre il paziente al rischio di infezioni gravi.



7 Le CAR T-cells possono essere utilizzate da tutti i pazienti per le quali sono indicate?

Non tutti i pazienti per i quali una terapia con CAR T-cells è, in linea di principio, indicata possono essere effettivamente sottoposti alla cura. Una corretta selezione dei pazienti è assolutamente cruciale, per vari motivi: per esempio, per avere le maggiori chance di successo terapeutico, ma anche per non sprecare risorse preziose dell'Ssn, e non solo. Non tutti i pazienti con malattia recidivata o refrattaria potranno essere trattati. In presenza di una malattia molto estesa o in rapida progressione il trattamento non è fattibile, perché ad oggi non si ha il tempo materiale di tenerla sotto controllo mentre si aspetta che le cellule ingegnerizzate arrivino dall'impianto di produzione all'ospedale, un'attesa che al momento, per i due prodotti già approvati, dura circa 4-6 settimane. In questo lasso di tempo, infatti, non si può fare una chemioterapia aggressiva, per non rischiare che il paziente arrivi in uno stato di citopenia al momento dell'infusione delle cellule, dal momento che probabilmente lo sarà per settimane anche dopo il trattamento: il rischio infettivo sarebbe troppo alto. Inoltre, si sa che il paziente non deve essere stato trattato con steroidi ad alte dosi prima del prelievo dei linfociti T da manipolare, altrimenti non potrebbe fornire una quantità di cellule sufficiente per produrre le CAR T-cells. Insomma, i pazienti devono essere selezionati con cura in base allo stato della malattia e alle loro condizioni di partenza, tra cui anche l'età. Per i due prodotti già approvati, le agenzie del farmaco non hanno specificato un limite superiore di età nelle indicazioni, ma è ovvio che un soggetto molto anziano potrebbe presentare comorbidità tali da rendere problematica la gestione delle eventuali complicanze e sconsigliare assolutamente il trattamento. Occorre tenere presente, inoltre, che nei due studi registrativi sul linfoma diffuso a grandi cellule B, per esempio, il 75% dei pazienti aveva meno di 65 anni, per cui i dati su efficacia e sicurezza delle CAR T-cells nei soggetti over 65 sono, per ora, piuttosto limitati.

8 Su quali fronti dovrà muoversi la ricerca sulle CAR T-cells nel prossimo futuro e che ruolo potrà avere l'Italia nella ricerca clinica su queste cellule?

Ci sono molti aspetti da chiarire meglio. A partire dai meccanismi per cui i pazienti non rispondono o non raggiungono la remissione completa e quelli per cui ricadono, senza dimenticare quelli alla base delle diverse tossicità, per imparare a gestirle sempre meglio. Bisognerà poi lavorare sodo, e molti gruppi lo stanno già facendo, per identificare dei marcatori immunologici di risposta e marcatori utili per prevedere chi svilupperà tossicità. Ma, soprattutto, sarà fondamentale fare studi di *'real life'* – negli Stati Uniti, dove le prime CAR T-cells sono state approvate un anno prima che in Europa, si stanno già facendo e ci sono già i primi dati –, per capire quante siano effettivamente le persone che possono essere sottoposti a questo trattamento e quali saranno la sua efficacia e le sue tossicità nei pazienti che si incontrano tutti i giorni in ambulatorio, molto meno selezionati di quelli che vengono arruolati nei trial clinici.

Alcuni centri italiani hanno partecipato agli studi registrativi che hanno portato all'approvazione delle CAR T-cells 'commerciabili' approvate in Europa e negli Stati Uniti. Al di là di questo, sono in corso in Italia diversi studi clinici di tipo accademico su CAR T-cells 'made in Italy', studi che tuttavia richiedono finanziamenti adeguati e la capacità, da parte delle istituzioni partecipanti, di produrre le cellule 'in proprio' in una cell factory che rispetti gli standard GMP. Al momento, nel nostro Paese, i centri in grado di farlo non sono molti, ma di assoluta eccellenza: tra questi, l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, il San Gerardo di Monza e il Giovanni XXII di Bergamo, che stanno facendo uno studio in collaborazione, e l'Istituto Scientifico San Raffaele di Milano. Altri centri, tra cui l'Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori di Meldola, si stanno attrezzando in questo senso. La Società italiana di ematologia (SIE) ha già avviato anche l'iter per con-

durre uno studio di *'real life'*, per capire cosa accadrà quando si tratteranno i pazienti con le CAR T-cells commerciali nella pratica clinica quotidiana, in Italia. Inoltre, si dovrà istituire necessariamente un registro osservazionale dei pazienti che saranno trattati con queste cellule ingegnerizzate e istituire una biobanca prospettica per eseguire studi traslazionali, per esempio studi basati sulla biopsia liquida per poter valutare precocemente la risposta della malattia al trattamento.

9 Quali sfide si dovranno affrontare per garantire ai pazienti l'accesso a questa terapia?

Le sfide da superare affinché i pazienti che ne hanno bisogno possano accedere non sono poche, sia dal punto di vista regolatorio sia da quello organizzativo. Per l'EMA, le CAR T-cells rientrano nella categoria degli Advanced Therapy Medicinal Products e, come tali, devono passare un doppio esame per essere autorizzate: prima quello di un comitato apposito e poi quello del consueto CHMP. Inoltre, sono considerate OGM, organismi geneticamente modificati, il che richiede di seguire norme specifiche di protezione ambientale e del personale. I centri che le potranno somministrare dovranno possedere un accreditamento e soddisfare determinati requisiti. A questo proposito, la SIE, di concerto con l'AIFA e con il Gruppo italiano per il trapianto di midollo osseo (GITMO) e dell'Associazione italiana di ematologia e oncologia pediatrica (AIEOP), ha stilato un documento nel quale, sulla scorta di esperienze americane ed europee, si definiscono i requisiti necessari per poter erogare questo trattamento. L'EMA, peraltro, ha affidato alle aziende produttrici delle CAR T-cells commerciali la responsabilità del programma di gestione del rischio (il cosiddetto Risk Management Program), che le obbliga a inviare ispezioni nei centri autorizzati

a somministrare le CAR T-cells, per controllare se ognuno possiede realmente i requisiti per poter fornire all'azienda stessa linfociti T di qualità e quantità idonea per la produzione delle CAR T-cells. Per fare tutto questo serviranno mesi di lavoro e la costruzione di un nuovo modello organizzativo.

10 L'importanza del 'CAR T-cells team'

Sul fronte organizzativo, data la complessità della terapia con le CAR T-cells e la delicatezza della gestione degli effetti collaterali, da più parti è stata sottolineata la necessità, per i centri che vorranno trattare i propri pazienti con le CAR T-cells, di dotarsi di un 'CAR T-cells team'. È un team multidisciplinare che deve essere in grado di gestire la terapia in tutte le sue fasi, dalla selezione del paziente, all'infusione delle cellule ingegnerizzate, al trattamento delle complicanze, al follow-up. È essenziale che il team non operi solo su base volontaristica, ma sia formalizzato all'interno dell'ospedale, e dovranno farne parte ematologi, *in primis*, ma anche intensivisti, neurologi e infettivologi per trattare le possibili tossicità, farmacisti ospedalieri, infermieri dedicati ecc. Il ruolo cardine in questo team spetterà all'ematologo, che è la figura in possesso delle competenze per selezionare correttamente i pazienti, requisito imprescindibile per la riuscita del trattamento. L'implementazione di questo modello comporterà inevitabilmente un aumento della mole di lavoro per i centri autorizzati a somministrare le CAR T-cells – è prevedibile un aggravio non solo per le ematologie, ma anche per le unità di rianimazione, chiamate a gestire le complicanze gravi – e tale aumento, in ospedali in cui già si lavora a pieno regime, potrà configurare un problema di personale e, in ultima analisi, di costi, del quale l'Ssn dovrà farsi carico.



Prof. Paolo Corradini

**Le nuove frontiere dell'ematologia:
presente e futuro della terapia con CAR-T-cells**

 **GUARDA IL VIDEO**

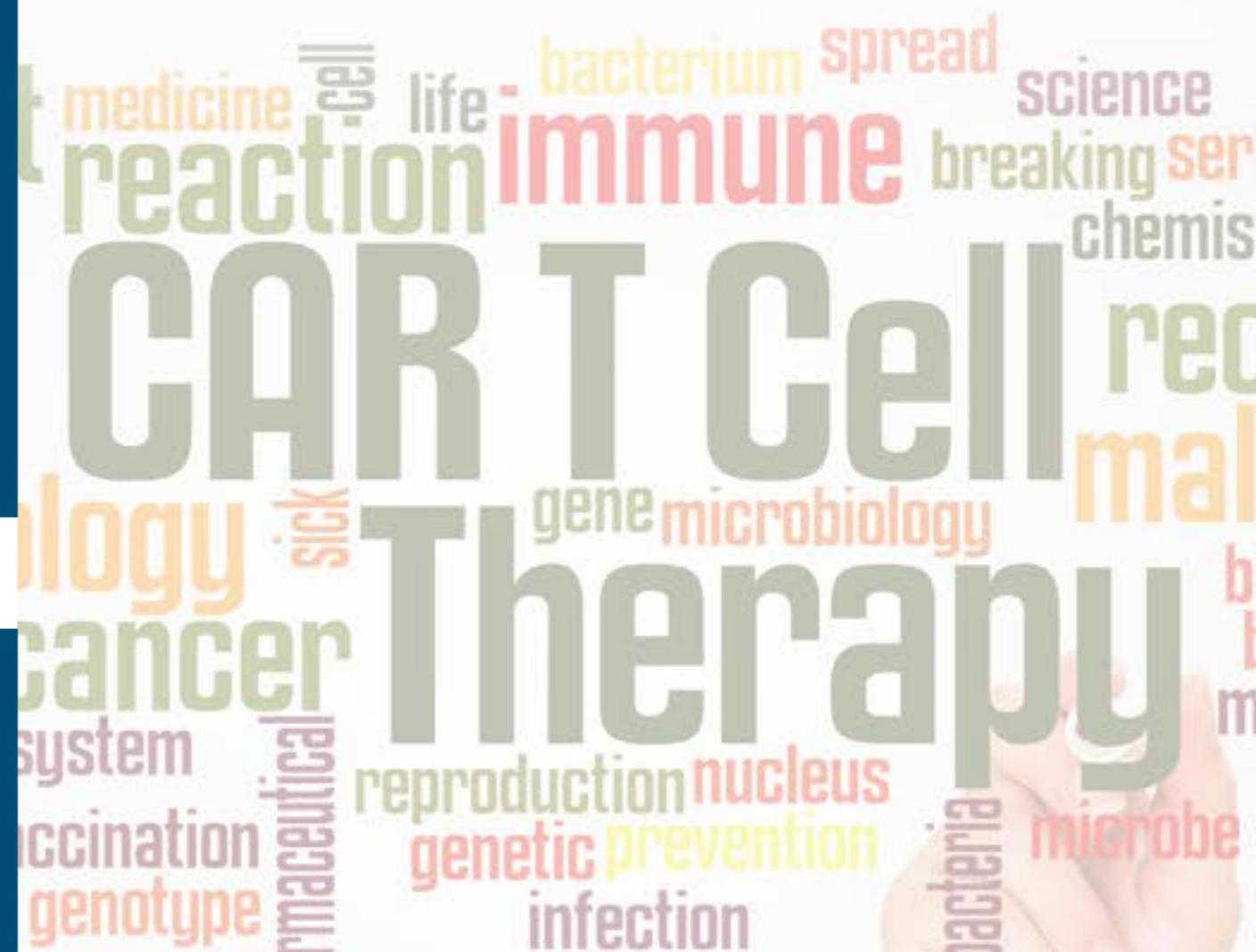


Prof. Armando Santoro

**CAR T-cells, una terapia sostenibile
dal punto di vista economico?***

 **GUARDA IL VIDEO**

**L'intervista è stata realizzata poco prima dell'approvazione di axi-cel, autorizzato in Italia dall'Aifa nel novembre 2019.*



A word cloud centered around the theme of CAR T Cell Therapy. The most prominent words are 'CAR T Cell' and 'Therapy'. Other visible words include 'immune', 'reaction', 'bacterium', 'spread', 'science', 'breaking', 'ser', 'chemis', 'rec', 'mal', 'b', 'm', 'microbiology', 'gene', 'sick', 'cancer', 'system', 'reproduction', 'nucleus', 'genetic', 'prevention', 'infection', 'pharmaceutical', 'vaccination', 'genotype', 'bacteria', and 'microbe'. The words are in various colors and orientations, creating a dynamic visual effect.



INTRODUZIONE

Il sistema immunitario: che cos'è e come funziona

L'immunoterapia: la nuova frontiera nella cura dei tumori

Le CAR T-cells, una storia di passione, intuito e perseveranza

La storia di Emily, la prima bambina trattata con le CAR T-cells



Iscriviti alla newsletter
di PharmaStar

PHARMASTAR[★]
il Giornale online sui Farmaci

Il sistema immunitario: che cos'è e come funziona

Il sistema immunitario è una complessa rete integrata di organi, cellule e mediatori chimici che ha lo scopo di difendere l'organismo dagli agenti patogeni e dalle cellule che presentano anomalie, come quelle tumorali, danneggiate o infettate da virus.

I costituenti del sistema immunitario

Gli organi del sistema immunitario

Gli organi che fanno parte del sistema immunitario sono localizzati in diverse parti del corpo e si distinguono in: **organi linfatici primari** (midollo osseo e timo), che costituiscono la sede in cui i leucociti (globuli bianchi) si sviluppano e maturano, e **organi linfatici secondari** (milza, linfonodi, inclusi tonsille e adenoidi, appendice vermiforme e, nell'intestino, placche di Peyer), che rappresentano la sede in cui i linfociti

possono incontrare gli antigeni presentati da opportune cellule e attivare una serie di risposte protettive.

Le cellule del sistema immunitario

Le cellule del sistema immunitario sono molto diversificate, sia nella struttura sia nella funzione. Tutte derivano da una cellula staminale del midollo osseo, dalla quale inizialmente si differenziano due linee cellulari (linfoide e mieloide). Fanno parte della **linea linfoide** tutti i **linfociti**, mentre della **linea mieloide** i diversi tipi di **granulociti** ([figura 1](#)).

I mediatori chimici del sistema immunitario

Le cellule del sistema immunitario sono in grado di interagire tra loro scambiandosi segnali che ne regolano reciprocamente il livello di attività; tale interazione è permessa dalla presenza di specifici recettori di riconoscimento e dalla secrezione di sostanze, genericamente note come **citochine**, che fungono da segnali regolatori.

La risposta immunitaria

L'attività protettiva del sistema immunitario viene esercitata attraverso una triplice linea difensiva. La prima è rappresentata dalle **barriere meccaniche e chimiche**. Queste barriere (cute, sudore, sebo, muco, pH acido dello stomaco ecc.) costituiscono il primo meccanismo di difesa dell'organismo e hanno lo scopo di impedire la penetrazione degli agenti patogeni al suo interno. Quando il patogeno riesce a oltrepassarle, si attiva la risposta immunitaria interna, che può essere di due tipi (seconda e terza linea difensiva) ([figura 2](#)):

Il concetto di antigene

La funzionalità del sistema immunitario implica la capacità di distinguere le componenti e le cellule estranee all'organismo (*not self*), e potenzialmente pericolose, da quelle proprie (*self*) e innocue, attaccando ed eliminando le prime e risparmiando le seconde. La distinzione tra *self* e *not self*, quindi tra componenti innocue e pericolose, si basa sulla capacità del sistema immunitario di riconoscere particolari macromolecole presenti sulla superficie cellulare, gli antigeni, ognuno dotato di una struttura unica e ben definita.

- **risposta immunitaria innata** (o aspecifica): meccanismo di difesa generale, presente sin dalla nascita, che agisce rapidamente e indiscriminatamente contro qualsiasi agente esterno;
- **risposta immunitaria acquisita** (o specifica o adattativa): si sviluppa lentamente dopo il primo incontro con uno specifico agente patogeno, ma mantiene una memoria degli antigeni incontrati, per permettere all'organismo di agire più rapidamente in seguito a ulteriori esposizioni future allo stesso antigene.

Il sistema immunitario è costituito da organi (gli organi linfoidi primari e secondari), cellule (diversi tipi di linfociti e granulociti) e mediatori chimici (citochine).

Entrambi i tipi di risposta immunitaria sono strettamente interconnessi e coordinati per controllare ed eliminare la struttura riconosciuta come *not self*.

Nel dettaglio, la risposta immunitaria si sviluppa secondo tre fasi:

1. fase di riconoscimento dell'antigene: individuazione e riconoscimento della sostanza estranea;
2. fase di attivazione: comunicazione del pericolo alle altre cellule immunitarie; reclutamento di altri attori del sistema immunitario e coordinamento della risposta immunitaria complessiva;
3. fase effettrice: attacco all'invasore con distruzione o soppressione dell'agente patogeno.

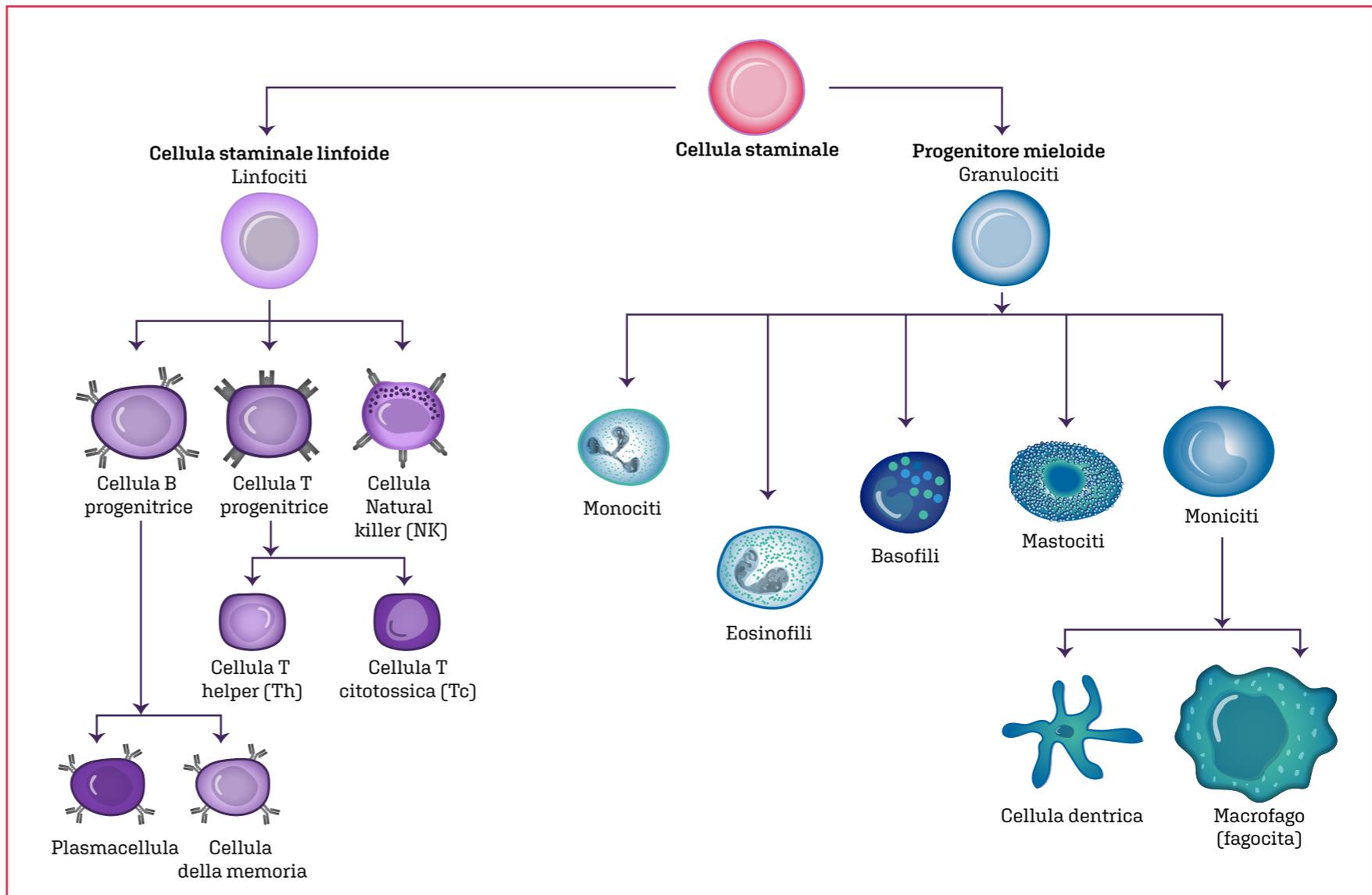


Figura 1. Le cellule del sistema immunitario.

Il sistema immunitario protegge l'organismo attraverso una triplice linea di difesa:

- barriere meccaniche e chimiche;
- risposta immunitaria innata (o aspecifica);
- risposta immunitaria acquisita (o specifica o adattativa).

La risposta immunitaria innata

Non appena i microrganismi riescono a oltrepassare le barriere meccanico-chimiche, l'immunità innata si attiva rapidamente, contribuendo alla loro distruzione.

Fattori cellulari dell'immunità innata

Diverse sono le cellule che partecipano alla risposta immunitaria innata.

Le prime a intervenire sono i neutrofili, che creano una rete per intrappolare gli agenti patogeni e rilasciano sostanze citotossiche, e i **macrofagi** (fagociti), che riconoscono i patogeni tramite determinati recettori, li fagocitano e li distruggono. Successivamente, queste cellule rielaborano alcuni frammenti del patogeno e li espongono sulla loro superficie assieme ad alcune proteine del **complesso maggiore di istocompatibilità (MHC)**, dall'inglese *Major Hystocompatibility Complex*), quelle di classe II.

Gli **eosinofili** sono cellule dell'immunità innata che agiscono sui parassiti, mentre i **basofili** sono coinvolti nelle reazioni infiammatorie e allergiche.

I **linfociti natural killer (NK)** emettono sostanze in grado di neutralizzare le cellule infettate da virus e quelle tumorali. Stimolati da alcune citochine, i linfociti NK fanno sì che queste cellule si 'suicidino' attraverso il meccanismo dell'apoptosi. A differenza degli altri tipi di linfociti (B e T), caratteristici della risposta immunitaria acquisita, i linfociti NK non riconoscono l'antigene in modo specifico e per questo fanno parte dell'immunità innata.

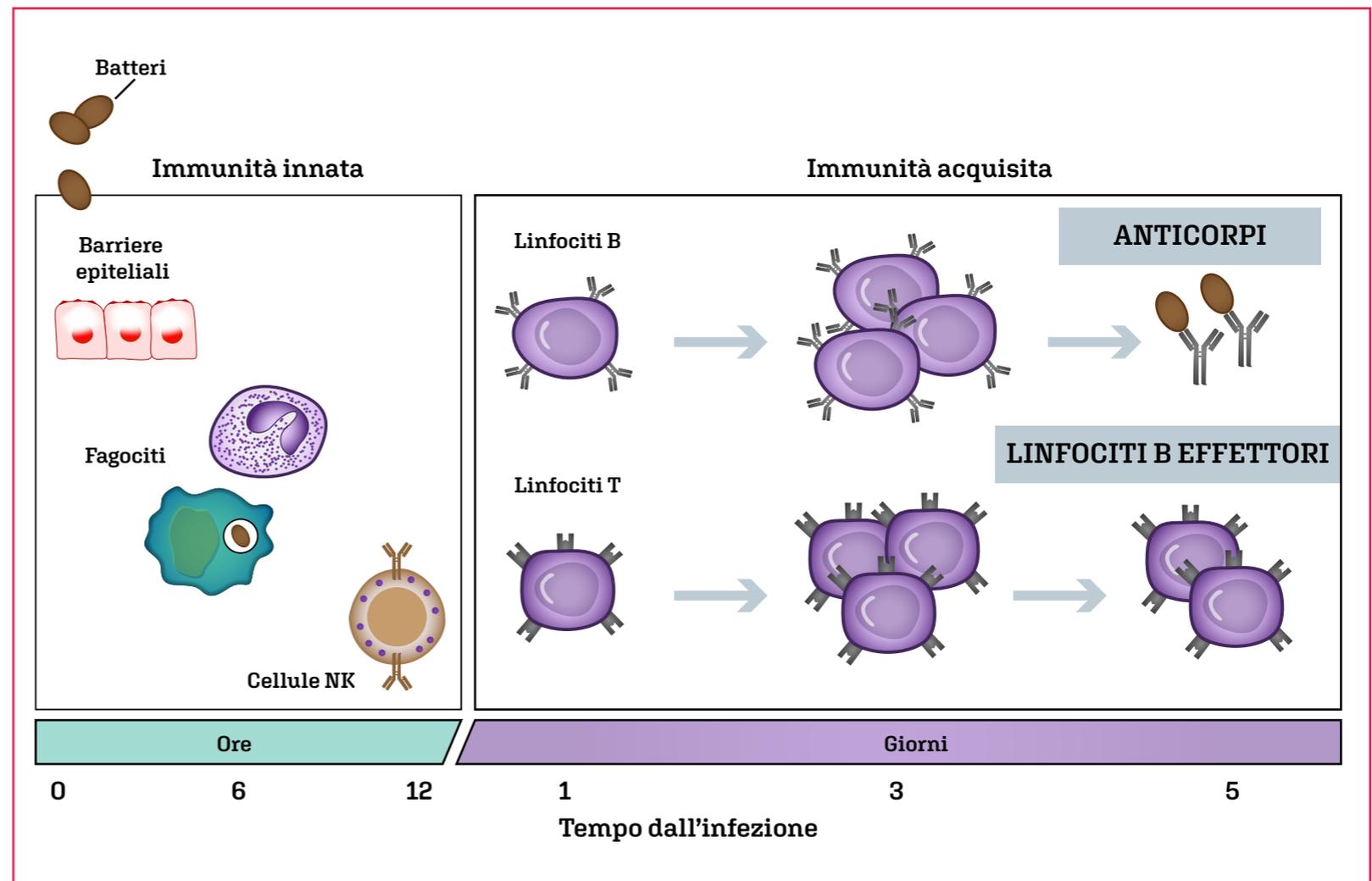


Figura 2. La risposta immunitaria innata e acquisita.

Le **cellule dendritiche**, che assieme ai macrofagi e ai linfociti B sono dette **cellule che presentano l'antigene (APC)**, sono specializzate nella cattura degli antigeni. Queste cellule internalizzano e rielaborano alcuni frammenti del patogeno presentandoli sulla loro superficie associati alle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), quelle di classe II. Questo meccanismo permette la loro presentazione ai linfociti T. Parallelamente contribuiscono a istruire i linfociti B, che sono responsabili della produzione degli anticorpi.

“ L'immunità innata è una immunità di tipo non specifico, presente sin dalla nascita, che si attiva immediatamente in presenza di agenti patogeni, prima che l'organismo sviluppi una risposta immunitaria specifica verso di essi (immunità acquisita), e che coinvolge sia cellule di diverso tipo (neutrofili, macrofagi, eosinofili, basofili, linfociti NK, cellule dendritiche) sia fattori umorali, il più importante dei quali è il sistema del complemento. ”

Fattori umorali dell'immunità innata

Il **sistema del complemento** è costituito da proteine plasmatiche in grado di fungere da messaggeri che sincronizzano le interazioni tra le varie componenti del sistema immunitario. Questo sistema ha quattro funzioni principali:

1. generazione di fattori pro-infiammatori;
2. chemio-attrazione di cellule fagocitiche;
3. potenziamento della fagocitosi attraverso la produzione di proteine opsonizzanti, ovvero anticorpi chiamati opsonine

- che rivestono l'antigene, 'etichettandolo' come patogeno;
4. formazione di pori sulla membrana del microorganismo e conseguente uccisione di quest'ultimo.

L'attivazione del complemento è, in realtà, un meccanismo comune sia all'immunità innata sia a quella acquisita. Esistono, infatti, tre vie distinte di attivazione di questo sistema: 1) la via classica, mediata dagli anticorpi (immunità specifica); 2) la via alternativa, attivata direttamente da alcune proteine delle membrane cellulari dei microrganismi (immunità innata); 3) la via lectinica, che riconosce il mannosio come principale sito di attacco alle membrane dei patogeni.

Oltre al sistema del complemento, gli altri componenti principali dell'immunità innata umorale sono le collettine (delle quali fa parte la lectina che lega il mannosio, MBL, una proteina plasmatica che funziona da opsonina), le pentrassine (proteine plasmatiche che riconoscono e legano strutture microbiche) e le ficoline (proteine plasmatiche che legano e opsonizzano tipi batterici diversi e attivano il complemento).

La risposta immunitaria acquisita

L'immunità acquisita interviene quando le altre linee di difesa non sono riuscite a contrastare efficacemente il patogeno.

Le strategie attraverso cui opera l'immunità specifica sono due e collaborano strettamente tra loro: l'**immunità umorale** e l'**immunità cellulo-mediata**. Nel primo caso, a intervenire sono i linfociti B, i quali, a seguito di stimolazione da parte di un antigene, proliferano e si trasformano in cellule attivate, le **plasmacellule**, che producono anticorpi necessari per debellare gli agenti infettivi. Nel secondo caso, ad agire sono i **linfociti T helper (Th)** e i **linfociti T citotossici (Tc)** che, una volta attivati, secernono le citochine, molecole coinvolte nella risposta infiammatoria, volte a eliminare il patogeno o la cellula infettata (**figura 3**).

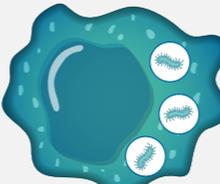
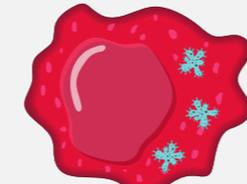
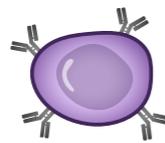
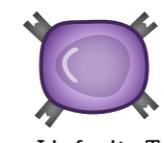
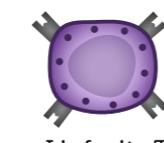
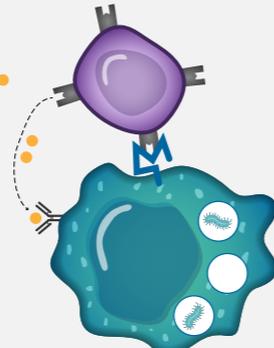
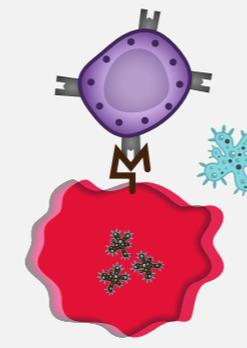
	Immunità umorale	Immunità cellulo-mediata	
Microrganismo	 Microrganismi extracellulari	 Microrganismi fagocitati all'interno del macrofago	 Microrganismi fintracellulari (per es. virus) che si replicano all'interno della cellula infettata
Tipo di linfociti che rispondono	 Linfocita B	 Linfocita T helper	 Linfocita T citotossico
Meccanismo effettore	 Anticorpo secreto		
Funzioni	Blocco delle infezioni ed eliminazione dei microrganismi extracellulari	Attivazione dei macrofagi per uccidere i microrganismi fagocitati	Uccisione delle cellule infettate ed eliminazione del serbatoio di infezione

Figura 3. Schema del meccanismo dell'immunità umorale e cellulo-mediata.

Una delle caratteristiche principali dell'immunità acquisita è la memoria, ovvero la capacità, ogni volta che l'organismo entra in contatto con agenti patogeni già incontrati in precedenza, di rispondere in modo più rapido e più efficace rispetto alla prima esposizione.

Fattori umorali dell'immunità acquisita

Gli **anticorpi** (o **immunoglobuline**) costituiscono i fattori umorali dell'immunità acquisita. Alcuni microrganismi hanno sviluppato vari stratagemmi per alterare i propri marcatori

L'immunità acquisita è una immunità di tipo specifico che interviene quando le precedenti linee di difesa non sono riuscite a contrastare efficacemente un patogeno e opera attraverso due strategie coordinate strettamente tra loro: l'immunità umorale e l'immunità cellulo-mediata. Si sviluppa lentamente dopo il primo incontro con uno specifico agente patogeno, ma mantiene una memoria degli antigeni incontrati.

di superficie, diventando 'invisibili' ai fagociti e perdendo la capacità di attivare il complemento. Gli anticorpi si legano a questi antigeni facilitandone il riconoscimento e la fagocitosi da parte delle cellule immunitarie, ma possono anche legare e inattivare alcune tossine batteriche e concorrono ad alimentare la risposta infiammatoria, attivando il complemento e i mastociti.

L'immunità umorale dipende dalla presenza di anticorpi (o immunoglobuline) prodotti dai linfociti B attivati.

Fattori cellulari dell'immunità acquisita (immunità cellulo-mediata)

L'attivazione della risposta immunitaria acquisita necessita dell'interazione tra le APC e i linfociti, al fine di scatenare la risposta immunitaria specifica verso uno o più antigeni.

“ L'attivazione dell'immunità acquisita cellulo-mediata richiede l'interazione tra le APC e i linfociti, al fine di scatenare una risposta immunitaria specifica verso uno o più antigeni. ”

Le cellule che presentano l'antigene (APC)

Dalla fagocitosi delle molecole estranee si originano frammenti di antigene che, all'interno del fagocita, vengono combinati con particolari proteine appartenenti all'MHC, che permette di riconoscere il *self* dal *not self*. Si tratta di proteine ubiquitarie che hanno la capacità di legarsi a molecole interne alla cellula ed esporle sull'esterno della membrana.

I complessi molecolari costituiti dai frammenti di antigene e dalle molecole dell'MHC vengono esposti sulla superficie di alcune cellule, che per questo vengono chiamate cellule che presentano l'antigene (APC).

Esistono due tipi di molecole dell'MHC. Le molecole dell'**MHC di classe I** si trovano sulla superficie di quasi tutte le cellule nucleate e fanno in modo che le cellule del corpo 'anomale' siano riconosciute dai recettori CD8 dei linfociti T citotossici e distrutte.

Le molecole dell'**MHC di classe II**, invece, si trovano solo sulle APC (cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B). Le molecole dell'MHC di classe II presentano peptidi esogeni (derivati dalla digestione dell'antigene) e vengono riconosciute dai recettori CD4 dei linfociti T helper. Le APC possono presentare anche lipidi esogeni tramite recettori differenti come CD1d.

I peptidi esposti sulla superficie cellulare grazie alle molecole dell'MHC vengono passati al vaglio delle cellule del sistema immunitario, le quali intervengono soltanto se riconoscono tali complessi come *not self*.

Dopo l'esposizione del complesso antigene-MHC, le APC possono spostarsi attraverso i vasi linfatici verso i linfonodi, dove interagiscono con i linfociti che, attivati, si spostano dai linfonodi verso altri siti:

“ Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) è costituito da un complesso di geni codificanti per una serie di proteine ubiquitarie che permettono di riconoscere il *self* dal *not self* legandosi a frammenti di antigeni estranei ed esponendoli sulla membrana cellulare, rendendo così visibili le cellule infette da parte dei linfociti. Le molecole dell'MHC di classe I si trovano sulla superficie di quasi tutte le cellule nucleate; le molecole dell'MHC di classe II, invece, si trovano solo sulle APC (cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B). ”

- se una cellula T helper incontra una cellula bersaglio che espone frammenti di antigene esogeni sul suo MHC di classe II (fagociti e cellule dendritiche) secerne citochine, aumentando la risposta immunitaria (per esempio attivando il macrofago o il linfocita B che ha presentato l'antigene);
- se una cellula T citotossica incontra una cellula bersaglio che espone frammenti di antigene sul suo MHC di classe I (cellule nucleate tumorali o infettate da virus), la uccide per prevenirne la riproduzione.

I linfociti B

I linfociti B riconoscono direttamente l'antigene tramite anticorpi di superficie. Una volta attivati, vanno incontro a proliferazione e maturazione, trasformandosi in parte in cellule specializzate che secernono gli anticorpi, le **plasmacellule**, e in parte in **cellule B della memoria**, che hanno la stessa funzione delle precedenti, ma sono più longeve e garantiscono una rapida produzione di anticorpi qualora si ripresentasse un certo agente patogeno per la seconda volta. Il legame antigene-anticorpo è estremamente specifico: esiste un anticorpo per ogni possibile antigene.

I linfociti T

I linfociti T interagiscono direttamente con le cellule del nostro corpo che risultano infettate o alterate. Essi contribuiscono all'eliminazione diretta dell'antigene, attraverso un'attività citotossica nei confronti delle cellule infettate da virus, o alla sua eliminazione indiretta, attraverso l'attivazione dei linfociti B o i macrofagi. Esistono due principali sottopopolazioni di linfociti T: T helper (Th) (caratterizzati dall'espressione sulla loro superficie del recettore CD4 e indicati quindi come CD4+) e T citotossici (Tc) (caratterizzati dall'espressione sulla loro superficie del recettore CD8 e indicati quindi come CD8+).

I **linfociti Th** presiedono alla regolazione di tutte le risposte immuni per mezzo del rilascio di citochine che coadiuvano i linfociti B, i linfociti T citotossici, ma anche altre cellule della risposta immunitaria innata, compresi macrofagi e cellule dendritiche.

I linfociti di questa classe svolgono principalmente una funzione di coordinamento:

- riconoscono antigeni presentati dall'MHC II;
- secernono le citochine;
- supportano il differenziamento dei linfociti B in plasmacellule;
- regolano l'attività dei linfociti T citotossici;
- attivano i macrofagi.

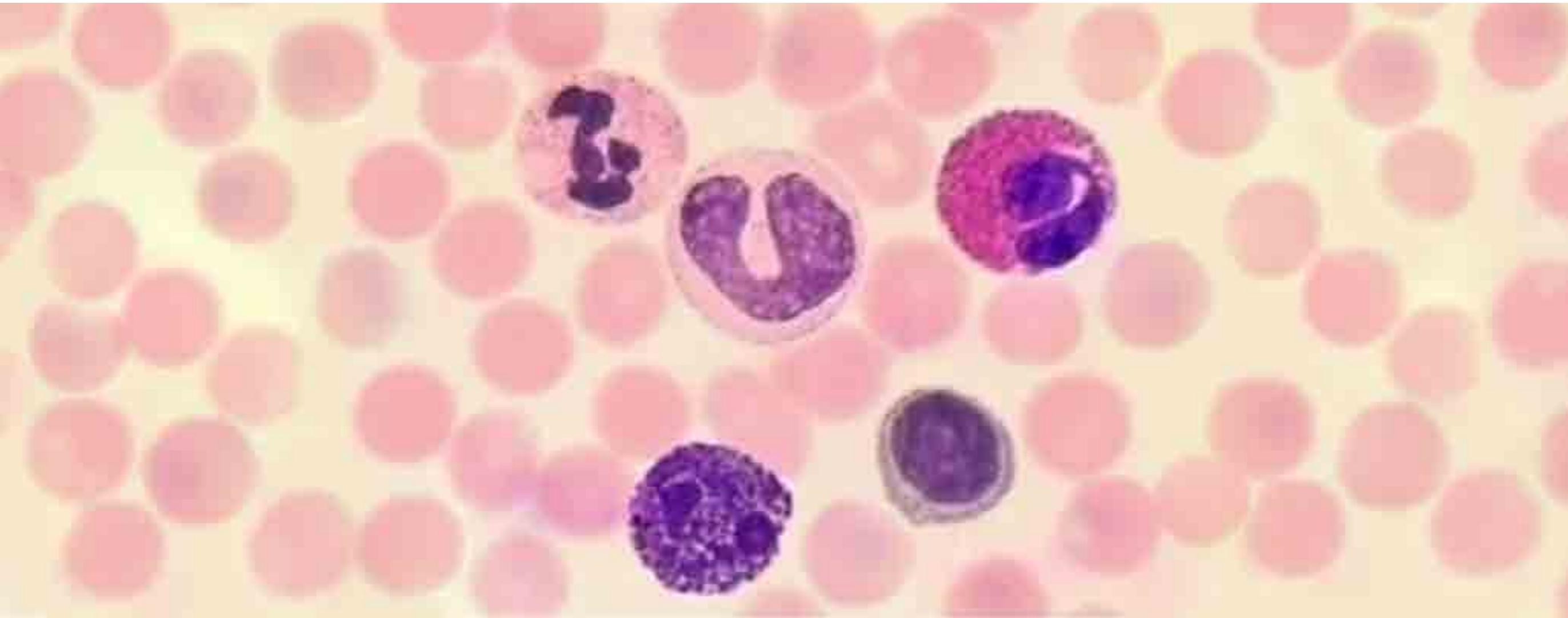
I **linfociti Tc** attaccano direttamente la cellula riconosciuta come *not self*, provocando la formazione di pori nella mem-

“ I linfociti T helper svolgono principalmente una funzione di coordinamento e regolano tutte le risposte immuni tramite il rilascio di citochine che coadiuvano i linfociti B, i linfociti T citotossici, ma anche altre cellule della risposta immunitaria innata, compresi macrofagi e cellule dendritiche; i linfociti T citotossici attaccano direttamente la cellula riconosciuta come *not self*, provocando la formazione di pori nella membrana cellulare e favorendone la lisi. ”

brana cellulare e favorendone la lisi. Parallelamente possono liberare, alcune linfochine (gruppo di interleuchine prodotte dai linfociti T attivati), che attirano i macrofagi e ne supportano la fagocitosi.

Una volta terminata l'infezione, è necessario che la risposta immunitaria venga spenta; questo avviene grazie all'azione specifica di cellule immunitarie (i linfociti T soppressori) che

vanno a sopprimere le popolazioni precedentemente attivate e di cellule immunitarie (i macrofagi pro-risolutivi) che coordinano la riparazione del tessuto precedentemente danneggiato dall'infiammazione. Anche questa fase della risposta immunitaria è coordinata dal rilascio di specifiche citochine differenti da quelle predominanti nella fase effettrice della risposta immunitaria.



I linfociti T

I linfociti T devono il loro nome al fatto che, una volta prodotti nel midollo osseo, migrano nel timo, dove avviene la loro maturazione. In quest'organo, i linfociti non ancora maturi vengono in contatto con le cellule epiteliali, le quali presentano ai recettori per l'antigene presenti sui linfociti stessi le molecole del complesso MHC di classe I e II, espresse sulla superficie delle membrane cellulari. Questo processo rappresenta il momento chiave per la maturazione dei linfociti T, perché in questo modo acquisiscono la capacità di riconoscere le cellule dell'organismo come proprie (*self*), non attivando una risposta di rigetto una volta entrati in circolo. Il riconoscimento degli antigeni da parte dei linfociti T avviene tramite un recettore di membrana chiamato TCR (da *T-cell receptor*) (figura 4). Sui linfociti T, il TCR è associato a un'altra proteina di membrana, CD3, la quale ha il compito di segnalare al nucleo l'avvenuto legame con l'antigene. Il complesso TCR-CD3 riconosce solo le molecole dell'MHC di classe I e II alterate, quindi differenti da quelle presenti sulle cellule proprie dell'organismo (*self*). Infatti, la funzione svolta dai linfociti T maturi, che pattugliano continuamente l'organismo, consiste in una costante ricerca di molecole dell'MHC alterate.

Da questo punto di vista, i linfociti T possono essere divisi in due gruppi: quelli che esprimono sulla loro superficie di membrana un particolare recettore chiamato CD4 (linfociti Th) e vanno alla ricerca di molecole dell'MHC di classe II alterate o di frammenti antigenici ad esse associati e quelli che esprimono il recettore CD8 (linfociti Tc), che vanno alla ricerca di molecole dell'MHC di classe I alterate o di frammenti antigenici ad esse associati.

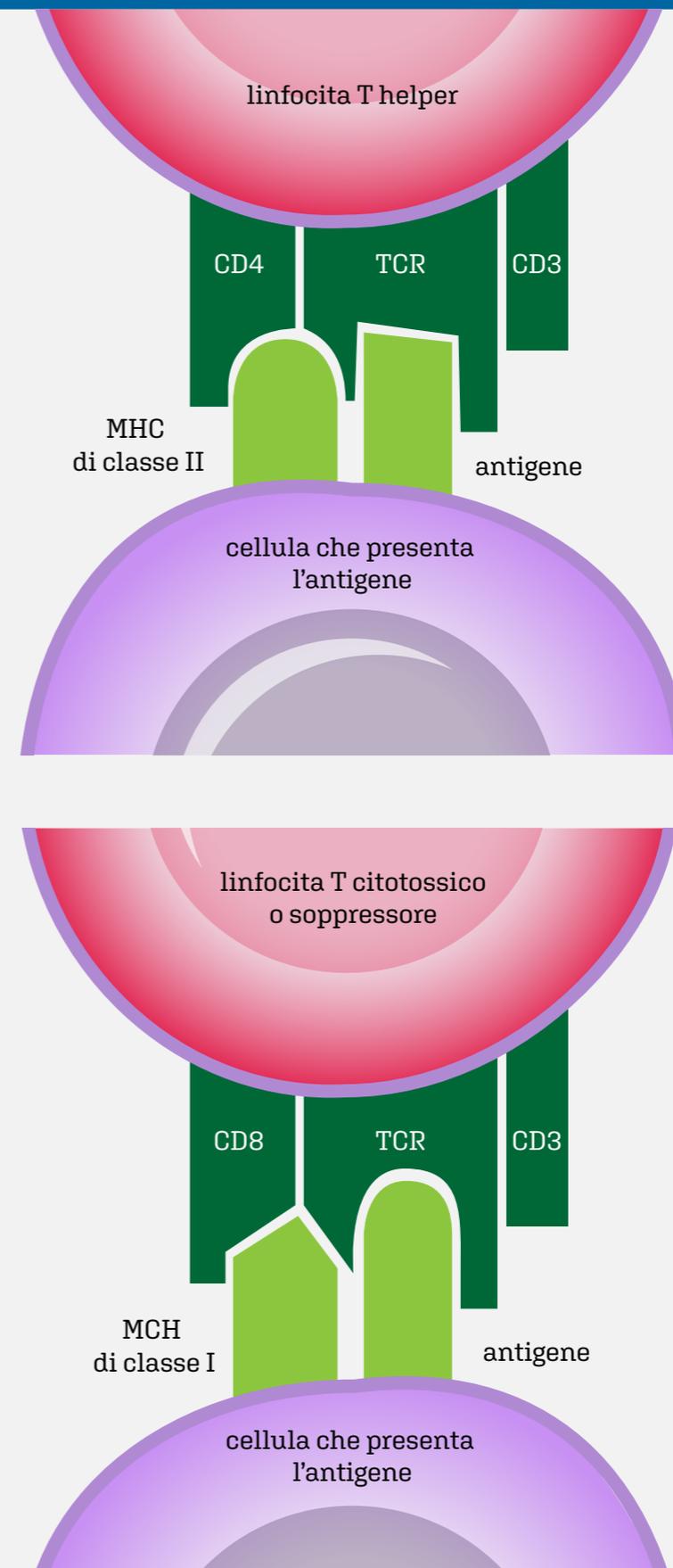


Figura 4. Riconoscimento dell'antigene.

Per riconoscere l'antigene, i linfociti Th devono venire a contatto con i macrofagi che presentano loro l'antigene che è stato fagocitato e demolito, e quindi presentato attraverso l'MCH di classe II. Quando il linfocita Th viene in contatto, guidato dal recettore CD4, con i macrofagi, il recettore Ti-CD3 può riconoscere specifici frammenti della struttura antigenica demolita ed esposta all'esterno, sulla superficie dei macrofagi stessi. A questo punto, il linfocita Th viene attivato e origina un clone di cellule figlie; queste, in caso di un nuovo contatto con l'antigene alterato riconosciuto inizialmente, secernono interleuchina-2 (IL-2), una molecola che agisce sui linfociti Tc che abbiano anch'essi riconosciuto lo stesso antigene presentato dai macrofagi in associazione all'MHC di classe I. Il legame con l'IL-2 induce i linfociti Tc a dare origine a un clone cellulare capace di uccidere le cellule che presentano quell'antigene associato all'MHC di classe I (**figura 5**). Attraverso il rilascio di altre citochine, i linfociti Th attivano anche i macrofagi e inducono la mobilitazione dei granulociti e la produzione di immunoglobuline da parte dei linfociti B.

I linfociti T hanno un'importante funzione nel contrastare le infezioni virali, in quanto, una volta che il virus infetta le cellule, le molecole del suo involucro vengono presentate sulla superficie cellulare tramite l'MHC di classe I e riconosciute dai linfociti Tc. L'uccisione della cellula infettata dal virus avviene tramite il contatto tra il recettore T8 del linfocita Tc con l'MHC di classe I della cellula infettata e il riconoscimento da parte del complesso Ti-CD3 dell'antigene virale esposto in superficie (**figura 4**). Questo contatto provoca il rilascio da parte del linfocita di granuli citotossici che danneggiano la membrana della cellula bersaglio, provocandone la morte.

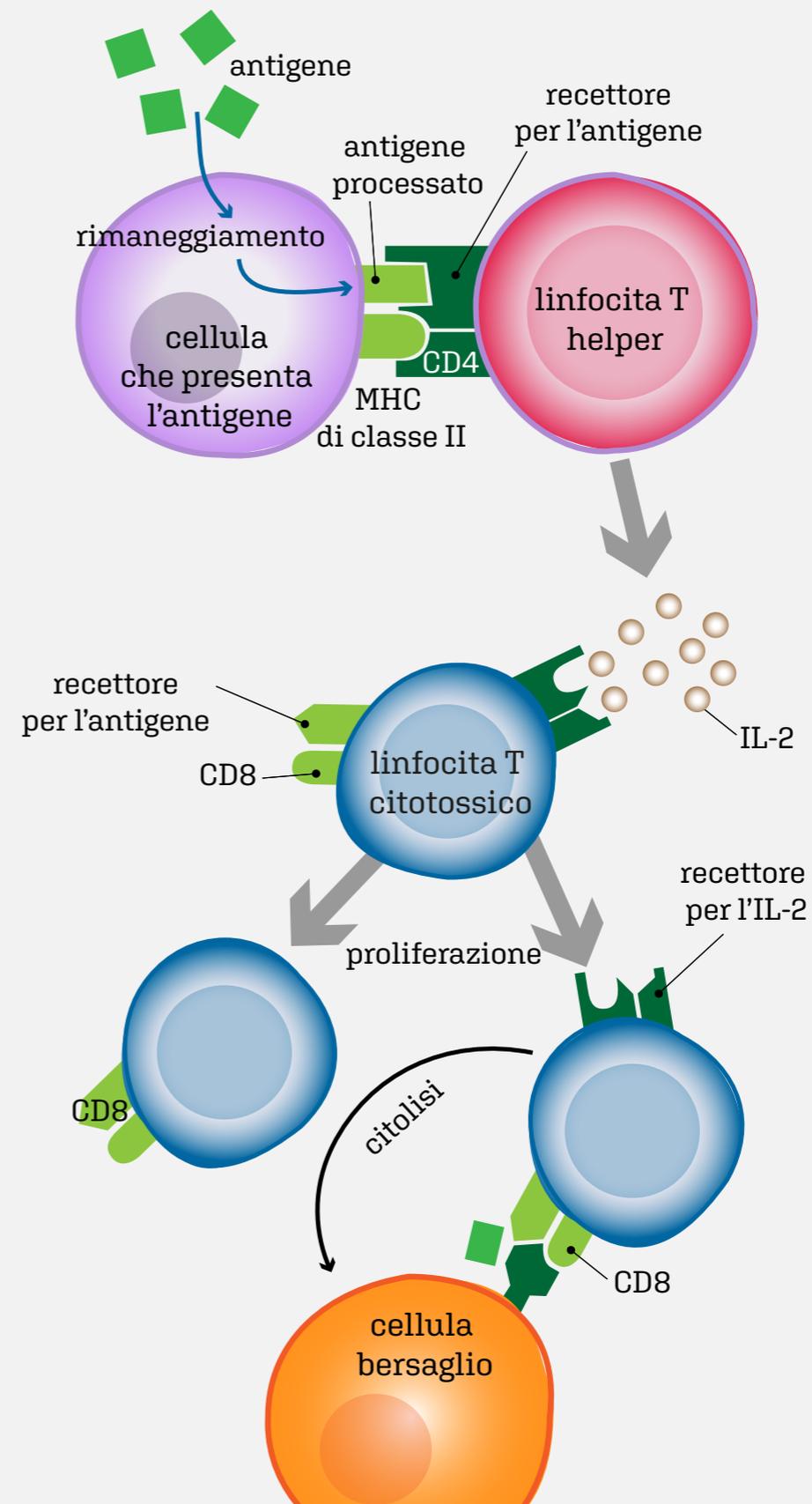


Figura 5. Attivazione dei linfociti T.

Tipizzazione dei linfociti

Tutti i linfociti esprimono sulla loro superficie l'antigene CD3 (sono quindi CD3+), ma si differenziano in sottopopolazioni a seconda dello specifico antigene presente sulla loro membrana cellulare,

Linfociti B (CD19+): vengono indicati anche come linfociti CD3+/CD19+, perché, oltre all'antigene CD3, presentano sulla loro superficie l'antigene CD19. I linfociti B hanno come funzione principale quella di produrre gli anticorpi.

Linfociti T helper (CD4+): vengono indicati anche come linfociti CD3+/CD4+ perché, oltre all'antigene CD3, possiedono sulla loro superficie l'antigene CD4, che ha la proprietà di aiutare (helper) i linfociti B a produrre anticorpi.

Linfociti T citotossici (CD8+): vengono indicati anche come linfociti CD3+/CD8+ perché, oltre all'antigene CD3, presentano sulla loro superficie l'antigene CD8, e la loro funzione è quella di agire direttamente su virus, batteri o antigeni estranei all'organismo, distruggendoli con effetto citotossico.

Linfociti T regolatori (Treg): sono una sottopopolazione di linfociti T specializzati nel sopprimere l'attivazione del sistema immunitario verso auto-antigeni e quindi mantengono la tolleranza al *self*. Questo sottogruppo rappresenta circa il 10% dei linfociti T CD4+ e si caratterizza principalmente per l'espressione di CD25 (catena α del recettore dell'IL-2) e del fattore trascrizionale Foxp3. Nelle malattie autoimmuni, la carenza di linfociti Treg può consentire al

sistema immunitario di attaccare i tessuti del corpo stesso, mentre nei tumori un eccesso di attività da parte di queste cellule impedisce al sistema immunitario di distruggere le cellule tumorali.

Linfociti T della memoria effettori: sono linfociti CD3+/CD4+ oppure CD3+/CD8+ che hanno già visto un antigene e sono attivati per migrare in tessuti periferici non linfoidi per svolgere le loro attività. Sono caratterizzati dall'acquisizione dell'espressione di CD45RO e dalla perdita di espressione di CD45RA e di CCR7; pertanto, vengono indicati come CD45RO+, CD45RA- e CCR7-.

Linfociti T della memoria centrale: sono linfociti CD3+/CD4+ oppure CD3+/CD8+ che hanno già visto un antigene e continuano a ricircolare nei tessuti linfoidi, pronti per riconoscere un antigene presentato dalle cellule dendritiche. Sono caratterizzati dall'acquisizione dell'espressione di CD45RO e da quella di CCR7, mentre perdono quella di CD45RA; pertanto, vengono indicati come CD45RO+, CD45RA- e CCR7+.

Linfociti Natural Killer (CD56+): vengono identificati con la sigla CD3+/CD56+, perché, oltre all'antigene CD3, presentano sulla loro superficie l'antigene CD56, e costituiscono una sottopopolazione di linfociti in grado di produrre citochine (in particolare interferone gamma) e di sopprimere cellule infettate da virus e cellule tumorali.

L'immunoterapia: la nuova frontiera nella cura dei tumori

L'immunoterapia rappresenta la nuova frontiera della cura dei tumori e oggi dà risultati promettenti in molte neoplasie per le quali c'erano poche speranze fino a poco tempo fa. È stata definita la 'quarta gamba' del trattamento antitumorale e si tratta di un approccio terapeutico contro il cancro completamente diverso rispetto alle altre tre gambe: chirurgia, radioterapia e chemioterapia. Questa metodica, infatti, sfrutta il sistema immunitario per combattere i tumori fondamentalmente attraverso due strategie: utilizzando alcune componenti del sistema immunitario sviluppate in laboratorio, come gli anticorpi, per sconfiggere le cellule tumorali e/o stimolando il sistema immunitario stesso del paziente ad attaccare il tumore.

Nel 2013 l'immunoterapia si è guadagnata il primo posto nella top ten delle più importanti scoperte scientifiche dell'anno stilata dalla prestigiosa rivista Science, grazie ai risultati ottenuti in studi clinici, che hanno convinto anche i più scettici.

“ L'immunoterapia stata definita la 'quarta gamba' del trattamento antitumorale (dopo chirurgia, radioterapia e chemioterapia) e sfrutta il sistema immunitario per combattere i tumori. ”

Oggi, i dati più recenti riguardanti quest'approccio innovativo per combattere i tumori ne confermano l'efficacia nel lungo periodo, con un buon profilo di sicurezza e tollerabilità.

Sono attualmente allo studio diverse strategie immunoterapiche per la cura dei tumori (**tabella 1**), ma i prodotti ad oggi

Tipi di immunoterapia		Esempi
Anticorpi monoclonali	Nudi	Rituximab
	Coniugati	Ibritumomab
	Bispecifici	Blinatumomab
Inibitori dei checkpoint immunitari	Inibitori di CTLA-4	Ipilimumab
	Inibitori di PD-1 o PD-L1	Pembrolizumab (anti-PD-1); atezolizumab (anti-PD-L1)
Immunoterapia cellulare	CAR T-cells	Tisagenlecleucel; axi-cel
	TIL	
Altri tipi di immunoterapia	Vaccini terapeutici	Sipuleucel-T

Tabella 1. I principali tipi di immunoterapia.

disponibili rientrano principalmente in tre categorie:

- anticorpi monoclonali;
- inibitori dei checkpoint immunitari;
- CAR T-cells (immunoterapia cellulare).

Gli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali sono anticorpi in grado di identificare e legare specifici antigeni presenti sulla superficie delle cellule malate, incluse quelle tumorali, sviluppati in bioreattori attraverso specifici processi produttivi. Negli ultimi due decenni sono stati approvati numerosi anticorpi monoclonali che hanno dato risultati incoraggianti per il trattamento di diversi tipi di tumori. Una classificazione degli anticorpi monoclonali permette di suddividerli in:

- anticorpi monoclonali nudi;
- anticorpi monoclonali coniugati;
- anticorpi monoclonali bispecifici.

“ Gli anticorpi monoclonali sono anticorpi in grado di identificare e legare specifici antigeni presenti sulla superficie delle cellule malate, incluse quelle tumorali, sviluppati in bioreattori attraverso specifici processi produttivi. Esistono anticorpi monoclonali nudi, coniugati con molecole radioattive o tossine citotossiche e bispecifici (in grado di legarsi a due bersagli contemporaneamente). ”

Anticorpi monoclonali nudi

Gli anticorpi monoclonali nudi sono anticorpi disegnati contro una proteina specifica e ne bloccano l'interazione con il rispettivo ligando favorendo al tempo stesso il riconoscimento del complesso cellula-anticorpo da parte del sistema immunitario. Rituximab, per esempio, riconosce la proteina CD20 espressa in misura elevata sui linfociti B. L'anticorpo, una volta legato ai linfociti B, ne favorisce l'eliminazione attraverso l'attivazione della tossicità cellulo-mediata (macrofagi e cellule natural killer riconoscono attraverso il recettore FCR la coda dell'anticorpo e distruggono la cellula a cui è legato) e attraverso l'attivazione del sistema del complemento (si genera un complesso di proteine che si depositano sulla superficie del linfocita B, danneggiando la membrana e portando alla morte della cellula). Altri anticorpi monoclonali bloccano alcuni antigeni che aiutano le cellule tumorali a crescere o a diffondersi nell'organismo. Un esempio è rappresentato da trastuzumab, che si lega alla proteina HER2 presente sulla superficie delle cellule del tumore mammario o gastrico, impedendone l'attivazione.

Anticorpi monoclonali coniugati

In questo caso, gli anticorpi monoclonali sono coniugati con molecole radioattive, farmaci ad attività chemioterapica o tossine citotossiche. Questi anticorpi sono disegnati in modo da legarsi in modo selettivo alle cellule tumorali, favorendone poi la distruzione mediante gli agenti associati all'anticorpo.

Un esempio di anticorpo monoclonale legato a un composto radiomarcato è ibritumomab, anticorpo monoclonale anti-CD20, simile a rituximab, ma coniugato con tiuxetano, un agente chelante l'ittrio-90 (^{90}Y). La presenza dell'isotopo radioattivo fa sì che, una volta legata la cellula bersaglio, venga emessa una radiazione beta con una penetrazione di circa 5 mm che provoca la distruzione della cellula bersaglio e di quelle vici-

ne. Questo farmaco si utilizza per il trattamento di un tipo di linfoma non-Hodgkin (il linfoma follicolare a cellule B).

Esempi di anticorpi legati a chemioterapici sono brentuximab vedotin, nel quale l'anticorpo è coniugato con l'inibitore dei microtubuli monometilauristatina E (MMAE), e ado-trastuzumab emtansine (TDM-1), costituito dall'anticorpo trastuzumab legato covalentemente all'inibitore dei microtubuli DM1. Brentuximab vedotin, utilizzato per il trattamento del linfoma di Hodgkin e del linfoma anaplastico a grandi cellule, agisce inducendo un'apoptosi cellulare selettiva nelle cellule tumorali che esprimono l'antigene CD30. Una volta legatosi a CD30, il coniugato anticorpo-farmaco viene internalizzato nella cellula, dove l'MMAE viene rilasciata e può esercitare la sua azione citotossica, provocando l'arresto del ciclo cellulare e quindi la morte della cellula. TDM-1 è indicato per il trattamento del tumore al seno HER2-positivo inoperabile, localmente avanzato o metastatico; quando si lega al recettore HER2 sulle cellule tumorali che lo sovraesprimono, viene anch'esso internalizzato nella cellula, dove si ha il rilascio di DM1, che blocca il ciclo cellulare, provocando in ultima analisi la morte della cellula per apoptosi; a questo meccanismo d'azione si aggiunge anche quello di trastuzumab.

Anticorpi monoclonali bispecifici

Gli anticorpi monoclonali bispecifici sono costituiti da porzioni di due differenti anticorpi monoclonali e sono in grado di legarsi a due bersagli contemporaneamente. Un esempio è rappresentato da blinatumomab, approvato in Italia per il trattamento di un tipo di leucemia linfoblastica acuta. Una porzione della molecola si lega in modo specifico all'antigene CD19, espresso sulla superficie delle cellule della linea B, e un'altra all'antigene CD3, espresso sulla superficie delle cellule T. Collegando le cellule T con le cellule tumorali, il farmaco stimola il sistema immunitario a colpire queste ultime.

Gli inibitori dei checkpoint immunitari

Com'è noto, cellule che acquisiscono un fenotipo tumorale si formano continuamente nell'organismo, ma quest'ultimo riesce di norma a eliminarle, evitando che si sviluppi il tumore, grazie al fatto che vengono riconosciute come aberranti dal sistema immunitario. A volte, tuttavia, i meccanismi di difesa non funzionano e la neoplasia ha modo di formarsi e di diffondersi. Le cellule tumorali, infatti, riescono a evitare di essere distrutte, per esempio 'spegnendo' i linfociti volti a distruggerle. I linfociti T presentano sulla loro superficie alcuni recettori che, interagendo con altre molecole presenti sulle cellule bersaglio o su altre cellule del sistema immunitario, possono fungere da 'interruttori' (checkpoint immunitari): alcuni di essi li attivano, altri li inibiscono. Un aumento del segnale di attivazione aumenta l'efficacia dell'azione delle cellule T contro i tumori; viceversa, un aumento dei segnali inibitori le disattiva. È interessante notare come le cellule tumorali siano in grado di aumentare l'espressione dei segnali di inibizione, effetto che si associa alla progressione del cancro.

“ Gli inibitori dei checkpoint immunitari sono anticorpi monoclonali che colpiscono i recettori inibitori presenti sui linfociti T o i loro ligandi, espressi su altre cellule, bloccando l'attivazione del segnale inibitorio e potenziando l'attività dei linfociti T contro le cellule tumorali. ”

I principali recettori che attivano i linfociti T sono:

- CD28;
- OX40;
- 4-1BB (CD137).

I principali recettori che inibiscono i linfociti T, invece, sono:

- CTLA-4
- PD-1;
- TIM-3;
- LAG-3.

Gli inibitori (o bloccanti) dei checkpoint immunitari sono anticorpi monoclonali che colpiscono i recettori inibitori presenti sui linfociti T o i loro ligandi, espressi su altre cellule, bloccando l'attivazione del segnale inibitorio e, di fatto, potenziando l'attività dei linfociti T contro le cellule tumorali.

Gli inibitori di CTLA-4

CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), noto anche come CD152, è un recettore appartenente alla superfamiglia delle Ig espresso sui linfociti T. Questo recettore interagisce con maggiore affinità con i ligandi B7-1 (noto anche come CD80) e B7-2 (noto anche come CD86) espressi sulla superficie delle APC, rispetto al recettore CD28. Quando B7-1 o B7-2 interagiscono con CTLA-4, quest'ultimo trasmette all'interno del linfocita T un segnale di tipo inibitorio, 'limitando' la sua capacità di distruggere le cellule tumorali.

Gli inibitori di CTLA-4 sono anticorpi monoclonali che, legandosi a questo recettore, ne impediscono il legame con i ligandi presenti sulle APC; in questo modo 'tolgono il freno' ai linfociti T, che sono così liberi di proliferare e attivarsi, distruggendo le cellule neoplastiche (**figura 1**).

L'unico inibitore di CTLA-4 attualmente approvato in Italia è ipilimumab, indicato per il trattamento del melanoma e del carcinoma a cellule renali.

Gli inibitori di PD-1 e PD-L1

PD-1 (Programmed Death 1) è un recettore espresso su cellule T, cellule B, cellule NK e altre cellule del sistema immunitario, che ha come ligandi PD-L1 (espresso su molte cellule tumorali, cellule ematopoietiche e alcune altre cellule) e PD-L2 (espresso principalmente sulle cellule ematopoietiche). Il legame tra PD-1 e un suo ligando inibisce l'apoptosi delle cellule tumorali e facilita l'esaurimento delle cellule T e la conversione delle cellule T citotossiche e delle cellule T helper in cellule T regolatorie, che 'spengono' la risposta immunoinfiammatoria. Quest'interazione negativa può essere bloccata somministrando anticorpi monoclonali anti-PD-1 o anti-PD-L1. Gli inibitori di PD-1 o PD-L1 sono anticorpi monoclonali che contrastano, appunto, gli effetti inibitori immunitari innescati dal legame di PD-1 con i propri ligandi, stimolando i linfociti T ad attaccare le cellule tumorali (**figura 1**).

Attualmente, in Italia, sono disponibili sei anticorpi monoclonali appartenenti alla classe degli inibitori dei checkpoint immunitari:

- ipilimumab (anti-CTLA-4);
- nivolumab (anti PD-1);
- pembrolizumab (anti PD-1);
- atezolizumab (anti PD-L1);
- durvalumab (anti PD-L1);
- avelumab (anti PD-L1).

Nivolumab è un inibitore di PD-1 approvato ad oggi nel nostro Paese per il trattamento del melanoma, del carcinoma polmonare non a piccole cellule, del carcinoma a cellule renali, del carcinoma uroteliale, del carcinoma squamoso della testa e del collo e del linfoma di Hodgkin; pembrolizumab è un inibitore di PD-1 attualmente approvato per il trattamento del melanoma, del carcinoma polmonare non a piccole cellule, del carcinoma carcinoma uroteliale, del carcinoma squamoso

della testa e del collo e del linfoma di Hodgkin; atezolizumab è un inibitore di PD-L1 attualmente approvato per il carcinoma uroteliale, carcinoma polmonare non a piccole cellule e il carcinoma mammario triplo negativo, durvalumab è un anti PD-L1 attualmente approvato per il carcinoma polmonare non a piccole cellule, avelumab è un anti PD-L1 attualmente approvato per il carcinoma a cellule di Merkel; cemiplimab è un anti PD-1 attualmente approvato per il trattamento del carcinoma cutaneo a cellule squamose metastatico o localmente avanzato.

Nel novembre 2018, la Food and Drug Administration (Fda) ha approvato un altro inibitore di PD-1, cemiplimab, indicato per il trattamento del carcinoma cutaneo a cellule squamose metastatico o localmente avanzato.

Le CAR T-cells

Le CAR T-cells (indicate in italiano anche come cellule CAR T o, più semplicemente, CAR T), oggetto di questo quaderno speciale di PharmaStar, rappresentano una forma di immunoterapia cellulare innovativa, nella quale linfociti T prelevati da un paziente affetto da tumore (attualmente un tumore ematologico) vengono modificati geneticamente in laboratorio con tecniche di ingegneria genetica in modo tale da far loro esprimere sulla superficie cellulare un CAR (acronimo di *Chimeric Antigen Receptor*), un recettore chimerico (non esistente in natura) in grado di riconoscere uno specifico antigene espresso sulle cellule tumorali. Una volta reintrodotti nel paziente, questi linfociti T 'riprogrammati' si legano alle cellule tumorali che esprimono quel determinato antigene e, di conseguenza, si attivano e le distruggono.

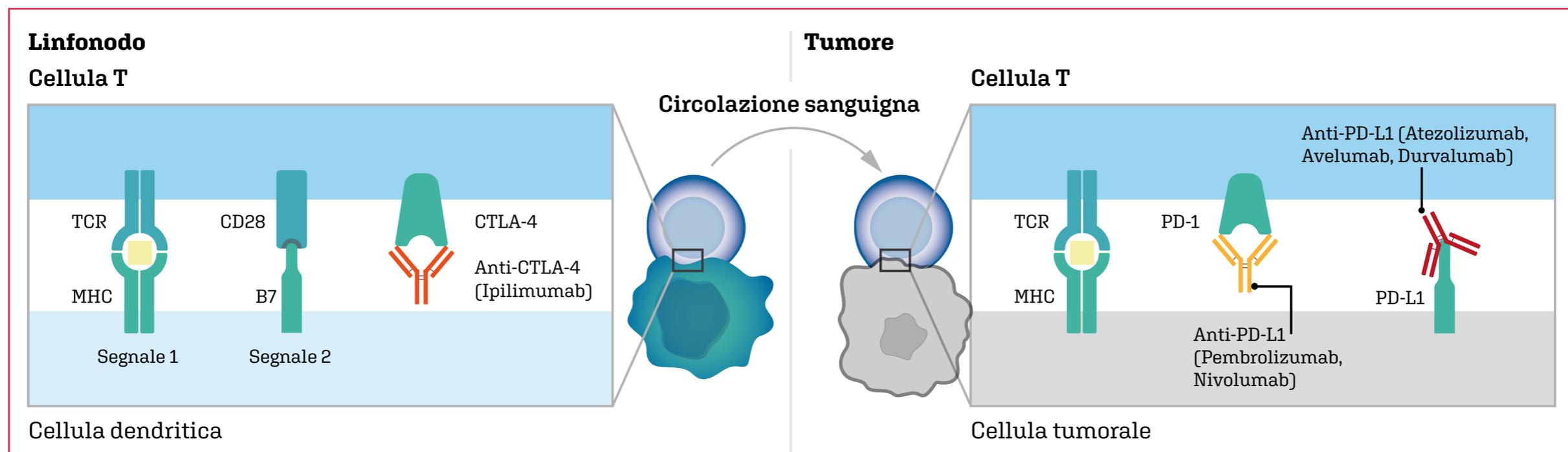


Figura 1. Meccanismo di inibizione di CTLA-4, PD-1 e PD-L1. Il recettore CTLA-4 è un regolatore negativo della co-stimolazione che è richiesta per l'attivazione di una cellula T antitumorale in un linfonodo, in seguito al riconoscimento dello specifico antigene tumorale presentato da una APC, quale una cellula dendritica. L'attivazione di CTLA-4 può essere bloccata con anticorpi anti-CTLA-4 (a destra). Una volta che le cellule T sono attivate, circolano nell'organismo fino a incontrare i loro antigeni complementari presentati dalle cellule tumorali. Una volta avvenuto il riconoscimento, l'attivazione del TCR porta all'espressione del recettore inibitorio PD-1 sulla cellula T e la produzione di interferone gamma si traduce nell'espressione del suo ligando PD-L1 sulla cellula tumorale, 'spegnendo' la risposta antitumorale della cellula T. L'interazione negativa tra PD-1 e PD-L1 può essere bloccata con anticorpi anti PD-1 o anti-PD-L1.

“ Le CAR T-cells rappresentano una forma di immunoterapia cellulare innovativa ed estremamente promettente basata sull'impiego di linfociti T modificati in laboratorio in modo da renderli capaci di riconoscere antigeni tumorali e, di conseguenza, eliminare le cellule neoplastiche che li esprimono sulla loro superficie. ”

Attualmente sono approvate dall'Fda e dalla European Medicines Agency, (Ema) due terapie basate su questo approccio, aventi entrambe come bersaglio l'antigene CD19, ampiamente espresso sulle cellule della linea B tumorali:

- **tisagenlecleucel**, attualmente indicato per il trattamento di pazienti pediatrici e giovani adulti fino a 25 anni con leucemia linfoblastica acuta a cellule B recidivata o refrattaria e per il trattamento di pazienti adulti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B recidivato o refrattario;
- **axicabtagene ciloleucel (axi-cel)**, attualmente indicato per il trattamento di pazienti adulti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B e linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B.

Il 7 agosto 2019, tisagenlecleucel ha ricevuto anche il via libera dell'Agenzia italiana del farmaco (Aifa) alla rimborsabilità da parte del Sistema sanitario nazionale (Ssn) per le due indicazioni approvate dall'Ema, diventando così la prima terapia a base di CAR T-cells disponibile nel nostro Paese. Il 12 novembre l'agenzia ha dato il suo ok anche ad axi-cel.

Un terzo prodotto a base di CAR T-cells anti-CD19, **liso-cel**, non ha ancora avuto l'autorizzazione di nessuna agenzia regolatoria, ma è in fase avanzata di sviluppo come trattamento per il linfoma non-Hodgkin e anche per la leucemia linfatica cronica. Inoltre, è in fase avanzata di sperimentazione un quarto prodotto, **ide-cel** (o bb2121), attualmente sviluppato per il trattamento del mieloma multiplo recidivato/refrattario e diretto non contro CD19, bensì un antigene bersaglio diverso, l'antigene di maturazione delle cellule B (BCMA)

Altri tipi di immunoterapia

Ad oggi sono in studio anche altri tipi di immunoterapia. Tra questi vi è una forma di immunoterapia cellulare che prevede l'impiego dei cosiddetti **linfociti infiltranti il tumore** o **TIL** (da *tumor-infiltrating lymphocytes*). Si tratta di linfociti che fisiologicamente lasciano il circolo sanguigno per migrare verso il tumore e infiltrarvi, allo scopo di uccidere le cellule tumorali. Dopo il loro prelievo, questi linfociti vengono fatti moltiplicare in laboratorio e poi reinfusi nel paziente, in modo da ottenere una risposta immunitaria potenziata contro le cellule tumorali.

I **vaccini anticancro terapeutici** sono progettati in base alle caratteristiche individuali delle cellule tumorali, così da rendere più attivo il sistema immunitario e migliorare la capacità di contrastare la malattia. Possono essere prodotti a partire da cellule tumorali morte, proteine o frammenti di proteine di cellule tumorali morte, oppure cellule del sistema immunitario. Agiscono attivando le cellule T citotossiche o inducendo la produzione di anticorpi che si legano sulla superficie delle cellule tumorali, favorendone l'eliminazione. Un esempio è rappresentato da sipuleucel-T, un vaccino terapeutico per il carcinoma prostatico preparato a partire da cellule dendritiche del paziente.

Le CAR T-cells, una storia di passione, intuito e perseveranza

La storia delle CAR T-cells, oggi considerate la terapia innovativa più promettente contro alcuni tumori ematologici, parte da lontano ed è frutto di un mix ben calibrato di intuito, passione, tanta perseveranza e anche un pizzico di fortuna. Tutto ha inizio alla fine degli anni '80, quando qualcuno comincia a pensare che sia possibile 'riprogrammare' il sistema immunitario in modo da renderlo capace di attaccare efficacemente i tumori, prelevando dal paziente le cellule T e modificandole geneticamente così da farle diventare cellule killer, capaci di riconoscere, attaccare e uccidere le cellule neoplastiche. L'idea di base, alla quale ben pochi, allora, erano disposti a dar credito, era quella di ingegnerizzare le cellule T in laboratorio, inserendovi un gene sintetico codificante per un recettore chimerico capace di riconoscere un antigene tumorale (il CAR). Le CAR T-cells risultanti, una volta reinfuse nel paziente, avrebbero ucciso qualunque cellula tumorale che presentasse quell'antigene sulla sua superficie.

Scetticismo versus perseveranza

Per quanto folle potesse sembrare, l'idea non era campata per aria, ma si basava su ricerche promettenti degli ultimi decenni. Nonostante ciò, la maggior parte degli oncologi era scettica. Quasi nessuno pensava che potesse funzionare; a crederci erano davvero in pochi, che, per fortuna, non si sono arresi davanti alle difficoltà.

In quel manipolo di visionari vi erano innanzitutto Carl June (**figura 1**), direttore del Center for Cellular Immunothera-



Figura 1. Carl June, considerato il 'padre' delle CAR T-cells.

pies presso la University of Pennsylvania (UPenn) di Philadelphia, oggi considerato un po' il 'padre' delle CAR T-cells, Steven Rosenberg, del National Cancer Institute (NCI), ma anche Michel Sadelain, del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center di New York, e Malcolm Brenner, del Baylor College of Medicine di Houston. È grazie alla perseveranza di questi ricercatori e di pochi altri che nel giro di poco più di 20 anni le CAR T-cells sono passate dall'essere quel che all'inizio sembrava, ai più, solo un sogno, a una promettente realtà clinica. Nel 2010, infatti, arrivano i primi successi, quando piccoli studi clinici iniziano a dare risultati straordinari in alcuni tumori del sangue particolarmente aggressivi.

Primi test sui pazienti con HIV

Il percorso per arrivare a questi traguardi è stato tutt'altro che facile, e non era iniziato contro il cancro. I primi test sull'uomo con le CAR T-cells risalgono alla metà degli anni '90, quando June prova a sviluppare una tecnica per stimolare la risposta immunitaria in pazienti con infezione da HIV, modificando le loro cellule T e inducendone la proliferazione *ex vivo*. Il trattamento si rivela sicuro, ma poco efficace, e quello sforzo si conclude quando arrivano in terapia i cocktail di farmaci anti-retrovirali. In seguito, tuttavia, si scoprirà che le cellule T ingegnerizzate sono sopravvissute per più di 17 anni nei pazienti.

Nel frattempo, accade qualcosa nella vita privata di June che avrà un impatto determinante anche sulla sua attività di ricercatore. Nel 1996, alla moglie 41enne viene diagnosticato un carcinoma ovarico e lo scienziato cerca inutilmente di ottenere dalle aziende farmaceutiche i mezzi necessari per tentare l'immunoterapia cellulare. Nel 2001 la donna muore e June decide allora di applicare le nuove conoscenze che stavano emergendo sul sistema immunitario allo sviluppo di terapie antitumorali, anche a costo di creare un'infrastruttura biotecnologica all'interno della sua università.

I primi tre pazienti trattati con leucemia linfatica cronica

Gli ostacoli che incontra sono formidabili e i National Institutes of Health (NIH) non gli concedono i finanziamenti per uno studio clinico. Di nuovo, però, è un evento luttuoso a far fare un passo avanti alla ricerca. Nel 2001, Barbara ed Edward Netter, dopo aver visto morire la nuora per un tumore al seno, fondano la Alliance for Cancer Gene Therapy (ACGT), con la speranza e l'obiettivo di sviluppare approcci terapeutici contro il cancro alternativi e più efficaci rispetto a quelli standard. Nel 2008, l'ACGT offre a June e al suo collega David Porter un milione di dollari, una cifra sufficiente per trattare i loro primi pazienti

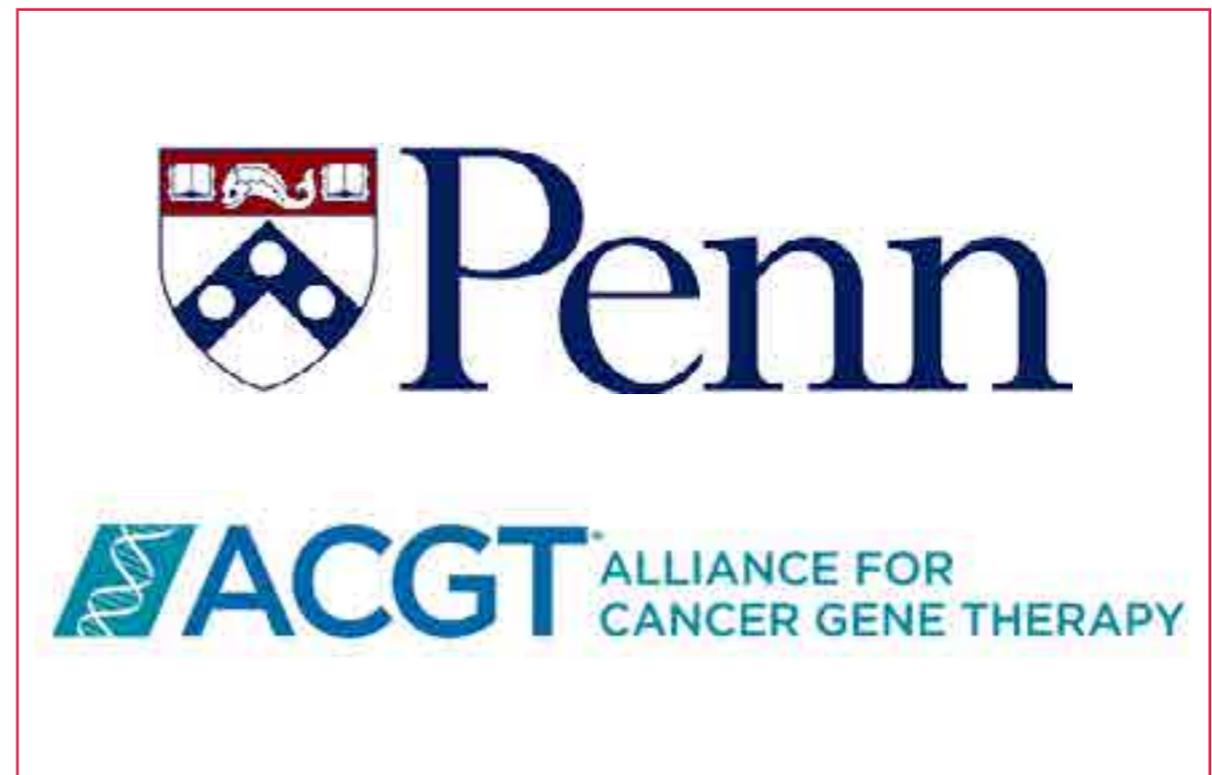


Figura 2. La University of Pennsylvania (UPenn) di Philadelphia è l'istituzione accademica dove sono stati trattati con le CAR T-cells i primi pazienti, grazie a un finanziamento della Alliance for Cancer Gene Therapy (ACGT).

– tre persone affette da leucemia linfatica cronica ricaduta – con un prodotto a base di CAR T-cells dirette contro CD19, un antigene espresso solo sulle cellule B (**figura 2**).

Due dei tre pazienti trattati raggiungono una remissione completa, ma i ricercatori finiscono i fondi e in più accade qualcosa di inaspettato, che non si era visto quando avevano testato il prodotto nel modello murino. Si accorgono che il trattamento con le CAR-T-cells ha innescato una reazione estrema del sistema immunitario – quella che oggi è nota come sindrome da rilascio di citochine (CRS) o 'tempesta citochinica' – causata da un rilascio massiccio di citochine infiammatorie da parte delle CAR-T-cells attivate.

A causa della CRS il primo paziente finisce in terapia intensiva, ma riesce a sopravvivere. Quando si sveglia dal coma, le analisi rivelano che non c'è più traccia del tumore. Se que-

sto paziente fosse morto, probabilmente la ricerca sulle CAR T-cells si sarebbe arenata e sarebbe finita con lui, ma per fortuna così non è stato. Altri pazienti, in seguito, non sono stati altrettanto fortunati e alcuni hanno sviluppato una CRS fatale, ma in seguito i medici hanno imparato a conoscere questa reazione avversa e a controllarla.

Primo esempio di “farmaco vivente”

Nel frattempo anche l'NCI inizia a interessarsi alle CAR T-cells e nel 2010 Steven Rosenberg e il suo gruppo pubblicano su *Blood* il primo case report di un paziente con linfoma follicolare avanzato trattato anch'esso con CAR T-cells dirette contro l'antigene CD19; gli autori riferiscono che dopo l'infusione la Tac ha mostrato una regressione impressionante del tumore e concludono che queste cellule ingegnerizzate rappresentano un nuovo approccio promettente per il trattamento dei tumori derivati da cellule B.

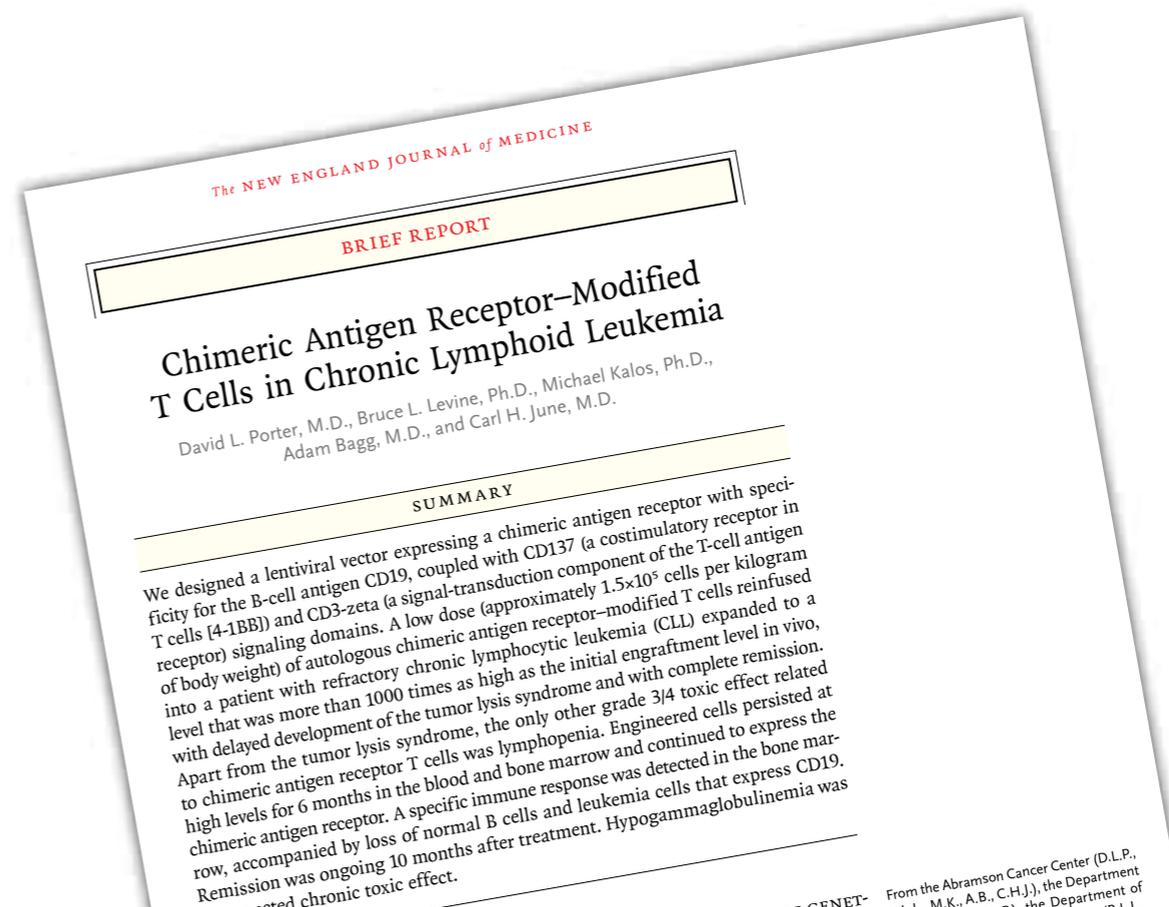
Nel 2011, June e il suo gruppo pubblicano i risultati ottenuti sui loro primi tre pazienti con leucemia linfatica cronica sul *New England Journal of Medicine* e su *Science Translational Medicine*. «È stato incredibile», ha raccontato il professore in una recente intervista, «ed è stato il primo esempio di un “farmaco vivente”, nel quale le cellule che abbiamo infuso si sono moltiplicate migliaia di volte e grazie al quale il tumore è scomparso. Il trattamento ha funzionato e abbiamo dimostrato che la nostra idea di partenza era corretta».

Da quel momento in poi cambia tutto. Subito l'NCI offre allo scienziato un nuovo finanziamento e le aziende farmaceutiche, che fino a quel momento non vi avevano investito un centesimo, iniziano a intravedere le potenzialità del nuovo approccio terapeutico. Prima fra tutte Novartis, che nell'agosto 2012 sigla uno storico accordo di collaborazione con la UPenn per sviluppare ulteriormente e commercializzare le CAR T-cel-

ls messe a punto dal team di June. Poco dopo anche Kite Pharma (ora acquisita da Gilead) e Juno (poi acquisita da Celgene, a sua volta acquisita da Bristol-Myers Squibb) si buttano nella corsa allo sviluppo di nuove CAR T-cells, poi seguite da molte altre aziende, piccole e grandi.

Entrano in gioco anche le aziende

Nel 2016 sono già in corso diversi studi sufficientemente ampi nei quali si testano diversi prodotti a base di CAR T-cells in numerosi centri oncologici, e iniziano ad accumularsi prove sostanziali per i prodotti di Novartis e Kite Pharma/Gilead, che sono state le prime (e per ora uniche) aziende ad aver visto approvate le loro CAR T-cells (rispettivamente tisagenlecleucel e axi-cel) dalle agenzie regolatorie. Nel caso di Novartis, «i dati clinici erano così convincenti, che l'unica cosa che la Food and Drug Administration ha davvero chiesto all'azienda era di dimostrare la riproducibilità dei risultati ottenuti alla UPenn e al Children's Hospital of Pennsylvania» ha spiegato June.



Il Children's Hospital of Pennsylvania (CHOP) è il centro dove nell'aprile 2012 Stephen Grupp e i suoi collaboratori hanno trattato con le CAR T-cells sviluppate da June la prima paziente pediatrica affetta da leucemia linfoblastica acuta, Emily Whitehead. La cura ha funzionato e oggi, a più di 7 anni di distanza, Emily non solo è viva, ma è tuttora in remissione ed è un'adolescente come tante, che conduce una vita pressoché normale.

Nell'agosto 2017, l'Fda, in anticipo di un mese sui tempi, annuncia il suo via libera a tisagenlecleucel per i pazienti pediatrici e giovani adulti (fino a 25 anni) affetti da leucemia linfoblastica acuta a cellule B ricaduta o refrattaria. È il primo prodotto a base di CAR T-cells ad essere autorizzato da un'agenzia regolatoria ed è esattamente lo stesso messo a punto nel laboratorio di June, a partire dal 2004. «Si è realizzato il sogno di una vita» commenta il ricercatore quando riceve la notizia. Due mesi più tardi, l'agenzia statunitense approva un secondo prodotto a base di CAR T-cells, axi-cell, messo a punto inizialmente da Kite, per il trattamento dei pazienti adulti con linfoma a grandi

cellule B refrattario o recidivato dopo due o più linee di terapia sistemica. Nell'agosto 2018 anche l'EmA concede il suo ok ai due prodotti. Nella **figura 3** sono delineate le tappe più importanti della storia delle CAR T-cells.

Più di 100 laboratori al lavoro e tante sorprese ancora in serbo

Oggi ci sono più di 100 aziende e laboratori in tutto il mondo, Italia compresa, che stanno lavorando alacremente per sviluppare CAR T-cells di nuova generazione per svariate indicazioni e queste cellule ingegnerizzate non cessano di stupire. Nel maggio 2018, per esempio, June e i suoi colleghi hanno pubblicato su Nature un articolo su un paziente con leucemia linfatica cronica che dopo 5 anni dal trattamento era ancora vivo e senza segni di malattia. Sorprendentemente, l'analisi genetica ha evidenziato che, nel momento di picco della risposta, il 94% delle cellule che hanno indotto la remissione era originato da un singolo clone. «È una scoperta davvero notevole, perché in

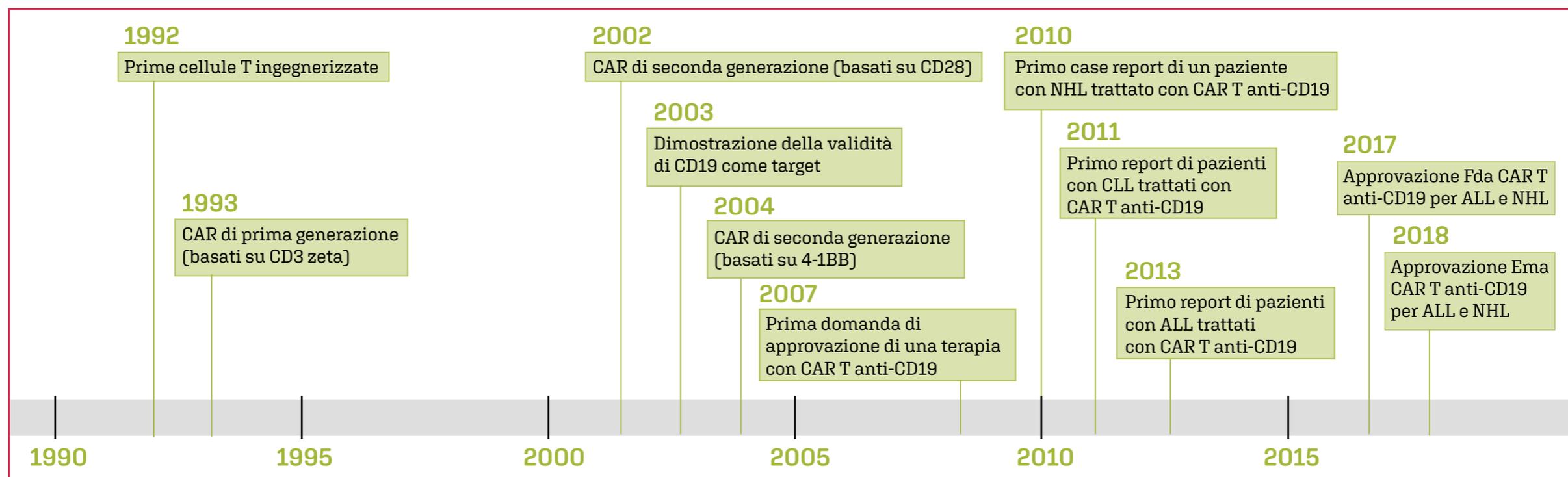


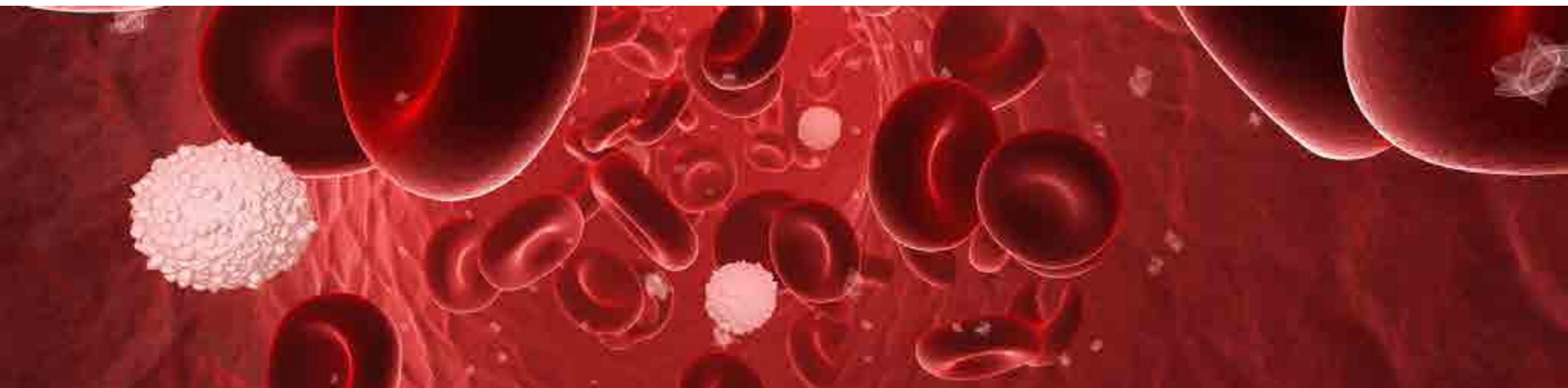
Figura 3. Le tappe più importanti della storia delle CAR T-cells. NHL: linfoma non-Hodgkin; CLL: leucemia linfatica cronica; ALL: leucemia linfoblastica acuta.

sostanza ci dice che la dose minima necessaria perché le CAR T-cells funzionino è di una sola cellula, nei confronti della quale il paziente funge fundamentalmente da bioreattore» ha commentato June.

Al di là di questo, ci sono ancora molte cose da scoprire. I filoni di ricerca da esplorare e approfondire sono tanti, e su vari fronti. Innanzitutto, bisognerà capire perché alcuni pazienti non rispondono al trattamento e perché alcuni vadano incontro a ricadute, ma anche caratterizzare meglio le tossicità. Sarà fondamentale, poi, ottimizzare ulteriormente il disegno dei CAR, in modo da aumentare l'espansione, l'attivazione e la persistenza delle cellule ingegnerizzate nell'organismo del paziente, così come identificare nuovi antigeni bersaglio oltre al CD19, per estendere le potenziali indicazioni delle CAR T-cells, e migliorare il processo produttivo, cercando soprattutto di ridurre i tempi, per ampliare la disponibilità della terapia.

Bibliografia

- [1] J.N. Kochenderfer, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*. 2010 Nov 18; 116(20): 4099-102; doi: 10.1182/blood-2010-04-281931.
- [2] D.L. Porter, et al. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365:725-733; doi 10.1056/NEJMoa1103849.
- [3] J.A. Fraietta, et al. Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature* 2018; 558:307-12; doi:10.1038/s41586-018-0178-z.



La storia di Emily, la prima bambina trattata con le CAR T-cells

Emily Whitehead: è un nome sconosciuto ai più, ma arcinoto fra tutti coloro – medici, pazienti, familiari – che a vario titolo combattono contro una leucemia. Emily, Emma per gli amici e i genitori, infatti non è una bambina qualunque: è la prima paziente pediatrica ad essere stata trattata con le CAR T-cells, nell'aprile 2012, quando era ritenuta una malata terminale e i medici le davano solo poche settimane o, al massimo, qualche mese di vita, a causa di una forma aggressiva di leucemia linfoblastica acuta.

Il 2 maggio 2019 Emily ha festeggiato il suo quattordicesimo compleanno e oggi, a più di 7 anni di distanza dal trattamento, è viva e tuttora in remissione. La si può considerare guarita? Al momento non si può esserne certi al 100%, ma certamente, ora che le CAR T-cells con cui è stata trattata (tisagenlecleucel) sono state approvate sia dall'Fda sia dall'Ema, lei rappresenta un'icona dell'efficacia di questa forma di immunoterapia cellulare ed è un'ottima testimonial per le migliaia di bambini leucemici che potranno accedere a questo trattamento innovativo.

Un caso di leucemia linfoblastica acuta molto aggressivo

Aveva solo 5 anni, Emily, quando un giorno la madre si accorse che aveva le gambe piene di lividi. Da un po' di tempo la bambina diceva che a volte le facevano male, ma i genitori pensavano che si trattasse di normali dolori della crescita. A un certo punto iniziarono a sanguinarle le gengive e una notte si svegliò con dolori atroci proprio alle gambe. Chiaramente, c'e-



Per gentile concessione della Emily Whitehead Foundation

ra qualcosa che non andava e, poco tempo dopo, la diagnosi: leucemia linfoblastica acuta.

Al momento attuale, questa forma di leucemia è ritenuta dagli ematologi la più trattabile fra le leucemie pediatriche. Oggi, infatti, l'85-90% dei pazienti trattati con la chemioterapia sopravvive alla malattia e conduce una vita normale. Ma il caso di Emily non rientrava in quella percentuale.

Per due volte i medici tentarono di curarla con la chemio e per due volte la bambina ebbe una recidiva. La prima nell'ottobre 2011, quando combatteva contro la malattia già da più di un anno; la seconda solo 4 mesi dopo, durante il secondo ciclo di chemioterapia. Per un momento si pensò di poterla sottoporre al trapianto di cellule staminali, che era stato programmato per il febbraio 2012, ma all'ultimo questa strada si rivelò impraticabile. I medici che l'avevano in cura non avevano più frecce al loro arco e avevano praticamente gettato la spugna. Intanto il tumore continuava a crescere e a propagarsi.

Sistema immunitario riprogrammato e 'addestrato' per riconoscere e uccidere le cellule leucemiche

Disperati, Tom e Kari, i genitori di Emily, decisero di rivolgersi al Children's Hospital of Philadelphia (CHOP), dove stava prendendo il via uno studio di fase 1 che prevedeva l'utilizzo di un'immunoterapia cellulare per i bambini affetti da leucemia. Questa forma di immunoterapia consisteva, appunto, nella somministrazione di CAR T-cells, una tecnica messa a punto da Carl June, direttore del Parker Institute Center for Immunotherapy presso l'Abramson Cancer Center dell'Università della Pennsylvania.

Si trattava di un approccio rischioso, e in pochi, all'epoca, erano disposti a credere che il sistema immunitario potesse essere ri-



Per gentile concessione della Emily Whitehead Foundation

programmato e 'addestrato' in modo da attaccare e combattere il tumore. Le intuizioni di June, oggi considerato a buon diritto il padre delle CAR T-cells, si sono, invece, rivelate corrette.

Gli studi su modelli murini e perfino trial preliminari su pazienti adulti con leucemia linfatica cronica avevano evidenziato grosse potenzialità per quest'approccio rivoluzionario ed Emily è stata la prima bambina ad essere trattata con questa tecnica sperimentale, nell'ambito di uno studio coordinato da Stephan Grupp.

Per preparare le CAR T-cells ci sono volute 6 settimane. I ricercatori hanno prima estratto le cellule T dal sangue della paziente, le hanno quindi modificate geneticamente in laboratorio in modo da far loro esprimere un CAR in grado di riconoscere l'antigene CD19 e renderle capaci di uccidere queste cellule. Una volta fatte moltiplicare in coltura, le cellule T così



‘riprogrammate’, divenute CAR T- cells, erano pronte per essere reimmesse nel corpo di Emily, che il 17 aprile 2012 è stata sottoposta alla prima infusione.

Una CRS quasi fatale

Il trattamento non è stato una passeggiata e ha provocato gravi effetti collaterali. Dopo la terza infusione delle CAR T-cells, la bambina ha iniziato ad avere febbre molto alta (40,5 °C), ipotensione e difficoltà respiratorie, dovute a un edema polmonare. Il quadro clinico era così grave che i medici hanno dovuto intubarla e indurle il coma farmacologico.

Come poi altri pazienti trattati con le CAR T-cells dopo di lei, Emily ha avuto una sindrome da rilascio di citochine (CRS), una complicanza potenzialmente molto grave e oggi ben nota di questa terapia, legata alla sovrastimolazione del sistema immunitario del paziente, prodotta dal trattamento.

Da un lato, era un segno che il sistema immunitario della bambina stava rispondendo alla terapia, anche se non unicamente in una direzione favorevole. La sindrome, tuttavia, può rivelarsi fatale se non è gestita in modo appropriato e l’organismo non riesce a contrastarla.

Via via che i giorni passavano, Emily non migliorava e le sue chance di sopravvivenza diminuivano. Per cercare di salvarla, dopo un tentativo infruttuoso con gli steroidi, e dopo aver notato nelle analisi del sangue un aumento spropositato dell’interleuchina-6 (IL-6), una citochina infiammatoria, i medici hanno provato a trattarla con un farmaco allora indicato per l’artrite reumatoide, l’anticorpo monoclonale tocilizumab, che ha come bersaglio proprio l’IL-6. Il farmaco non era mai stato usato prima di allora nei pazienti oncologici, ma il tentativo ha funzionato. La bambina ha passato la notte più critica, ha iniziato a stabilizzarsi e una settimana dopo, il giorno del suo settimo compleanno, il 2 maggio, si è risvegliata dal coma.

Remissione completa poco dopo il trattamento e ancora oggi, dopo oltre 7 anni

Gli esami successivi hanno lasciato tutti a bocca aperta. Tre settimane dopo il trattamento, Emily aveva risposto in modo completo. La leucemia era scomparsa e le CAR T-cells che le erano state somministrate erano ancora lì, nel suo organismo, pronte ad attaccare nuovamente il tumore, nel caso si fosse ripresentato.

Anno dopo anno, a ogni controllo, Emily è risultata sempre in remissione e oggi è un’adolescente come tante altre, che fa una vita pressoché normale. Ogni 2 settimane si sottopone a infusioni di immunoglobuline, in quanto le CAR T-cells distruggono in una certa misura anche le cellule B sane, oltre a quelle tumorali, ma sostanzialmente sta bene.

Per aiutare gli altri pazienti affetti da neoplasie pediatriche e le loro famiglie, i suoi genitori hanno dato vita alla Emily Whitehead Foundation, impegnata attivamente su vari fronti, tra cui la raccolta di fondi da destinare alla ricerca sull'immunoterapia per i tumori pediatrici. Nel 2016, la fondazione ha donato 100mila dollari all'Immunotherapy Research Program del CHOP e il 17 aprile 2018 ha consegnato a Grupp, il medico che ha salvato la vita a Emily, un altro assegno di 250mila dollari per finanziare il programma.

Tom Whitehead, con al fianco la figlia, ha anche partecipato il 12 luglio 2017 alla discussione dell'Oncologic Drugs Advisory Committee dell'Fda, riunito per decidere se approvare o meno tisagenlecleucel, portando la sua testimonianza sull'efficacia del trattamento. Il mese successivo, l'agenzia ha dato il suo via libera definitivo all'impiego di tisagenlecleucel per il trattamento di bambini e giovani adulti fino a 25 anni affetti da leucemia linfoblastica acuta recidivata o refrattaria ad altri trattamenti.



CAR T-CELLS: CHE COSA SONO E COME FUNZIONANO

Che cosa sono le CAR T-cells?

Come è fatto un CAR?

Come agiscono le CAR T-cells?

Come si producono le CAR T-cells?

Il futuro delle CAR T-cells

La nuova frontiera delle terapie con CAR T-cells: le CAR T allogeniche



Iscriviti alla newsletter
di PharmaStar

PHARMASTAR[★]
il Giornale online sui Farmaci



INTRODUZIONE

LE CAR T-CELLS

APPLICAZIONI CLINICHE

CAR T-CELLS 'INDUSTRIALI'

RICERCA ITALIANA

38

Che cosa sono le CAR T-cells?

Le CAR T-cells (in italiano chiamate anche cellule CAR T o, più semplicemente, CAR T) sono una forma di immunoterapia cellulare sviluppata per il trattamento di alcuni tumori e sono state definite il primo 'farmaco vivente': infatti, rappresentano a tutti gli effetti un farmaco biologico costituito da cellule del sistema immunitario, le cellule (linfociti) T, vive e modificate geneticamente in laboratorio al fine di potenziare le loro capacità di riconoscimento ed eliminazione delle cellule tumorali. L'idea alla base dello sviluppo di questa terapia è stata quella di sfruttare direttamente il sistema immunitario e quindi le risorse stesse dell'organismo, adeguatamente rafforzate attraverso la manipolazione delle cellule T, per combattere un tumore 'dall'interno'.

L'acronimo CAR deriva dall'espressione inglese *Chimeric Antigen Receptor* (letteralmente, recettore chimerico di un antigene) che indica come le cellule T siano state modificate *ex vivo* con tecniche di ingegneria genetica in modo da far loro esprimere un recettore chimerico, il CAR appunto, in grado di legarsi a un antigene espresso sulle cellule tumorali: un recettore non presente in natura, prodotto dalla cellula T a partire da un gene sintetico costruito in laboratorio e inserito nella cellula stessa, capace di riconoscere le cellule tumorali grazie all'antigene espresso sulla superficie di queste ultime e legarvi.

Una volta ingegnerizzate, queste cellule T vengono infuse nel paziente, dove possono esercitare la loro attività terapeutica legandosi grazie al CAR alle cellule tumorali e, di conseguenza, eliminandole (**figura 1**).

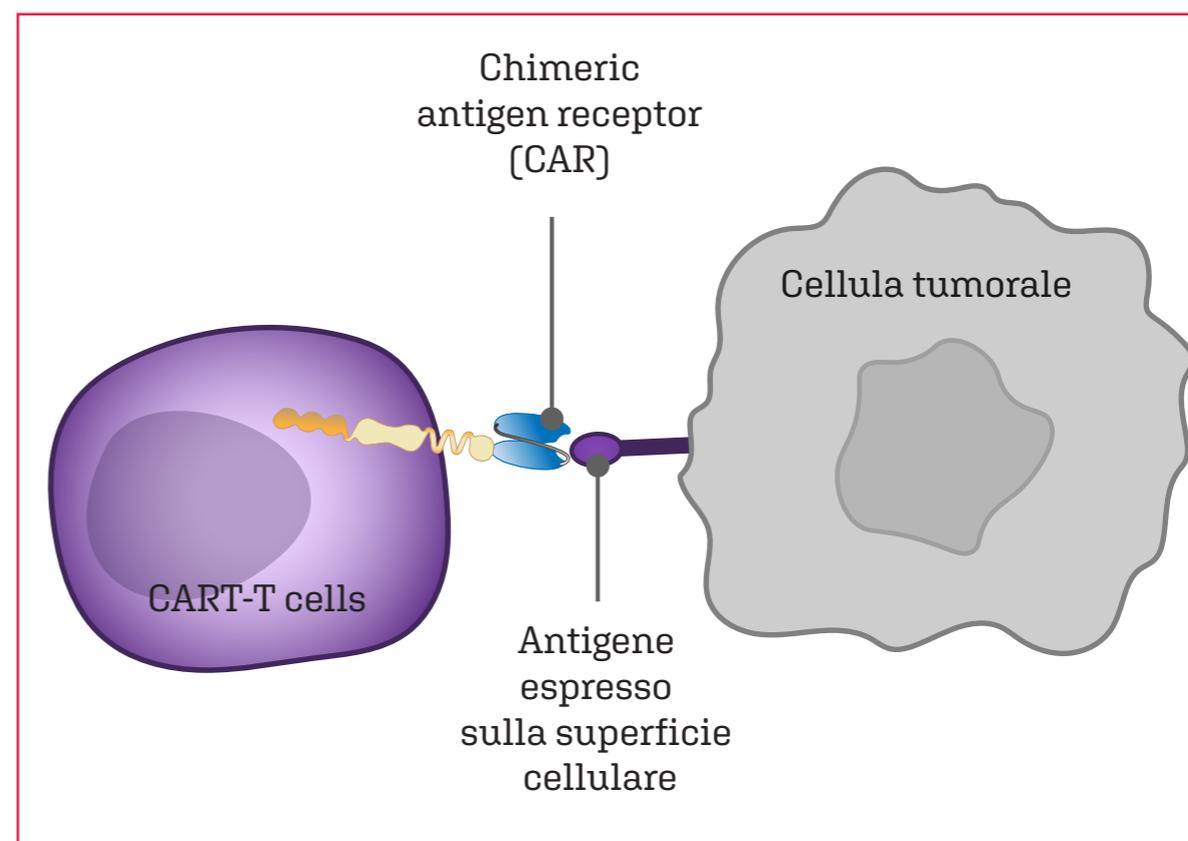


Figura 1. Le CAR T-cells sono in grado di riconoscere gli antigeni espressi sulla superficie delle cellule tumorali e legarsi ad esse grazie al CAR che sporge sulla loro superficie.

Questo approccio terapeutico innovativo presenta, dunque, tre caratteristiche fondamentali:

- 1) utilizzo delle cellule T prelevate (attualmente) da un paziente affetto da un tumore (l'origine autologa delle cellule T riduce la possibilità che siano riconosciute come *not self* e quindi rigettate, una volta reinfuse nel paziente);
- 2) introduzione nelle cellule T del gene di un recettore sintetico, il CAR, disegnato in modo da riconoscere in modo specifico un antigene espresso sulle cellule tumorali;

3) capacità della cellula T che esprime il CAR, una volta riconosciuto e legato l'antigene bersaglio, di attivarsi e indurre la distruzione della cellula tumorale.

La manipolazione delle cellule T con l'aggiunta del gene del CAR ha l'obiettivo ultimo di potenziare la risposta del sistema immunitario dello stesso paziente in modo selettivo verso gli antigeni espressi dalle cellule tumorali, evitando così che siano attaccate le cellule sane.

Il CAR

Il fulcro della novità rappresentata da questo nuovo approccio terapeutico, che è una forma di immunoterapia cellulare, è rappresentato proprio dal CAR. Questo recettore chimerico è costituito fondamentalmente da una porzione extracellulare (dominio di riconoscimento) di un anticorpo IgG, in particolare un frammento a catena singola della regione variabile (scFv), responsabile della specificità verso la cellula tumorale poiché disegnata in modo da riconoscere antigeni associati al tumore (TAA, *Tumor Associated Antigen*), alla quale è accoppiata una porzione del recettore coinvolto nell'attivazione delle cellule T, il TCR, che media l'attivazione e la proliferazione delle cellule T una volta che hanno preso contatto con la cellula tumorale (figura 2).

L'antigene bersaglio

Nella progettazione di un CAR, la scelta dell'antigene bersaglio del dominio di riconoscimento riveste un ruolo cruciale per il successo della terapia con le CAR T-cells.

Il primo antigene utilizzato come bersaglio nella progettazione dei CAR è stato il CD19, che ha rappresentato un primo target ideale in quanto è una proteina altamente espressa dalla maggior parte delle cellule B maligne presenti nei tumori ematologici e la sua espressione è limitata alle cellule della linea

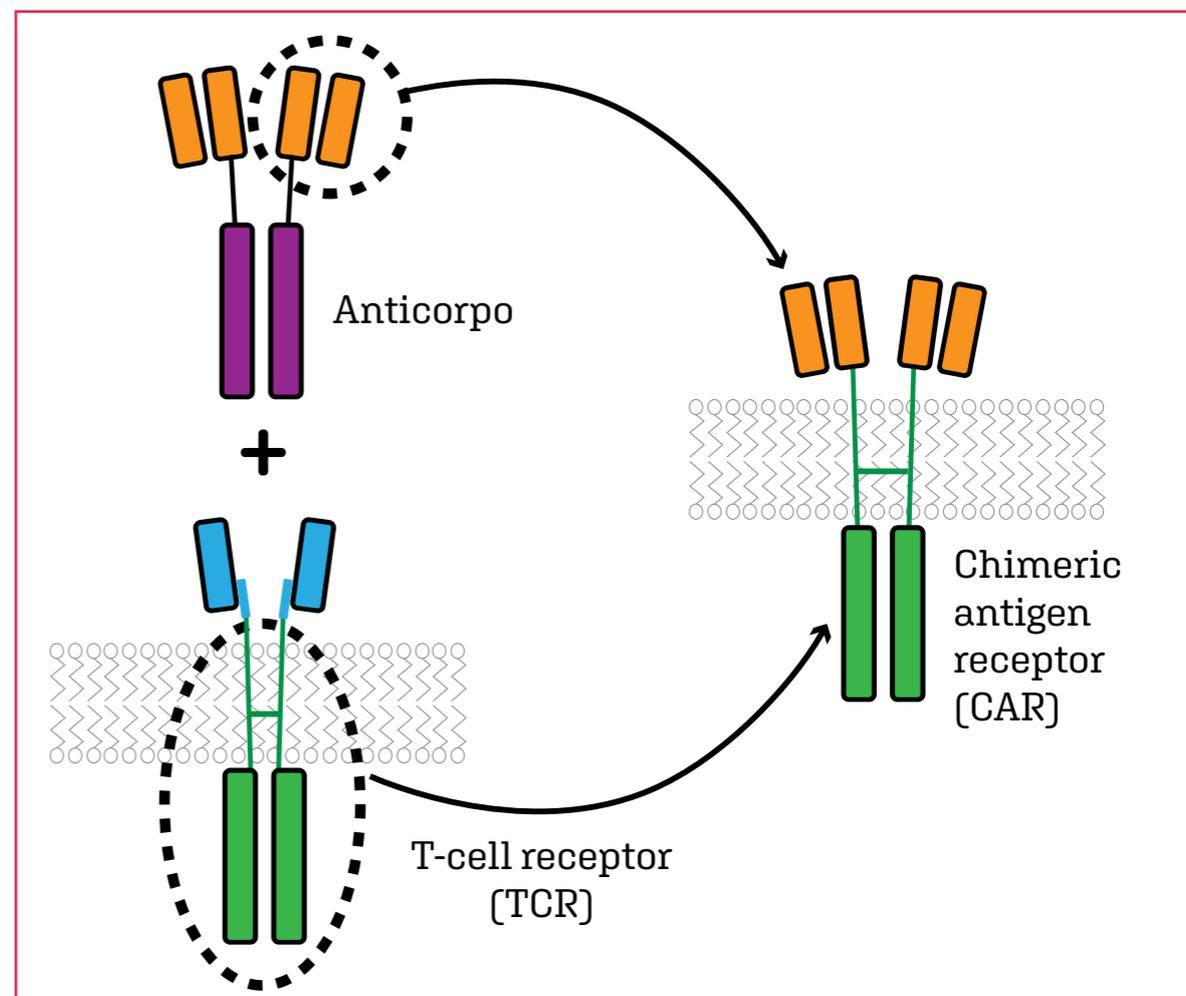


Figura 2. Rappresentazione schematica di un CAR. I CAR sono proteine chimeriche costituite dalla fusione di una porzione del recettore dei linfociti T (TCR) con la porzione variabile di un anticorpo, che gli conferisce la capacità di legarsi in modo specifico a un antigene. Questa struttura combina, quindi, le caratteristiche di legame degli anticorpi con la funzione di attivazione della cascata intracellulare del TCR.

B, mentre non è presente sulle cellule staminali emopoietiche pluripotenti né nella maggior parte degli altri tessuti normali.

L'identificazione di un target che sia selettivo rappresenta uno degli aspetti più importanti ai fini degli outcome del trattamento con le CAR T-cells. La capacità di riconoscere in modo specifico antigeni espressi sulle cellule tumorali è una caratteristica essenziale per l'attività delle CAR T-cells; per questo motivo, negli ultimi anni sono stati avviati numerosi studi volti a identificare antigeni specifici alternativi all'antigene CD19 sia per diverse tipologie di tumori solidi, sia per tumo-

ri ematologici caratterizzati da un'espressione limitata o nulla del CD19 sulla superficie delle cellule neoplastiche. Dal 2012 a oggi si è assistito a un aumento esponenziale dei trial clinici sulle CAR T-cells e in parallelo è aumentato il numero di possibili antigeni bersaglio testati (**figura 3**), a testimonianza dell'enorme interesse verso questa forma di immunoterapia rivoluzionaria.

Le CAR T-cells rappresentano, infatti, una delle forme di immunoterapia cellulare più promettenti e innovative, in grado di affiancare gli altri approcci di immunoterapia, per esempio gli inibitori dei checkpoint immunitari, per il trattamento di alcuni tumori, quali, al momento, la leucemia linfoblastica acuta a cellule B e alcuni tipi di linfoma non-Hodgkin, primo fra tutti il linfoma diffuso a grandi cellule B. Tuttavia, è bene sottolineare che, per ora almeno, non tutti i pazienti affetti da tali tumori possono essere sottoposti a questo trattamento. Attualmente, infatti, il trattamento con CAR T-cells aventi come bersaglio l'antigene CD19, due delle quali sono state già autorizzate dalle agenzie regolatorie statunitense ed europea, Fda ed Ema, e una approvata anche in Italia dall'Aifa, è riservato esclusivamente ai soggetti che sono risultati refrattari o hanno recidivato dopo essere già stati sottoposti ad almeno due linee di terapia, cioè pazienti già trattati più volte e che hanno poche altre opzioni a disposizione.

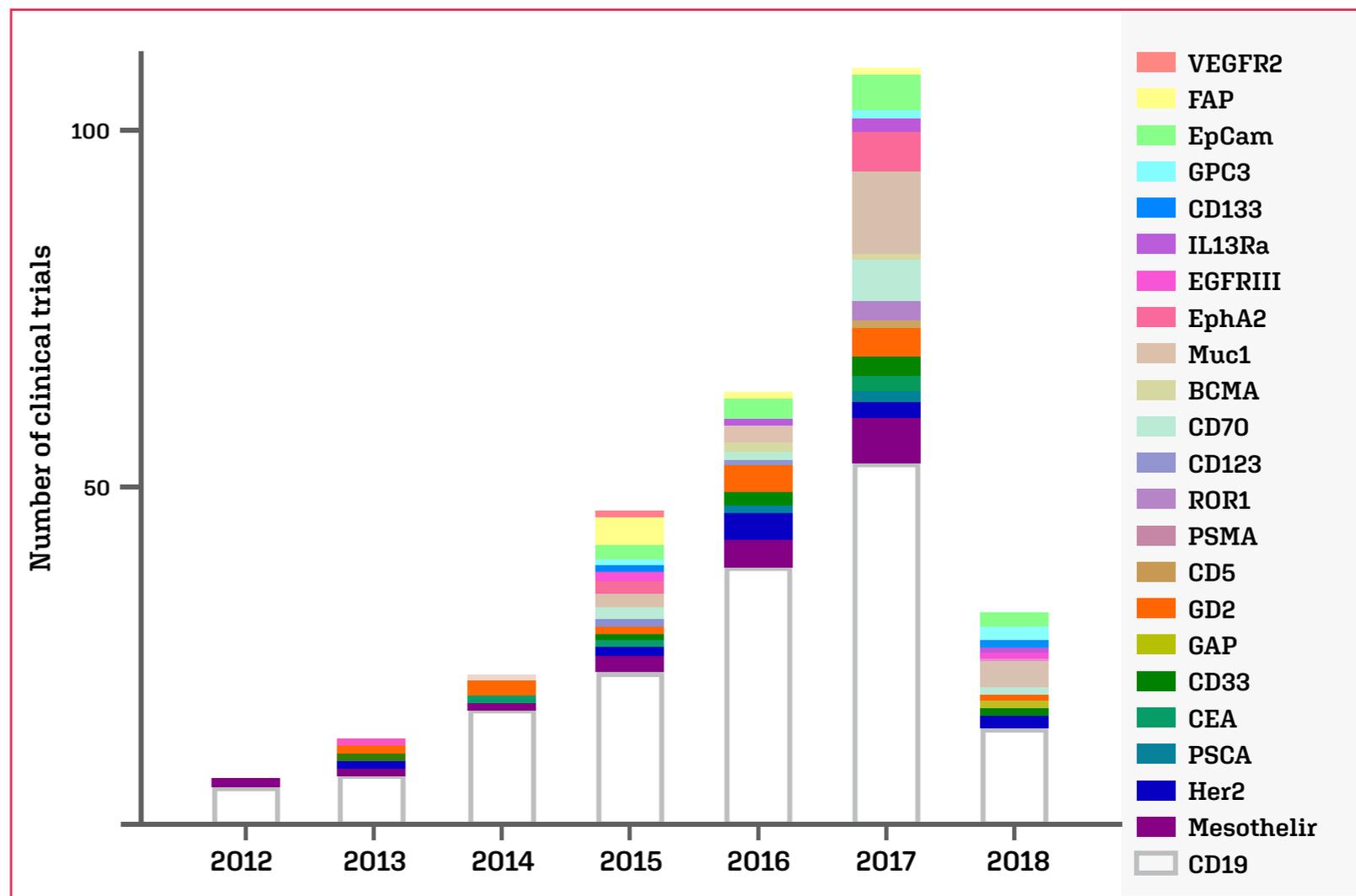


Figura 3. Numero dei trial clinici avviati su CAR T-cells dal 2012 al 2018. Il numero di tali studi è aumentato esponenzialmente dal 2012 a oggi, così come quello degli antigeni target in fase di valutazione.

Due CAR T-cells già approvate

Grazie ai risultati sorprendenti ottenuti in alcuni studi, l'Fda e l'Ema hanno già approvato due terapie a base di CAR T-cells dirette contro l'antigene CD19: tisagenlecleucel (sviluppata da Novartis e commercializzata con il marchio Kymriah), e axicabtagene ciloleucel (axi-cel, sviluppata da Kite Pharma/Gilead e commercializzata con il marchio Yescarta) (**figura 4**).

La terapia con tisagenlecleucel è stata approvata nell'agosto 2017 dall'Fda per il trattamento di pazienti fino ai 25 anni di

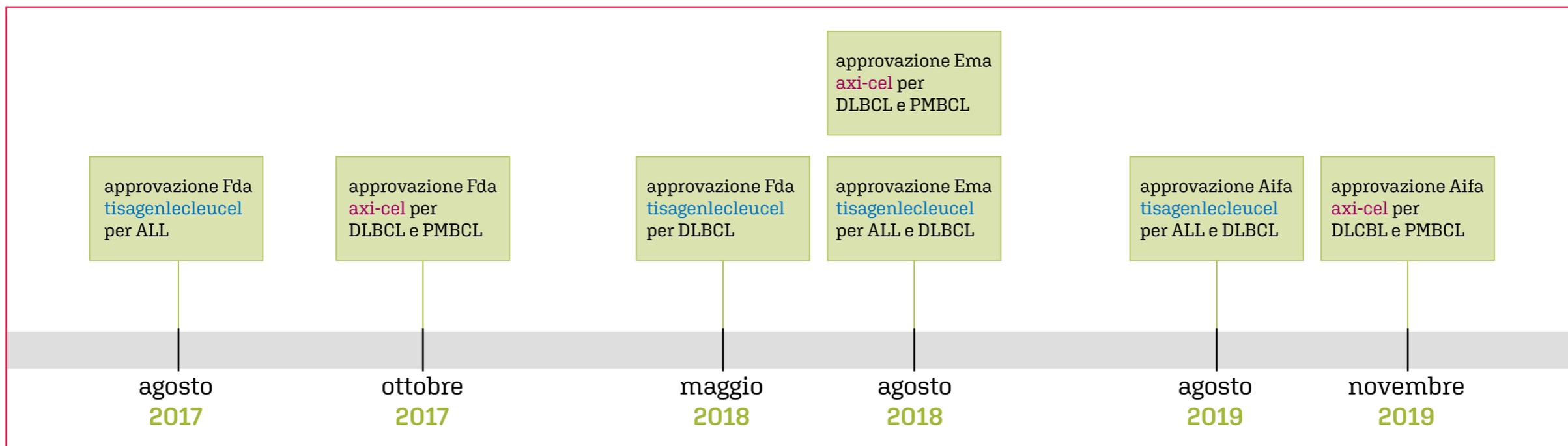


Figura 4. Timeline delle approvazioni di tisagenlecleucel e axi-cel da parte di Fda, Ema e Aifa. ALL: leucemia linfoblastica acuta; DLBCL: linfoma diffuso a grandi cellule B; PMBCL: linfoma primitivo del mediastino a cellule B.

età affetti da leucemia linfoblastica acuta a cellule B refrattari o in ricaduta, la prima terapia in assoluto a base di CAR T-cells a ricevere l'autorizzazione di un'agenzia regolatoria. Nel maggio 2018 l'Fda ha dato il suo via libera al prodotto anche per il trattamento di pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B recidivato o refrattario. Successivamente, nell'agosto 2018, è arrivata anche la registrazione dell'Ema per entrambe le indicazioni. Il 7 agosto 2019, il prodotto ha ricevuto anche l'autorizzazione dell'Aifa ed è quindi disponibile per i pazienti italiani candidabili a questo trattamento.

La terapia con axi-cel è stata approvata per la prima volta dall'Fda nell'ottobre 2017 e a seguire dall'Ema nell'agosto 2018, in entrambi i casi per il trattamento di pazienti adulti con linfoma

diffuso a grandi cellule B o linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B refrattari o recidivanti dopo due o più linee di terapia sistemica. L'approvazione dell'agenzia Usa comprende anche il trattamento del linfoma a cellule B di alto grado e del linfoma diffuso a grandi cellule B derivante da un linfoma follicolare. In Italia il prodotto è stato autorizzato dall'Aifa nel novembre 2019 secondo le indicazioni approvate dall'Ema ed è quindi ora disponibile anche per i pazienti italiani.

Sia tisagenlecleucel sia axi-cel prevedono l'utilizzo di cellule T autologhe, cioè isolate dallo stesso paziente tramite una procedura di leucoaferesi, successivamente espanse *in vitro* e ingegnerizzate in modo da far produrre loro il CAR di interesse e, infine, reinfuse nel paziente.

Bibliografia

- [1] C.H. June, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer. Science 2018;359(6382):1361-5; doi:10.1126/science.aar6711.
- [2] FDA approval brings first gene therapy to the United States. U.S. Food Drugs Adm. (2017). <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approval-brings-first-gene-therapy-united-states> [ultimo accesso: 11-2019].
- [3] FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma. U.S. Food Drugs Adm. 2017. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-car-t-cell-therapy-treat-adults-certain-types-large-b-cell-lymphoma> [ultimo accesso: 11-2019].
- [4] FDA Approves Second CAR T-cell Therapy. Cancer Discov.;8(1):5-6. doi: 10.1158/2159-8290.CD-NB2017-155.
- [5] First two CAR-T cell medicines recommended for approval in the European Union. European Medicines Agency. 2017. https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/first-two-car-t-cell-medicines-recommended-approval-european-union_en.pdf [ultimo accesso: 11-2019].



Come è fatto un CAR?

Il primo CAR è stato ideato nel 1993, dal professor Zelig Eshhar e i suoi collaboratori, del Weizmann Institute of Science, in Israele, che hanno proposto di combinare in un unico recettore ibrido il dominio di legame con l'antigene di un anticorpo, sotto forma di frammento a catena singola della regione variabile di un anticorpo (scFv), con gli elementi di segnalazione associati al recettore delle cellule T (TCR), capaci di innescare l'attivazione delle cellule T stesse in seguito al legame del recettore con l'antigene bersaglio; inserendo il gene di un CAR in una cellula T, si è così ottenuta una cellula che esprimeva il CAR sulla sua superficie, dotata quindi di una specificità tipica degli anticorpi, ma anche del complesso di trasduzione del segnale di un TCR, responsabile della sua attivazione e dell'esecuzione della sua funzione effettrice.

Dal punto di vista strutturale, un CAR è costituito fondamentalmente da una porzione extracellulare (ectodominio), una porzione intracellulare (endodominio) e un dominio transmembrana, che funge da collegamento (**figura 1**); la porzione extracellulare è formata da un dominio di riconoscimento, capace di riconoscere in modo specifico antigeni tumorali, collegato a una regione chiamata spacer, a sua volta unita generalmente a una regione cerniera (*hinge region*) di collegamento tra il dominio extracellulare il dominio transmembrana; quest'ultimo è collegato al dominio intracellulare, contenente la porzione del TCR responsabile dell'attivazione della cellula T a seguito del suo legame con l'antigene bersaglio espresso sulla cellula tumorale (dominio di attivazione o di segnalazione).

Il dominio extracellulare deriva generalmente da un scFv di un anticorpo monoclonale murino, umanizzato o umano, in grado di riconoscere antigeni espressi sulle cellule tumorali.

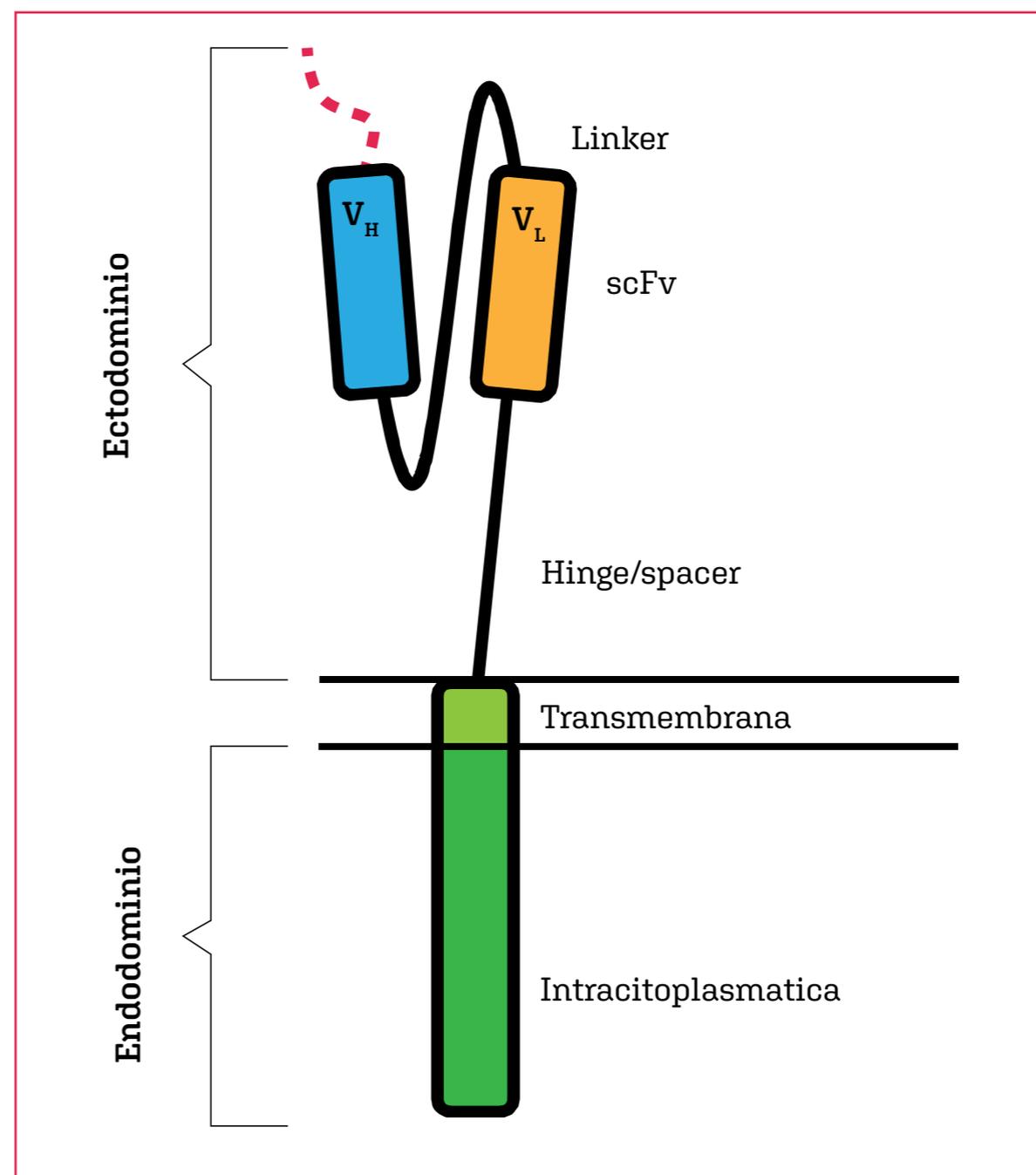


Figura 1. Struttura del CAR. Il CAR è costituito da tre regioni principali: l'ectodominio, il dominio transmembrana e l'endodominio. L'ectodominio è la porzione extracellulare responsabile del riconoscimento dell'antigene, mentre l'endodominio è la porzione intracellulare responsabile dell'innescò di vie di segnalazione intracellulari che attivano la cellula T una volta che si è legata all'antigene attraverso il dominio di riconoscimento. L'ectodominio e l'endodominio sono connessi da un dominio transmembrana.

Utilizzando una porzione di anticorpo per tale riconoscimento, i CAR presenti nelle CAR T-cells, a differenza dei normali TCR, possono riconoscere le cellule bersaglio indipendentemente dalla presentazione dell'antigene da parte dell'MHC. Di conseguenza, le CAR T-cells possono riconoscere cellule bersaglio che presentano una disregolazione dell'MHC o un deficit dell'apparato di elaborazione dell'antigene, ma, soprattutto, sono in grado di riconoscere anche antigeni non proteici, come carboidrati e strutture glicolipidiche espressi direttamente sulla superficie di una cellula tumorale, il che aumenta il numero di potenziali target rispetto al riconoscimento mediato dal TCR.

Diverse generazioni di CAR

Il principale componente del dominio intracellulare è costituito generalmente dalla catena ζ (zeta) del recettore CD3 (dominio di attivazione), che è essenziale per fornire il primo segnale necessario per l'attivazione e la funzione effettrice dei linfociti T. In aggiunta, possono essere presenti uno o più domini di co-stimolazione, o co-stimolatori, come i recettori 4-1BB, CD28 e OX40, necessari, invece, per trasmettere un secondo segnale, che si traduce in un aumento dell'espansione e della persistenza *in vivo* delle CAR T-cells.

Tali caratteristiche rendono il dominio intracellulare fondamentale nel determinare l'attivazione delle CAR T-cells, tant'è vero che questa porzione è stata oggetto nel tempo di modifiche succes-

sive finalizzate a migliorare l'efficacia di questa terapia. Si è così passati dai CAR di prima generazione a quelli di seconda generazione (sono di questo tipo i CAR contenuti nelle due CAR T-cells finora approvate dalle agenzie regolatorie) e oggi si stanno già sviluppando CAR di terza e quarta generazione (figura 2).

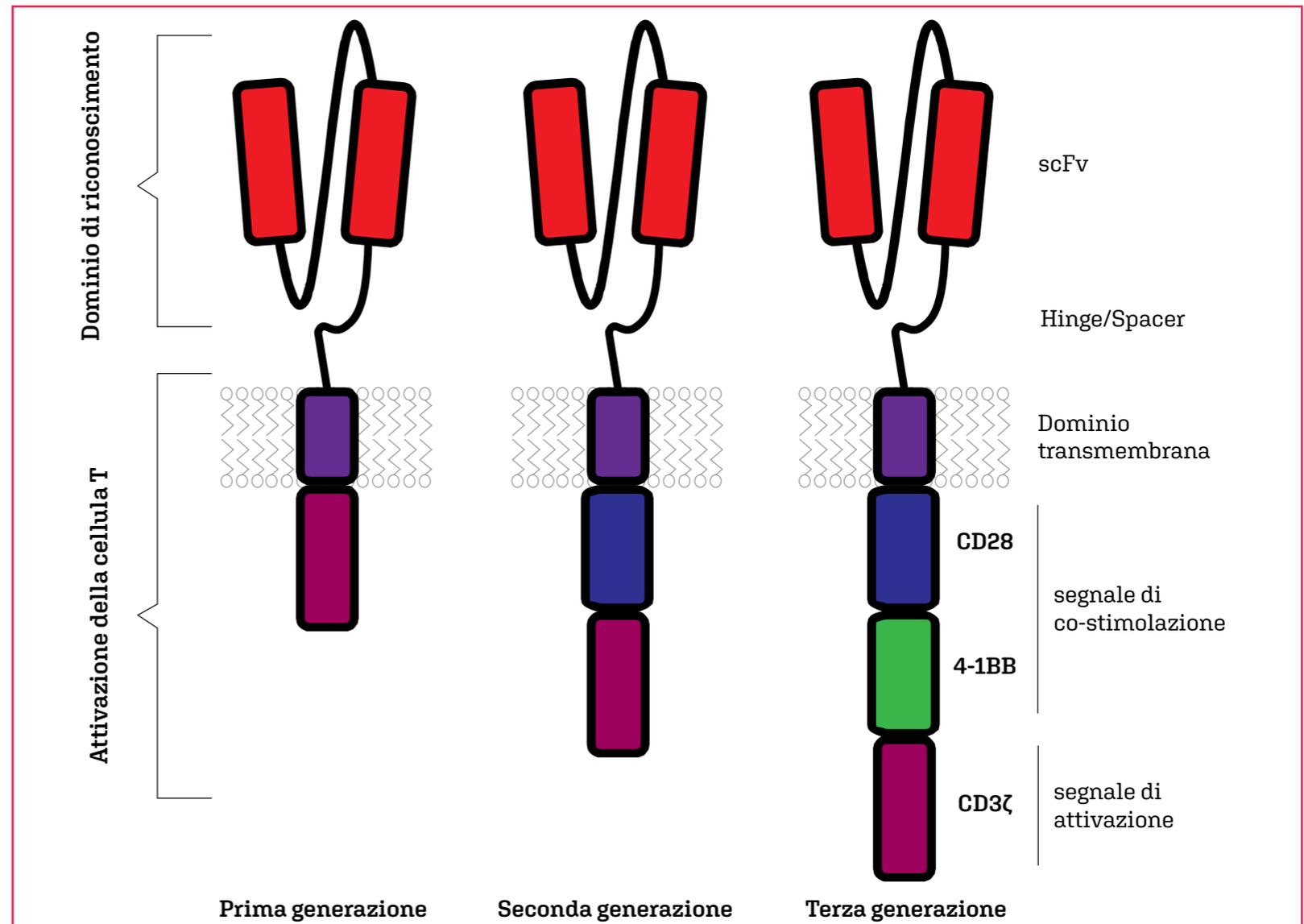


Figura 2. CAR di prima, seconda e terza generazione. Il dominio extracellulare di un CAR è costituito da una catena scFv di un anticorpo monoclonale, che riconosce un antigene associato al tumore. Per collegare il dominio di riconoscimento con la porzione intracellulare responsabile della trasduzione del segnale di attivazione della cellula T si utilizzano regioni spaziatrici (*spacer*), cerniere (*hinge*) e domini transmembrana che possono differire da un CAR all'altro. Mentre i CAR di prima generazione contengono nella porzione intracellulare solo il dominio di segnalazione (la catena CD3 ζ), quelli di seconda generazione comprendono anche un dominio co-stimolatorio, per esempio CD28 o 4-1BB, e quelli di terza generazione contengono una combinazione di due domini co-stimolatori.

CAR di prima generazione

I CAR di prima generazione erano costituiti unicamente dal primo segnale di attivazione dei linfociti T, che nella maggior parte dei casi era la catena ζ del recettore CD3 (CD3 ζ o CD3 zeta). È stato dimostrato che le cellule contenenti questi CAR non erano in grado di produrre quantità sufficienti di interleuchina-2 (IL-2), una citochina necessaria per l'uccisione delle cellule tumorali, che doveva quindi essere somministrata dall'esterno. La maggior parte degli studi effettuati su cellule T con CAR di prima generazione non ha evidenziato outcome soddisfacenti, in quanto le cellule ingegnerizzate, una volta infuse nel paziente, non proliferavano adeguatamente, sopravvivevano solo per un breve periodo e non producevano una quantità di citochine sufficiente per uccidere le cellule tumorali.

CAR di seconda generazione

Per superare questi limiti, sono stati sviluppati i CAR di seconda generazione, caratterizzati dalla presenza di un doppio segnale: uno di attivazione della cellula T, innescato dal riconoscimento dell'antigene, e un segnale di co-stimolazione che promuove la sintesi di IL-2 necessaria per completare l'attivazione delle cellule T ed evitarne l'apoptosi. Questo risultato si è ottenuto aggiungendo nel CAR al dominio di attivazione CD3 zeta un dominio co-stimolatorio, rappresentato nella maggior parte dei casi da recettori proteici quali 4-1BB (CD137), CD28 o OX40 (CD134). Le due CAR T-cells attualmente approvate dalle agenzie regolatorie sono caratterizzate entrambe da un CAR di seconda generazione, contenente nella porzione intracellulare il dominio di attivazione e un singolo dominio co-stimolatorio (4-1BB in tisagenlecleucel e CD28 in axi-cel).

CAR di terza generazione

Nel tentativo di ottimizzare la struttura del CAR, si stanno studiando CAR di terza generazione che contengono il dominio CD3 zeta combinato con due segnali co-stimolatori, per esempio CD28 più OX40 o 4-1BB più CD28. La combinazione di più

segnali co-stimolatori in un singolo CAR si è dimostrata in grado di migliorare sia la funzione effettrice sia la persistenza delle CAR T-cells, ma i dati clinici sono ancora molto limitati.

L'effetto del dominio co-stimolatorio

Le CAR T-cells possono mostrare importanti differenze in termini di tipi di citochine secrete, citotossicità e persistenza complessiva nei pazienti a seconda del tipo di dominio co-stimolatorio presente nel CAR. Per esempio, l'inserimento del dominio co-stimolatorio 4-1BB nei CAR di seconda generazione ha mostrato di essere associato alla presenza di CAR T-cells con fenotipo memoria, che ne favorisce la persistenza; invece, la presenza del dominio co-stimolatorio CD28 è risultata associata a una robusta attivazione ed espansione di queste cellule, ma a spese della morte o dell'esaurimento delle cellule T indotto dalla loro attivazione.

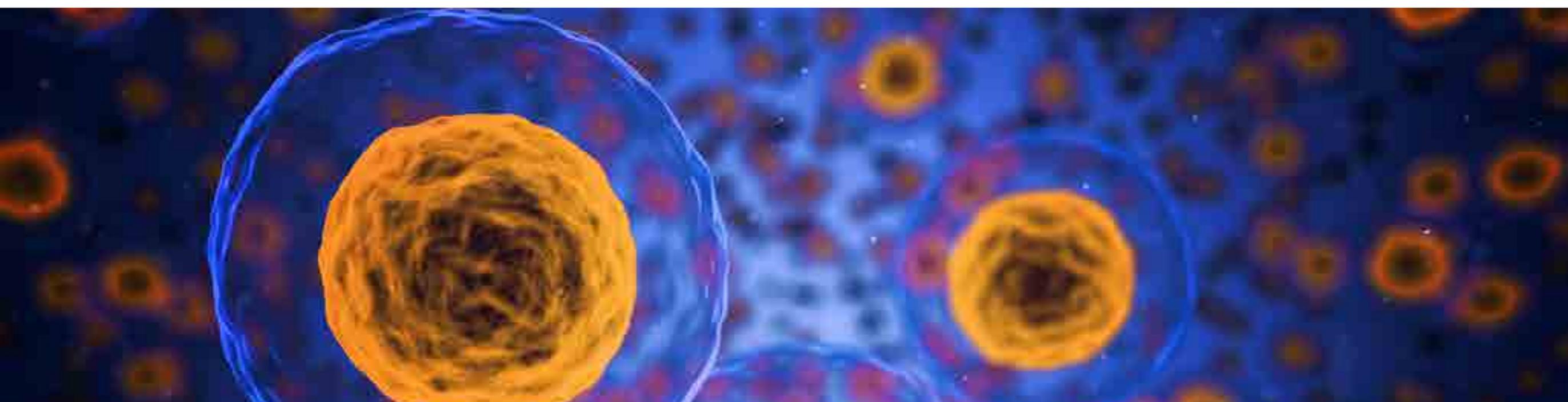
In uno studio preclinico nel quale si sono valutati diversi CAR di seconda e terza generazione per il trattamento del neuroblastoma, la presenza del dominio 4-1BB nel CAR ha mostrato di tradursi in un miglioramento significativo di diverse caratteristiche delle CAR T-cells, tra cui l'attivazione basale della cellula T, il controllo del tumore *in vivo* e la persistenza della cellula T.

Inoltre, dall'analisi dell'espressione di geni associati a vie metaboliche in seguito all'attivazione di CAR T-cells esprimenti il recettore CD28 oppure 4-1BB, è emerso che le differenze di persistenza nel paziente di questi due tipi di CAR T-cells possano essere associate anche al tipo di metabolismo energetico. Per esempio, uno studio ha evidenziato che la co-stimolazione da parte di 4-1BB aumenta l'attività mitocondriale delle cellule T, che promuove la risposta anti-PD-1. Inoltre, studi *in vitro* preliminari suggeriscono che le CAR T-cells il cui dominio co-stimolatorio è 4-1BB in genere si basano su un metabolismo ossidativo e mostrano una maggiore persistenza rispetto alle CAR T-cells aventi CD28 come dominio co-stimolatorio, il cui meta-

bolismo è più basato sulla glicolisi. Sebbene tali evidenze necessitino di ulteriori conferme, la possibilità di manipolare le CAR T-cells in modo da abbinare l'attività antitumorale mediata dal CAR con modifiche del genoma in grado di influire sul tipo di metabolismo utilizzato da queste cellule rappresenta una nuova frontiera dell'immunoterapia cellulare.

Bibliografia

- [1] Z. Eshar, et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cells receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:720-4.
- [2] G. Gross, et al. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [2006]. doi:10.1073/pnas.86.24.10024
- [3] M.N. Androulla, & Lefkothea, P. C. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(1):5-18;doi: 10.2174/1389201019666180418095526.
- [4] M. Chmielewski, et al. Antigen-specific T-cell activation independently of the MHC: Chimeric antigen receptor-redirected T cells. *Front Immunol.* 2013; Front Immunol. 2013;4:371;doi: 10.3389/fimmu.2013.00371. eCollection 2013.
- [5] Mollanoori, H., Shahraki, H., Rahmati, Y. & Teimourian, S. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Hum Immunol.* 2018;79(12):876-82;doi: 10.1016/j.humimm.2018.09.007.
- [6] S.J. Priceman, et al. Smart CARs engineered for cancer immunotherapy. *Curr Opin Oncol.* 2015;27(6):466-74;doi: 10.1097/CCO.000000000000232.
- [7] X.S. Zhong, et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI 3 kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8 T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther.* 2010;18(2):413-20;doi: 10.1038/mt.2009.210.
- [8] C. Carpenito, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(9):3360-5;doi: 10.1073/pnas.0813101106.
- [9] D. Gomes da Silva, et al. Direct Comparison of *In Vivo* Fate of Second and Third-Generation CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells in Patients with B-Cell Lymphoma: Reversal of Toxicity from Tonic Signaling. *Blood* 2016;128:1851.
- [10] Z. Zhao, et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T-cells. *Cancer Cell.* 2015;28(4):415-28;doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.004.
- [11] C. Quintarelli, et al. Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma. *Oncoimmunology.* 2018;7(6):e1433518;doi: 10.1080/2162402X.2018.1433518. eCollection 2018.
- [12] S.L. Maude, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018; 378:439-48;doi:10.1056/NEJMoa1709866.
- [13] O.U. Kawalekar, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T-cells. *Immunity.* 2016;44(2):380-90;doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.021.



Come agiscono le CAR T-cells?

Le CAR T-cells sono in grado di distruggere le cellule tumorali senza richiedere la presentazione dell'antigene attraverso l'MHC, legandosi agli antigeni di superficie delle cellule bersaglio attraverso il dominio extracellulare di riconoscimento scFv presente sul CAR. Proprio perché agiscono indipendentemente dalla presentazione dell'antigene tramite le molecole dell'MHC, per la loro preparazione si possono utilizzare le cellule T sia CD4+ (normalmente attivate attraverso l'MHC di classe II), sia CD8+ (normalmente attivate attraverso l'MHC di classe I).

La sinapsi immunologica

Quando il CAR si lega all'antigene bersaglio espresso sulle cellule tumorali, le CAR T-cells formano con queste ultime una sinapsi immunologica diversa da quella dei linfociti T citotossici convenzionali, ma comunque indispensabile per esercitare la loro funzione effettrice.

I linfociti T citotossici convenzionali sono in grado di distruggere ed eliminare rapidamente le cellule bersaglio in modo molto specifico grazie alla formazione di una sinapsi immunologica che coinvolge il TCR, una struttura altamente organizzata e composta da una serie di anelli concentrici (SMAC, da *supramolecular activation cluster*, cluster di attivazione sopramolecolare), ognuno dei quali costituito da gruppi di molecole che conferiscono funzioni specifiche.

Sebbene le CAR T-cells sfruttino per la loro funzione effettrice, almeno in parte, l'apparato di trasduzione del segnale del TCR, la struttura delle sinapsi immunologiche formate da queste cellule con le cellule bersaglio tramite i CAR presenta variazioni sostanziali rispetto a quella della sinapsi immunologi-

ca classica, variazioni che, in ultima analisi, si traducono in un'uccisione più rapida delle cellule tumorali.

La formazione di una sinapsi immunologica stabile è una *conditio sine qua non* per indurre le cellule effettrici a distruggere le cellule tumorali. Una volta legato l'antigene bersaglio (per esempio CD19) e formatasi tale sinapsi, si ha un'attivazione di pathway di trasduzione del segnale mediata dai domini intracellulari del CAR, che a sua volta determina l'attivazione delle CAR T-cells e la conseguente eliminazione delle cellule bersaglio in modo diretto o attraverso meccanismi indiretti (**figura 1**).

Le CAR T-cells possono quindi indurre la lisi delle cellule tumorali con diversi meccanismi (**figure 2 e 3**): una citotossicità diretta mediata dal rilascio di perforina e granzimi da parte delle CAR T-cells, l'attivazione di altre componenti del sistema immunitario, la sensibilizzazione dello stroma tumorale attraverso il rilascio di citochine da parte delle CAR T-cells e, come dimostrato di recente, anche meccanismi alternativi, quali l'attivazione dell'asse Fas/Fas-ligando (Fas-L); inoltre, l'eradicazione a lungo termine del tumore e la prevenzione delle recidive possono dipendere dalla formazione di CAR T-cells della memoria dopo l'attivazione iniziale.

Citolisi diretta mediante il rilascio di perforina e granzimi

Per indurre la citolisi delle cellule bersaglio, le CAR T-cells utilizzano l'esocitosi di granuli citotossici contenenti molecole di perforina e granzimi. Una volta formatasi la sinapsi immunologica, i granuli migrano verso la superficie cellulare, fondendosi con la membrana plasmatica in corrispondenza degli

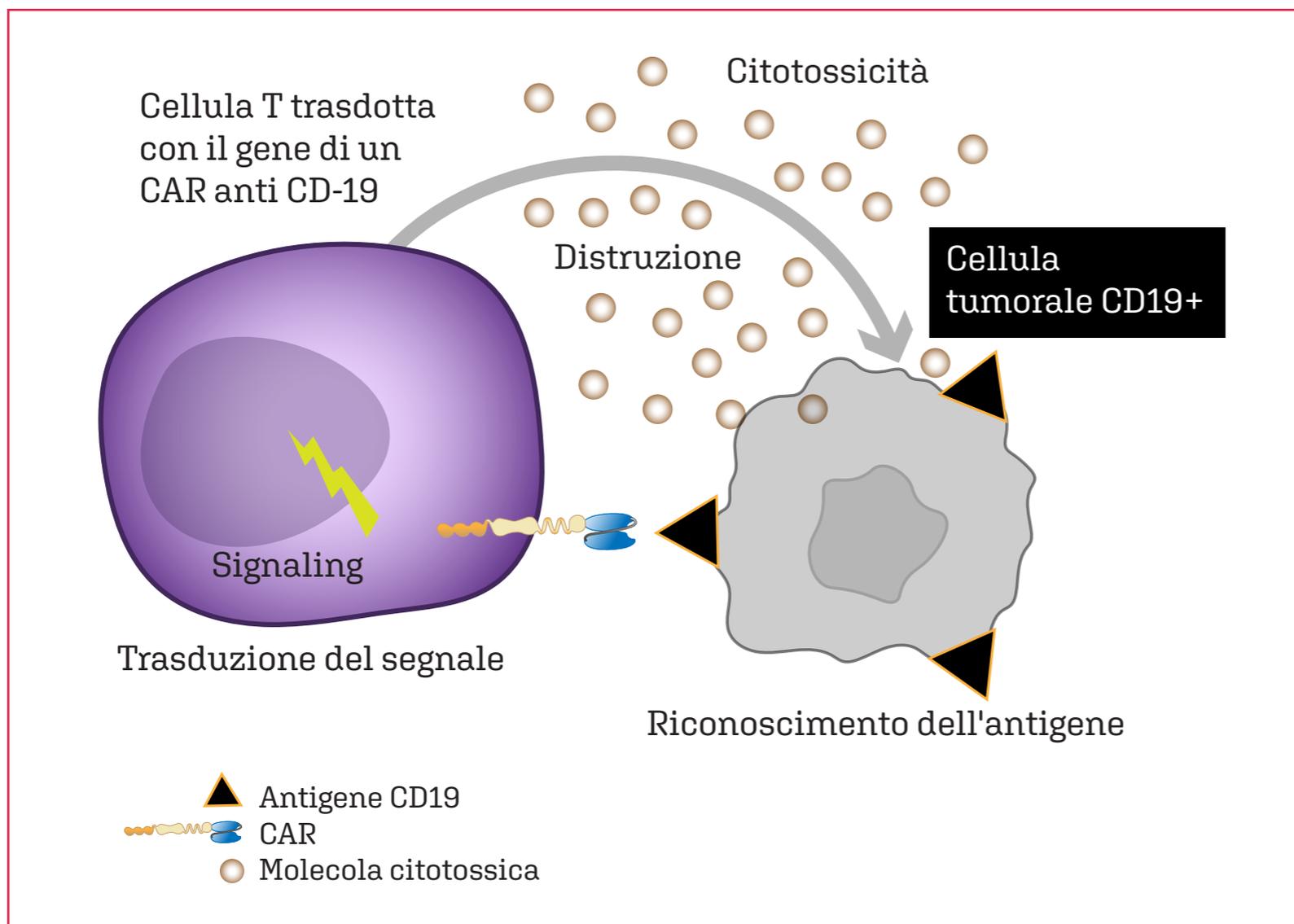


Figura 1. Azione citotossica delle CAR T-cells anti-CD19. Il CAR espresso dalle CAR T-cells riconosce uno specifico antigene tumorale (per esempio il CD19) espresso sulla membrana della cellula bersaglio. Tale interazione porta alla formazione di una sinapsi immunologica che porta all'attivazione delle CAR T-cells e al successivo rilascio di molecole ad azione citotossica (perforine e granzimi), le quali inducono la morte della cellula tumorale per apoptosi.

SMAC e rilasciando il loro contenuto nello spazio intersinapatico (degranulazione). Qui la perforina induce la formazione di pori sulla membrana della cellula tumorale, facilitando l'ingresso dei granzimi ad azione pro-apoptotica e garantendone così un'uccisione rapida e precisa. Una volta penetrati nel citoplasma, infatti, i granzimi possono indurre la morte cellulare per apoptosi in modo dipendente e indipendente dalle caspasi, agendo sui loro substrati.

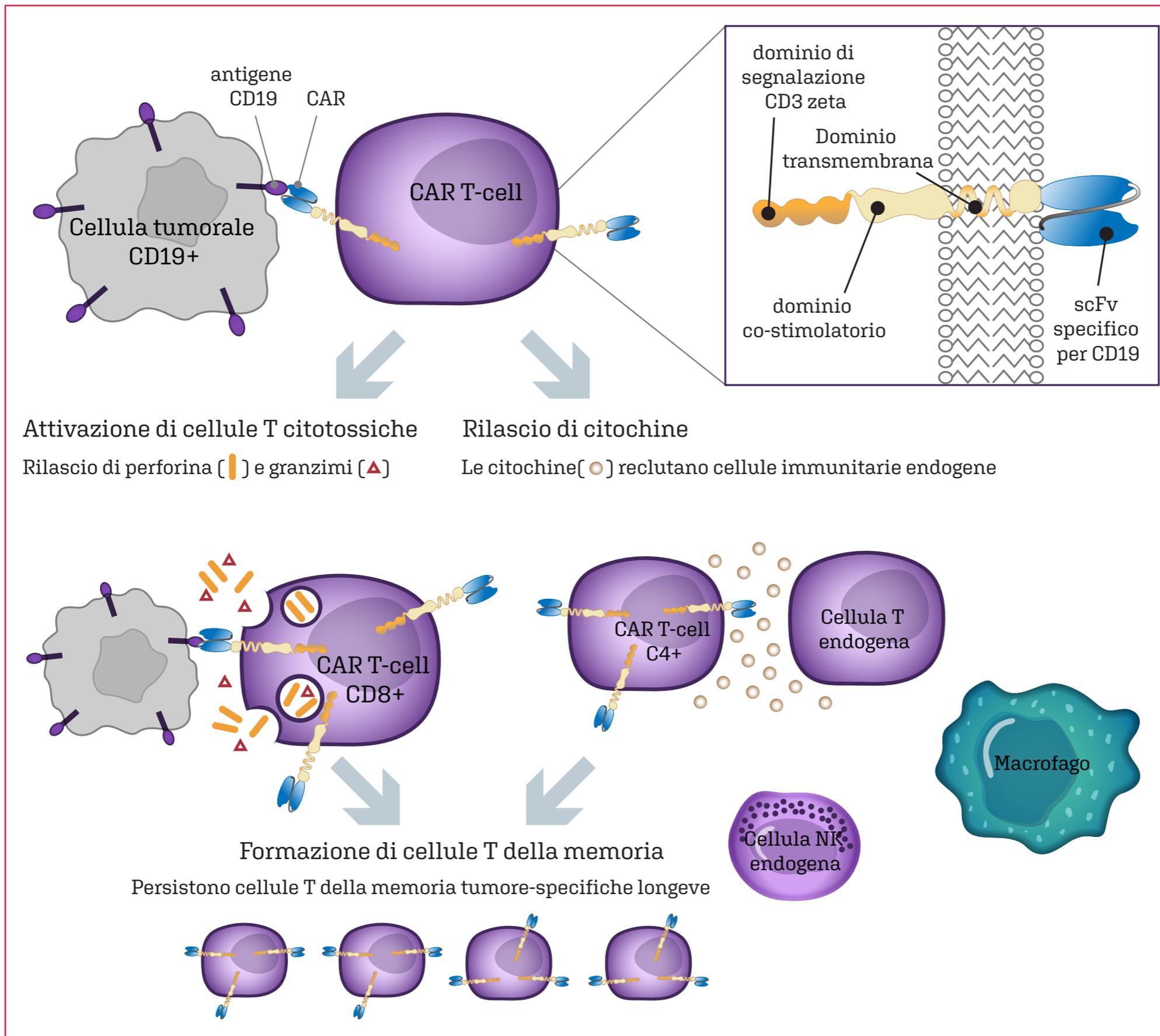
Si pensa che la citolisi mediata dal rilascio di perforina e granzimi sia il meccanismo principale con cui le CAR T-cells eliminano le cellule bersaglio, come dimostrato dal fatto che il blocco del rilascio di perforina è in grado di abrogare la citolisi delle cellule bersaglio.

Le cellule T CD4+ hanno mostrato di produrre quantità di perforina e granzimi sostanzialmente inferiori rispetto a quelle prodotte dalle cellule T CD8+.

È stato dimostrato che nelle cellule CD8+ citotossiche i meccanismi di uccisione delle cellule bersaglio tramite la perforina e il pathway Fas/Fas-ligando (Fas-L) possono collaborare. Tuttavia, l'azione mediata dal FasL è generalmente ritardata rispetto a quella della perforina. Ed è stato anche dimostrato che nelle CAR T-cells si possono avere effetti sinergici o additivi tra la degranulazione e le vie litiche basate su ligandi come il FasL. Questa sinergia potrebbe essere importante per l'induzione di un controllo completo e duraturo del tumore da parte delle CAR T-cells.

L'interazione tra Fas e Fas-L

Studi recenti hanno dimostrato che le CAR T-cells sono in grado di sfruttare il pathway Fas/Fas-L per lisare le cellule bersaglio ed eliminare così il tumore. L'attivazione di questa via di segnalazione è avviata dalla trimerizzazione del recettore Fas indotta dal FasL, che determina a sua volta l'attivazione della pro-caspasi 8 e della caspasi 8; la caspasi 8 attiva induce quindi la



conversione a valle della pro-caspasi 3 in caspasi 3 matura, che infine porta alla morte cellulare per apoptosi.

Uno studio recente e molto interessante ha dimostrato che CAR T-cells anti-CD19 e anti-CD30, in un ambiente tumorale contenente cellule sia antigene-positivie sia antigene-negative, sono in grado di mediare la lisi tumorale anche nei confronti della frazione antigene-negativa con una modalità che dipende dal contatto cellula-cellula, ma è indipendente dall'antigene. Tuttavia, si è osservato che questo meccanismo interviene solo in seguito all'attivazione delle CAR T-cells conseguente alla loro interazione con le cellule

Figura 2. Il meccanismo d'azione delle CAR T-cells.

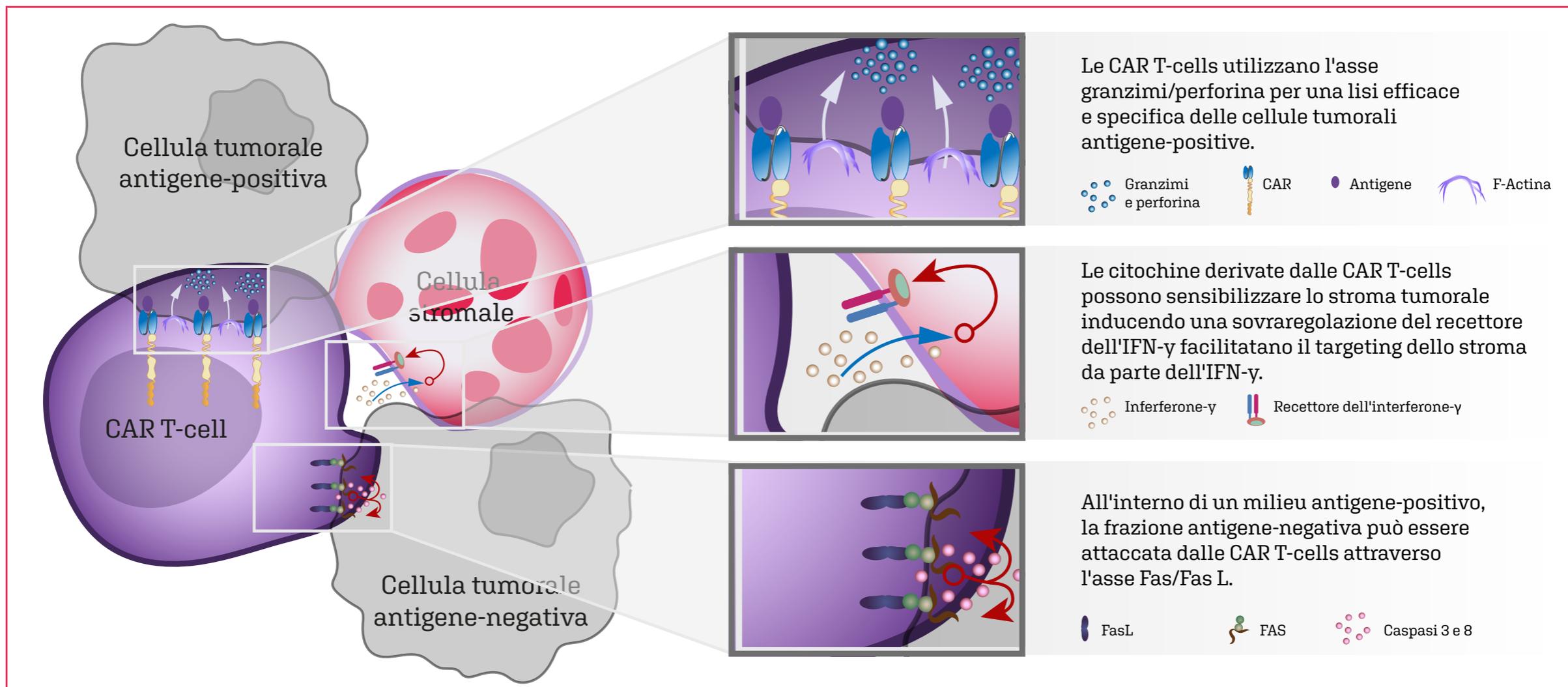


Figura 3. Le CAR T-cells sono in grado di eliminare il tumore attraverso tre meccanismi principali: la lisi delle cellule tumorali tramite l'esocitosi di granuli di perforina e granzimi, la secrezione di citochine, che permette la sensibilizzazione dello stroma tumorale, e l'attivazione del pathway Fas/FasL, che consente di colpire anche la frazione di cellule tumorali antigene-negative.

tumorali antigene-positivo. Cionondimeno, l'attivazione del pathway Fas/FasL può rappresentare un meccanismo alternativo tramite il quale le CAR T-cells possono provocare la lisi delle cellule bersaglio in un ambiente tumorale eterogeneo.

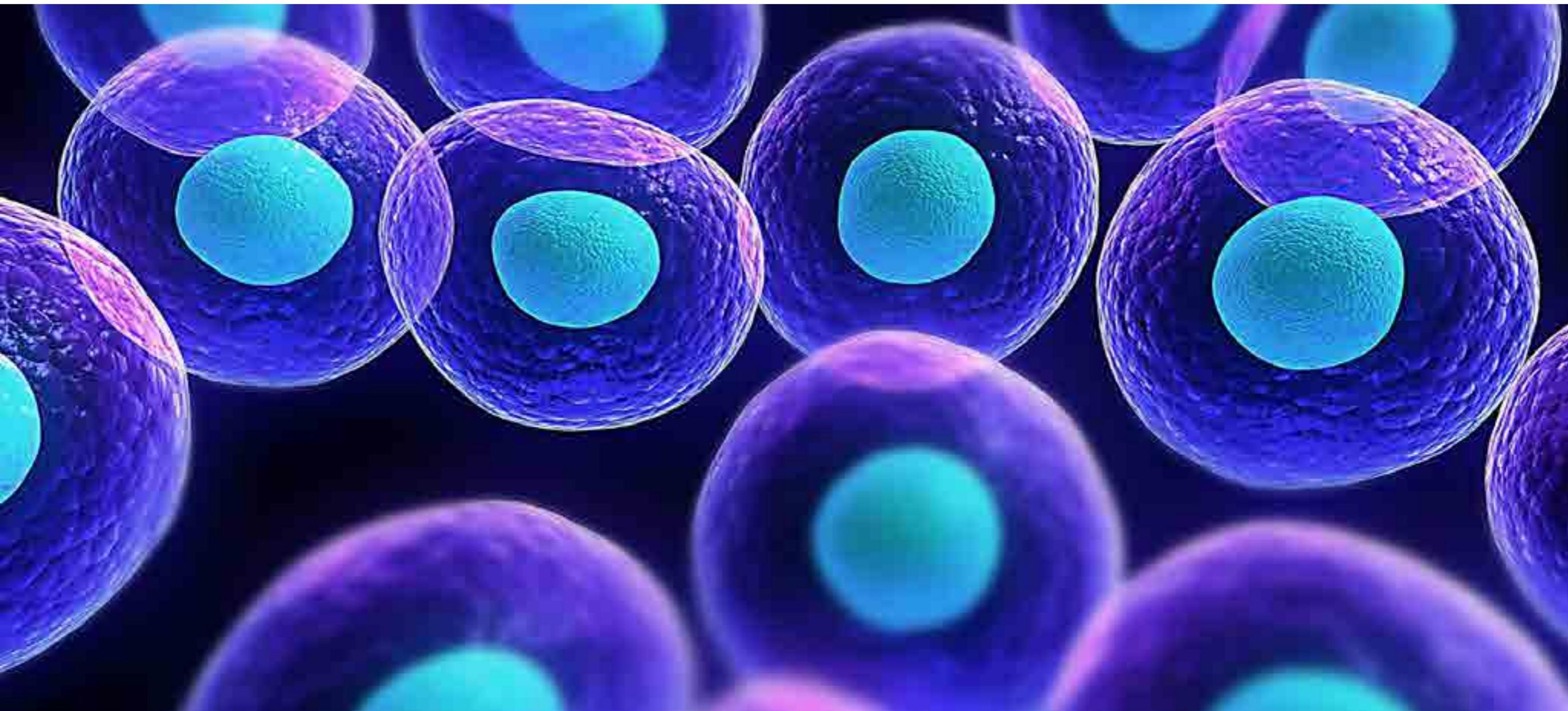
Rilascio di citochine

Anche se le CAR T-cells sono progettate in modo da indurre la lisi tumorale tramite interazioni dirette tra le cellule T e le cellule tumorali, la produzione e il rilascio di citochine da parte delle CAR T-cells attivate può migliorare ulteriormente la loro efficacia anti-tumorale.

La secrezione di citochine da parte delle CAR T-cells svolge, in effetti, un ruolo importante nell'indurre la lisi del tumore attraverso meccanismi secondari. È stato dimostrato, per esempio, che le citochine rilasciate da CAR T-cells dirette contro l'antigene HER-2 possono indurre una sovraespressione del recettore dell'interferone gamma (IFN- γ) da parte dello stroma tumorale, innescando una 'rieducazione' delle cellule immunitarie, come la polarizzazione dei macrofagi verso un fenotipo M1 anti-tumorale. E ci sono evidenze che la sensibilizzazione dello stroma tumorale e la polarizzazione dei macrofagi siano elementi chiave dell'eliminazione delle cellule tumorali da parte delle CAR T-cells.

Bibliografia

- [1] I.G. Schmidt-Wolf, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med.* 1991; 174(1):139-49;doi:10.1084/jem.174.1.139.
- [2] M. Chmielewski, et al. Antigen-specific T-cell activation independently of the MHC: Chimeric antigen receptor-redirected T cells. *Front. Immunol.* 2013;4:371;doi:10.3389/fimmu.2013.00371.
- [3] M.L. Davila, et al. Chimeric antigen receptors for the adoptive T cell therapy of hematologic malignancies. *Int J Hematol.* 2014; 99(4):361-71;doi: 10.1007/s12185-013-1479-5.
- [4] M. R. Benmebarek, et al. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6): 1283;doi: 10.3390/ijms20061283.



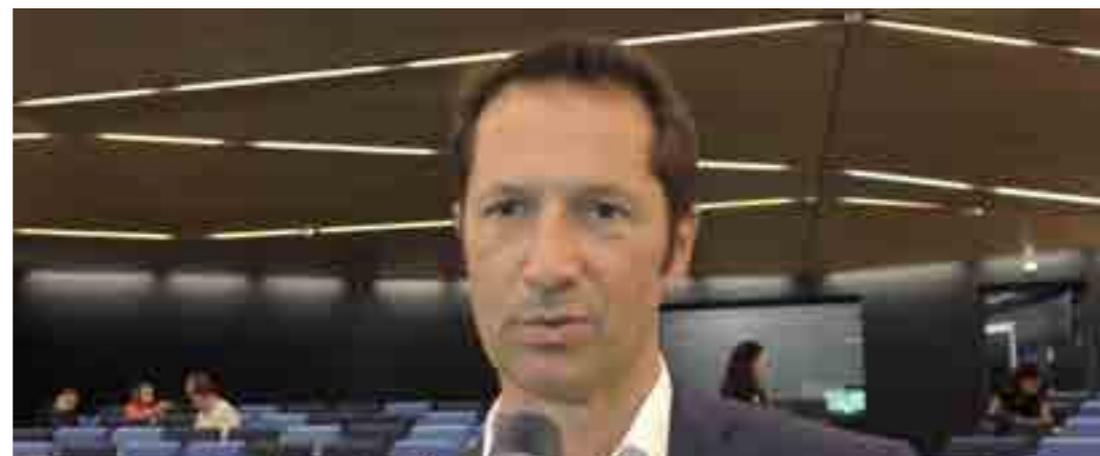
Come si producono le CAR T-cells?

Il processo di produzione delle CAR T-cells è stato migliorato negli anni, passando da un approccio di laboratorio, che prevedeva diverse fasi manuali, a uno sempre più automatizzato e su scala industriale, che deve seguire specifiche linee guida di buona fabbricazione (GMP). Questo ha comportato una serie di vantaggi, tra i quali la riduzione dei rischi di contaminazione, una maggiore conformità ed efficienza del prodotto e una maggiore tracciabilità lungo tutto il processo.

La terapia con CAR T-cells prevede la somministrazione di diversi milioni di cellule, che devono essere manipolate ed espanse in appositi incubatori per 10-14 giorni, controllandone la crescita. Per questo scopo sono nate le *cell factories*, strutture idonee e certificate che garantiscono la produzione di CAR T-cells in modo sicuro e controllato.

Nelle terapie con le CAR T-cells autologhe, attualmente approvate dalle agenzie del farmaco, la produzione delle cellule ingegnerizzate prevede varie tappe (**figura 1**): si inizia con la leucoferesi, tramite la quale si isolano i linfociti dal sangue del paziente, mentre le altre componenti cellulari e plasmatiche vengono rinfuse; seguono poi una selezione delle cellule T dal prodotto della leucoferesi, un'attivazione di queste cellule, l'inserimento nelle cellule T attivate del gene del CAR di interesse (trasduzione) e, infine, l'espansione delle cellule T trasdotte con il CAR, ormai trasformate in CAR T-cells, che, una volta sottoposte a una serie di controlli di qualità, verranno poi somministrate al paziente.

Al momento attuale, per le CAR T-cells già approvate, il tempo cosiddetto 'da vena a vena', cioè il tempo che intercorre tra la leucoferesi e la reinfusione delle cellule T riprogrammate nel paziente è di qualche settimana (da 3 a 4).



Dott. Gunther Busam

Come si producono le CAR T-cells? Le sfide da superare

 **GUARDA IL VIDEO**

La leucoferesi

Il primo passaggio della preparazione delle CAR T-cells consiste nell'isolamento dei linfociti dal paziente mediante la procedura di leucoferesi (o leucaferesi). Durante questo processo, il sangue del paziente viene prelevato e fatto scorrere in un apposito macchinario in grado di trattenere i linfociti, mentre i restanti componenti cellulari vengono reinfusi. La procedura dura dalle 3 alle 6 ore a seconda anche del numero di linfociti circolanti nel paziente. Il numero di linfociti isolati, infatti, è fondamentale per la produzione di una quantità sufficiente di CAR T-cells; nei pazienti leucemici, tuttavia, questo rappresenta spesso uno step limitante a causa della riduzione della quota linfocitaria circolante causata dall'aumento di altre popolazioni cellulari, quali i blasti, il che rende necessario allungare i tempi di leucoferesi. In alternativa, si possono sfrutta-

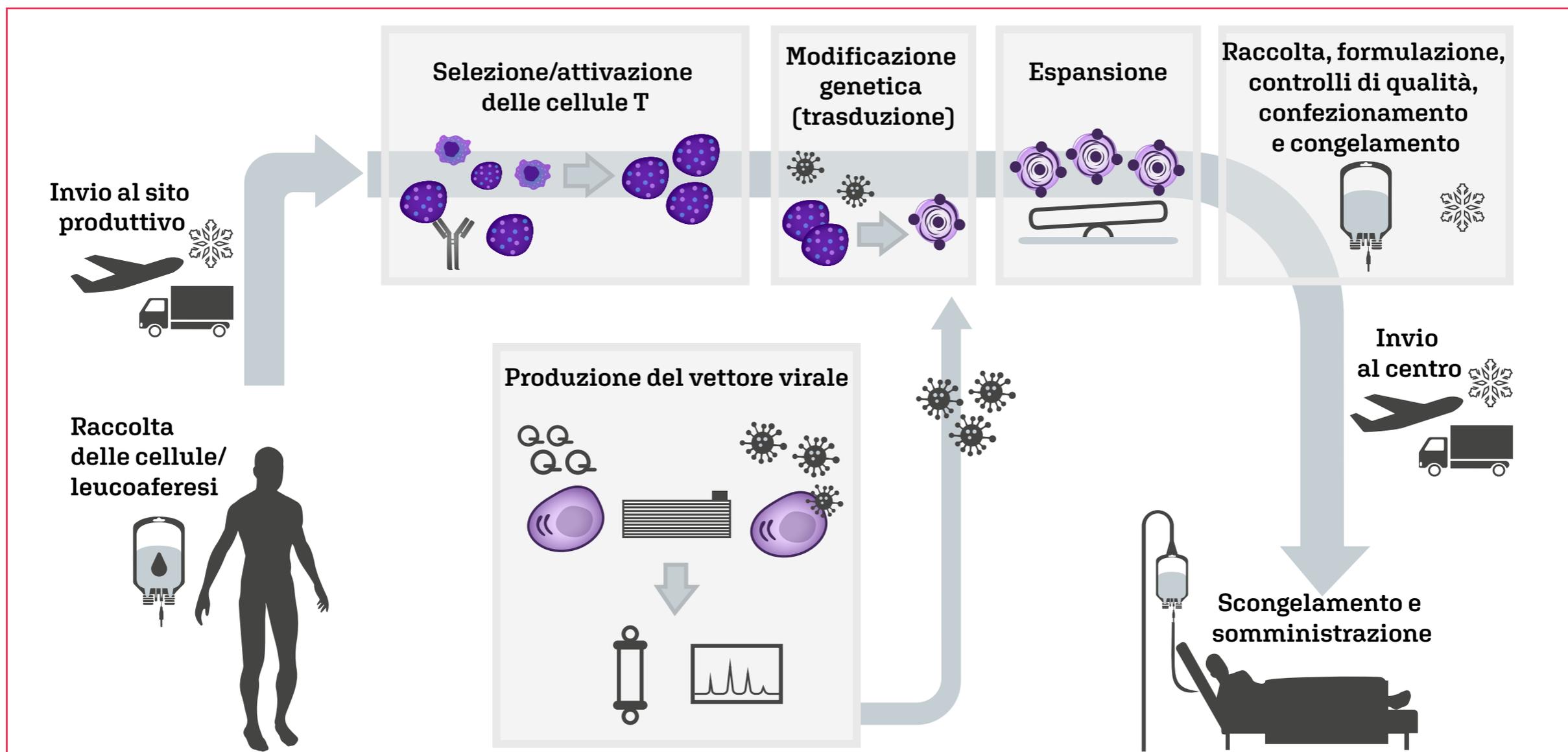


Figura 1. Rappresentazione schematica del processo di produzione delle CAR T-cells. I linfociti sono prelevati dal paziente tramite leucoferesi e da qui inviati nei centri deputati alla produzione delle CAR T-cells (*cell factories*), dove le cellule T vengono selezionate dal prodotto della leucoferesi, attivate, modificate geneticamente inserendovi il gene del CAR di interesse (trasduzione), espanse per raggiungere una dose clinica, sottoposte agli opportuni controlli di qualità, congelate e, infine, inviate nuovamente al centro dove, dopo lo scongelamento, saranno reinfuse nel paziente.

re strategie di mobilizzazione delle cellule dal midollo osseo, come ad esempio l'uso di plerixafor, un antagonista del recettore CXCR4, che facilita il rilascio di cellule T e cellule staminali emopoietiche.

Separazione e selezione delle cellule T

Dal materiale ottenuto con la leucoferesi occorre poi isolare le cellule T che dovranno essere manipolate per intro-

durvi il gene del CAR ed essere trasformate in CAR T-cells. Il prodotto grezzo della leucoferesi viene quindi inviato dall'ospedale all'impianto dove avverrà la preparazione delle CAR T-cells. La separazione e selezione delle cellule T in genere viene effettuata in base alle dimensioni o sfruttando l'espressione di specifici marcatori cellulari espressi sulla membrana plasmatica, ma sono allo studio anche altri approcci ([figura 2](#)).

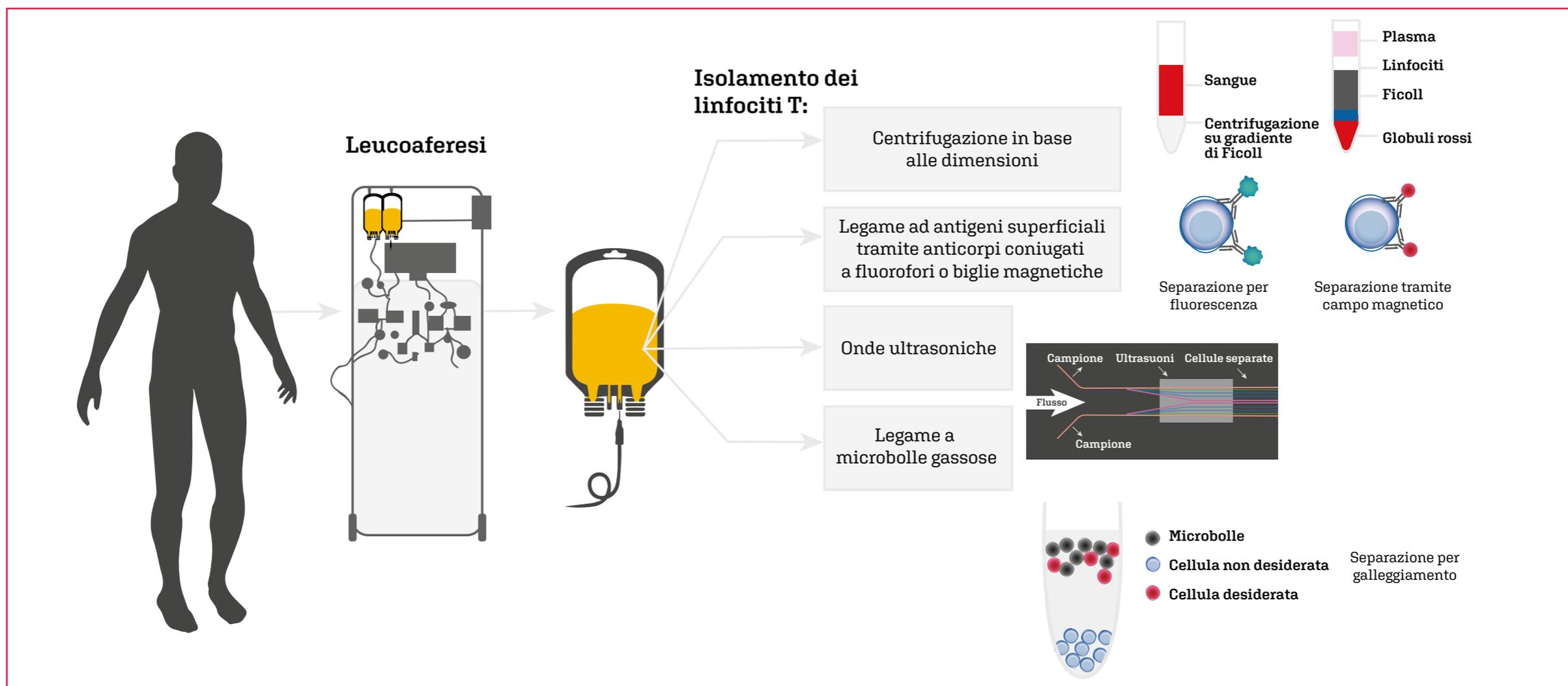


Figura 2. Principali tecnologie usate per la separazione delle cellule T. Dopo la leucoferesi, le cellule T possono essere isolate in base alle loro dimensioni tramite centrifugazione su gradiente [ficoll] o con onde ultrasoniche, oppure sfruttando l'espressione di antigeni di superficie tramite anticorpi coniugati a molecole fluorescenti [fluorocromi] o a biglie magnetiche o, ancora, attraverso l'uso di microbolle gassose.

Separazione in base alle dimensioni cellulari

Nel primo caso, la separazione avviene mediante centrifugazione, con o senza l'uso di sistemi basati su gradiente di densità (come Ficoll), che consentono la rimozione di frazioni indesiderate dei prodotti della leucoferesi, quali granulociti, piastrine e globuli rossi. Questa tecnologia è ben consolidata e ora sono disponibili diversi sistemi chiusi e automatizzati per eliminare le cellule non desiderate utilizzando la separazione tramite gradiente di densità. Tuttavia, poiché il principio di tale separazione dipende da differenze intrinseche nella dimensione cellulare, risulta impossibile discriminare diversi

fenotipi cellulari con dimensioni simili (per esempio, cellule T sane rispetto a cellule leucemiche).

Separazione in base a marcatori presenti sulla superficie cellulare

Un approccio alternativo per la separazione e selezione delle cellule T consiste nell'utilizzo di anticorpi che riconoscono marcatori espressi sulla superficie cellulare delle cellule di interesse, e che sono coniugati con fluorocromi (molecole fluorescenti) o biglie magnetiche.

Nel caso di anticorpi legati a molecole fluorescenti, la separazione viene poi effettuata tramite FACS (*flow activated cell sorting*), una metodica comunemente usata nei laboratori di ricerca per la separazione di specifici sottotipi cellulari basandosi sull'espressione di antigeni di superficie. Questo approccio presenta, tuttavia, alcuni limiti, come la velocità del processo (il *throughput*) e il numero di cellule recuperate, che risultano relativamente bassi rispetto ad altri sistemi; inoltre, poiché nella maggior parte dei casi le cellule vengono isolate racchiuse in gocce, questo sistema comporta il rischio di contaminazioni ambientali.

La separazione che utilizza anticorpi coniugati a biglie magnetiche, invece, è più veloce e ha una maggiore scalabilità rispetto alla separazione tramite FACS, per cui è attualmente il metodo più utilizzato per l'isolamento delle cellule T. Questo approccio sfrutta l'isolamento in un campo magnetico della cellula che esprime l'antigene di interesse tramite il legame dell'anticorpo associato a una biglia magnetica, ma comporta l'isolamento di popolazioni cellulari legate a sfere magnetiche che verranno poi infuse nel paziente. Sebbene inerti, le biglie magnetiche legate alle cellule possono comportare un'attivazione aspecifica e alterare le caratteristiche cellulari; perciò, per far fronte a questa criticità, alcune aziende stanno sviluppando diverse tecnologie per consentire il rilascio di tali biglie una volta che le cellule sono state isolate.

Altri approcci in studio

Parallelamente, sono in corso di valutazione altri approcci per la selezione cellulare, tra cui gli ultrasuoni in grado di separare sulla base delle dimensioni cellulari e una tecnica chiamata BACS (*buoyancy-activated cell sorting*), basata sull'utilizzo di anticorpi legati a microbolle, cioè bolle gassose con un diametro nell'ordine dei micrometri, che consentono l'isolamento delle cellule di interesse per galleggiamento. L'obiettivo di questi progressi tecnologici è aumentare ulteriormente

la specificità di selezione cellulare, riducendo al minimo la manipolazione della cellula e limitando costi e tempi di preparazione del prodotto.

Selezione di specifiche sottopopolazioni di cellule T

Sono in via di sviluppo anche strategie che consentano di isolare particolari sottopopolazioni di cellule T, come cellule T naïve o cellule T della memoria, o arrivare a una miscela di cellule T con una composizione precisa e bilanciata di sottopopolazioni diverse. Per esempio, le CAR T-cells liso-cel (un prodotto non ancora approvato, ma in fase avanzata di sviluppo per il trattamento di alcuni tipi di linfoma non-Hodgkin) vengono prodotte in modo che le cellule T da ingegnerizzare contengano una percentuale fissa e precisa di cellule T CD4+ e CD8+. La selezione di sottopopolazioni di cellule T e, di conseguenza, l'incremento della loro purezza, ha mostrato in studi preliminari una superiorità in termini sia di resa sia di efficacia delle CAR T-cells generate a partire da tali sottopopolazioni rispetto a quelle prodotte mediante una semplice separazione delle cellule T dopo la leucoaferesi.

Attivazione delle cellule T

Una volta isolate, le cellule T devono essere attivate, per consentirne sia la trasduzione con il gene del CAR di interesse sia la successiva espansione *in vivo*. Sono state sviluppate diverse tecnologie per l'attivazione delle cellule T:

- basata su cellule;
- basata su microsferi;
- basata su anticorpi.

Attivazione basata su cellule

Il primo approccio sfrutta cellule che fisiologicamente, a livello endogeno, sono deputate alla presentazione dell'antigene (APC), come le cellule dendritiche e i macrofagi. Questa strategia impiega le APC del paziente mimando la stimolazione che avviene *in vivo*; tuttavia, presenta alcuni limiti, fra cui i

costi per la preparazione delle cellule con caratteristiche che rispettino i requisiti previsti dalle GMP, il rischio di contaminazione della popolazione terapeutica (le CAR T-cells) a causa di una rimozione incompleta delle APC prima dell'infusione nel paziente e, infine, la variabilità da donatore a donatore nella quantità di APC isolate e nella loro attività.

Per superare queste limitazioni sono state create cellule presentanti l'antigene artificiali (aAPC); si tratta di linee cellulari geneticamente modificate che esprimono costitutivamente antigeni in grado di guidare l'attivazione e l'espansione di specifici tipi di cellule, consentendo così una stimolazione più controllata rispetto alle APC endogene. Tuttavia, anche le aAPC presentano alcuni limiti, legati ai tempi ma soprattutto ai costi di ingegnerizzazione, espansione, qualificazione e mantenimento delle linee.

Attivazione basata su microsfere e/o anticorpi

Un'alternativa alle APC è offerta dall'uso di microsfere che portano legati anticorpi, generalmente anti-CD3 e anti-CD28, o, in alternativa, dei soli anticorpi, che rappresentano i reagenti più comunemente utilizzati nella produzione di cellule per immunoterapia commerciale, poiché inducono un'attivazione consistente, riducendo e semplificando i flussi di produzione. Ad oggi, diverse aziende *biotech* hanno generato reagenti standard per l'attivazione delle cellule T, semplificandone ampiamente l'attivazione *ex vivo*.

Trasduzione con il gene del CAR di interesse

La trasduzione rappresenta la fase in cui il DNA della cellula T viene modificato attraverso l'inserimento nel suo genoma del gene codificante il CAR di interesse (costrutto). Le tecniche di ingegneria genetica utilizzate a tale scopo si sono evolute nel tempo, passando da semplici metodi di laboratorio fisico-chi-

mici a metodi di trasferimento di materiale genetico (trasfezione) attraverso vettori virali e non, con l'obiettivo di raggiungere un'espressione elevata del gene del CAR, riducendo nel contempo gli effetti tossici sulla cellula.

La trasduzione può essere eseguita durante l'attivazione delle cellule T o nei successivi 3 giorni, e in quest'ultimo caso risulta più efficiente grazie all'aumentata percentuale di cellule che si dividono attivamente.

Trasduzione mediante vettori virali

La trasduzione delle cellule T mediante vettori virali è attualmente la procedura più utilizzata per l'ingegnerizzazione delle cellule T e sfrutta l'impiego di retrovirus (lentivirus o γ -retrovirus) oppure adenovirus. L'uso di vettori virali per l'inserimento del gene del CAR nelle cellule T presenta diversi vantaggi, tra cui la relativa facilità di produzione e la loro capacità di integrare stabilmente il materiale genetico nel genoma della cellula ospite.

Trasduzione mediante altre tecniche

Si stanno attualmente studiando anche altre tecniche di trasduzione non basate sull'impiego di virus, al fine di semplificare la produzione delle CAR T-cells e ridurre i costi associati all'uso di vettori virali. Tra queste, l'impiego dei trasposoni complessi, in grado di tagliare il DNA in regioni specifiche tramite l'enzima trasposasi e inserire attraverso 'ricombinazione sito-specifica' la sequenza di DNA codificante per il CAR. La trasduzione mediante trasposoni risulta sostanzialmente più efficace e rapida, meno tossica e caratterizzata da costi ridotti rispetto a quella basata sull'uso di vettori virali; tuttavia, siamo ancora lontani da un suo impiego in ambito clinico e la tecnica basata sui vettori virali resta quella maggiormente utilizzata.

Espansione

La maggior parte delle terapie cellulari, compresa quella con le CAR T-cells, richiede l'espansione delle cellule prima della loro reinfusione nel paziente, al fine di raggiungere il numero necessario da somministrare per ottenere l'effetto terapeutico. Sono disponibili diversi sistemi per ottenere tale espansione; tra questi, i più utilizzati sono sacche di coltura permeabili a gas statici, diverse tipologie di bioreattori e nuovi macchinari sviluppati per isolare, modificare geneticamente ed espandere i linfociti in un unico sistema.

Controlli di qualità

Una volta conclusa la fase di espansione, è necessario garantire che le cellule prodotte soddisfino determinati standard di qualità (attributi di qualità critica, CQA); ciò richiede un monitoraggio continuo di parametri biologici e microbiologici durante l'iter produttivo per assicurare la qualità del prodotto finito in termini di sicurezza e potenza, un processo noto come PAT (*in-line process analytical technologies*). I comuni bioreattori sono dotati di sensori per monitorare in modo continuo pH e temperatura, mentre altri parametri sono ad oggi misurati tramite un campionamento manuale di routine per raccogliere dati relativi a densità cellulare, vitalità e metaboliti prodotti. Tuttavia, sono attualmente in sviluppo nuove tecnologie per consentire la lettura automatizzata di tutti questi parametri e conoscere in tempo reale o addirittura in anticipo i processi da eseguire sulle cellule in cultura (per esempio trasduzione o recupero cellulare).

Terminati tutti i necessari controlli di qualità, le cellule possono finalmente essere congelate e inviate dalla *cell factory* al centro dove, dopo lo scongelamento, saranno somministrate al paziente.

Bibliografia

- [1] R.K. Iyer, et al. Industrializing Autologous Adoptive Immunotherapies: Manufacturing Advances and Challenges. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:150;doi: 10.3389/fmed.2018.00150. eCollection 2018.
- [2] E.S. Allen, et al. Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. *Transfusion*. 2017;57(5):1133-41;doi: 10.1111/trf.14003.
- [3] L.S. Kean, et al. Significant mobilization of both conventional and regulatory T cells with AMD3100. *Blood*. 2011;118(25):6580-90;doi: 10.1182/blood-2011-06-359331.
- [4] D.F. Stroncek, et al. Counter-flow elutriation of clinical peripheral blood mononuclear cell concentrates for the production of dendritic and T cell therapies. *J. Transl. Med.* 2014;12:241;doi:10.1186/s12967-014-0241-y.
- [5] A.A. Neurauter, et al. Cell isolation and expansion using Dynabeads. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;106:41-73.
- [6] U. Mock, et al. Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy*. 2016;18(8):1002-11;doi: 10.1016/j.jcyt.2016.05.009.
- [7] A. Casati, et al. Clinical-scale selection and viral transduction of human naïve and central memory CD8+ T cells for adoptive cell therapy of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(10):1563-73;doi: 10.1007/s00262-013-1459-x.
- [8] N.N. Shah, et al. CD4/CD8 T-Cell Selection Enhances CD22 CAR-T Cell Transduction and in-Vivo CAR-T Expansion: Updated Results on Phase I Anti-CD22 CAR Dose Expansion Cohort. *Blood*. 2017;130:809.
- [9] <https://www.miltenyibiotec.com/IT-en/products/cell-manufacturing-platform/clinimacs-prodigy.html> [ultimo accesso: 11-2019].

Il futuro delle CAR T-cells

Perché la terapia con le CAR T-cells sia efficace, le cellule ingegnerizzate somministrate al paziente dovrebbero possedere tre caratteristiche fondamentali:

1. alta attività effettrice, anche nell'ambiente tumorale immunosoppressivo;
2. alta capacità di proliferazione, anche dopo molteplici incontri con cellule tumorali;
3. sopravvivenza a lungo termine nell'organismo del paziente.

Nonostante i successi già ottenuti con le CAR T-cells dirette contro l'antigene CD19, la diffusione su ampia scala del loro impiego clinico è tuttora limitata da diversi fattori, fra cui la persistenza non ottimale, la bassa efficacia finora dimostrata nei confronti dei tumori solidi, il profilo di sicurezza e, non ultimo, il costo. Sono pertanto allo studio diverse strategie per affrontare tali problematiche su vari fronti, al fine di aumentare l'accesso a queste terapie, sviluppare CAR T-cells di nuova generazione ancora più efficaci e aprire nuove prospettive di impiego, per esempio nei tumori solidi.

Ricerca di nuovi antigeni bersaglio

Molti laboratori sono al lavoro per sviluppare nuovi CAR diretti contro antigeni bersaglio diversi dal CD19. Fra i target alternativi più studiati per il trattamento delle neoplasie ematologiche ci sono CD20, CD22 e CD30. Per esempio, in uno studio di fase 1/2a (NCT01735604), il trattamento con CAR T-cells anti-CD20 in 11 pazienti con linfoma non-Hodgkin ha finora mostrato tassi di risposta (ORR 81,8%) simili rispetto alle CAR T-cells anti-CD19 dopo 5 anni di follow-up. In uno studio di fase 1 nel quale si sono valutate CAR T-cells anti-CD22 in pazienti con leucemia linfoblastica acuta a cellule B, naïve o resistenti alle CAR T-cells anti-CD19, è stato riportato un tasso di remissione

completa del 73% nei 15 pazienti valutabili. Anche CAR T-cells anti-CD30 hanno mostrato di indurre risposte complete in uno studio di fase 1 su pazienti con linfoma di Hodgkin o linfoma anaplastico a grandi cellule.

CAR T-cells di nuova generazione

Per superare problematiche quali l'insorgere di resistenze che portano alla comparsa di recidive e per migliorare l'efficacia antitumorale, la specificità e il profilo di sicurezza della terapia con CAR T-cells, si stanno studiando diversi tipi di CAR T-cells di nuova generazione, tra cui le CAR T-cells bi-specifiche, le CAR T-cells che esprimono più di un CAR e le CAR T-cells 'armored'.

CAR T-cells bi-specifiche

Sebbene negli studi con le CAR T-cells anti-CD19 si siano ottenuti tassi di risposta completa iniziali interessanti, si è visto che un numero non trascurabile di pazienti recidiva, in alcuni casi a causa della perdita dell'antigene/epitopo bersaglio (recidiva CD19-negativa). La perdita (o la riduzione) dell'espressione del target, un fenomeno noto come evasione o fuga dell'antigene (*antigen escape*), è uno dei principali meccanismi di resistenza sviluppato dalle cellule tumorali nei confronti della terapia con le CAR T-cells. Per ovviare a tale inconveniente, si è ipotizzato che ingegnerizzare la cellula T con un CAR che colpisca non uno solo, bensì due antigeni/epitopi simultaneamente possa ridurre il rischio di recidiva, in quanto è sufficiente il legame a uno dei due per indurre l'attivazione delle CAR T-cells. Si stanno, dunque, sviluppando CAR T-cells chiamate tandem (CAR T-cells bi-specifiche): dotate di un singolo CAR bivalente, in grado di riconoscere due antigeni grazie alla compresenza di due domini di riconoscimento distinti per i due antigeni bersa-

glio, situati in tandem e separati da una cerniera flessibile (**figura 1**). Nelle CAR T-cells tandem la funzione effettrice viene attivata in modo sinergico quando entrambi gli antigeni bersaglio vengono riconosciuti, ma è comunque preservata anche in presenza di un solo antigene. Questa strategia non solo consente alle CAR T-cells di discriminare in modo ancora più efficiente le cellule tumorali da quelle sane, riducendo la tossicità, ma contribuirebbe anche a colpire quelle cellule tumorali nelle quali l'espressione di uno dei due antigeni bersaglio è assente o ridotta.

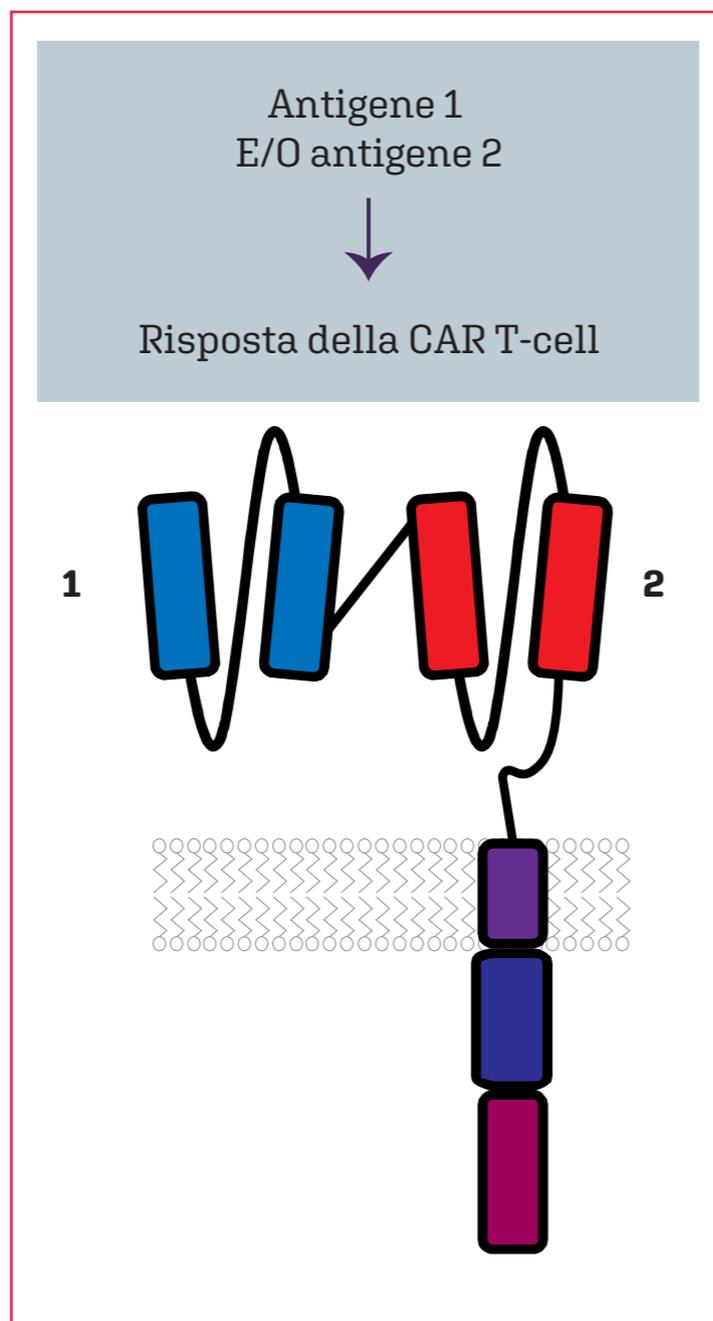


Figura 1. Struttura schematica di un CAR tandem.

Sono attualmente in corso diversi studi nei quali si stanno valutando CAR T-cells bispecifiche, in particolare CAR T-cells anti-CD19/CD22 (per esempio, NCT03448393) e anti-CD19/CD20 (per esempio, NCT03271515), per superare il problema della recidiva CD19-negativa e fornire un'opzione terapeutica ai pazienti il cui tumore è refrattario a terapie mirate contro uno specifico antigene.

CAR T-cells che esprimono più di un CAR

Un'alternativa alle CAR T-cells tandem è rappresentata dallo sviluppo di cellule T ingegnerizzate in modo da esprimere simultaneamente due o tre diversi CAR, ciascuno dei quali riconosce un diverso antigene tumorale e fornisce segnali complementari. Anche questa strategia, come la precedente, può migliorare il profilo di sicurezza e la selettività delle CAR T-cells verso le cellule tumorali, riducendo il rischio di effetti avversi fuori bersaglio, garantendo l'attivazione completa solo se tutti gli antigeni sono espressi dalla popolazione tumorale.

CAR T-cells di quarta generazione 'armored'

Per migliorare la capacità proliferativa delle CAR T-cells e la loro efficacia anti-tumorale, soprattutto per contrastare il problema dei fattori inibitori associati al microambiente tumorale, si stanno studiando CAR T-cells definite 'armored', di quarta generazione, che sfruttano diverse tecniche per superare l'ostacolo del microambiente tumorale immunosoppressivo. Tra queste vi è l'inserimento di geni che codificano per la produzione di citochine ad attività citotossica da parte delle cosiddette cellule TRUCK (*T cells redirected for universal cytokine-mediated killing*), le più studiate delle quali sono le TRUCK cells che secernono IL-12 (**figura 2**). Queste cellule combinano l'attacco delle CAR T-cells alle cellule tumorali con il rilascio a livello locale di una sostanza citotossica, come appunto l'IL-12, evitandone la tossicità sistemica. TRUCK cells anti-CD19 in grado di secernere IL-12 hanno mostrato in effetti un aumento della proliferazione cellulare e della citotossicità rispetto a controparti non secernenti IL-12 in studi preclinici. Sono allo studio anche TRUCK-cells in grado di produrre IFN- γ , il quale media la lisi delle cellule tumorali attraverso il legame con il suo recettore (IFN- γ R), che è espresso dallo stroma tumorale. In più, la produzione di citochine citotossiche attiva anche le cellule immunitarie residenti nel microambiente tumorale e riduce l'immunosoppressione mediata dal tumore, risultando così in un complessivo aumento dell'attività antitumorale.

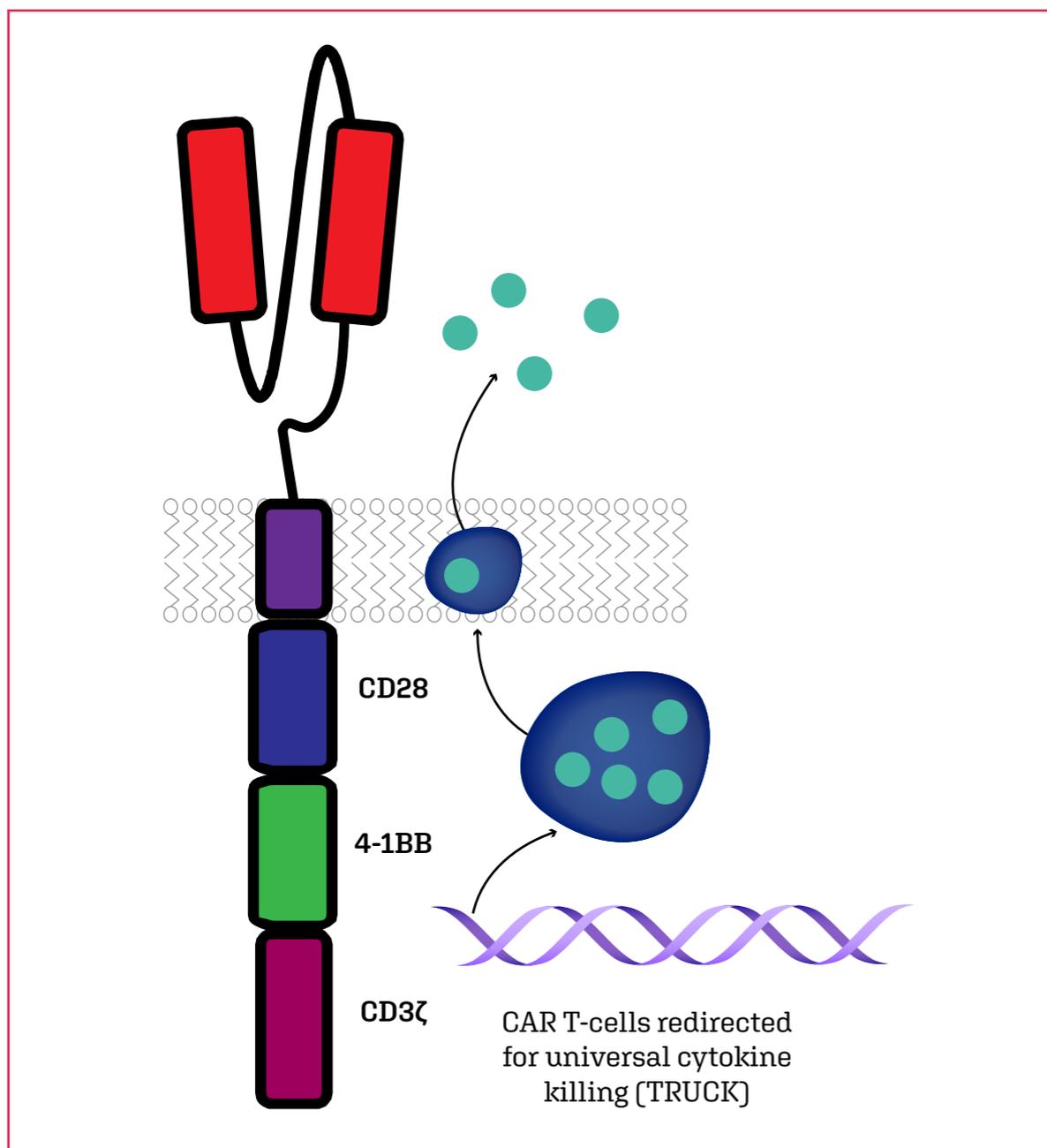


Figura 2. Le TRUCK cells.

CAR T-cells allogeniche e 'off the shelf'

Un possibile sviluppo futuro di estremo interesse della terapia con CAR T-cells riguarda lo sviluppo di CAR T-cells allogeniche o 'universali', prodotte a partire da cellule fornite da donatori sani, e 'off the shelf', cioè pronte da utilizzare al momento del bisogno. Questa strategia permetterebbe di ampliare l'accesso a questa terapia, semplificando l'iter produttivo, abbreviando il tempo necessario per arrivare alla prima infusione e, in ulti-

ma analisi, riducendo i costi, oltre a fornire cellule ingegnerizzate in alcuni casi più funzionali e potenti rispetto a quelle derivate dai pazienti (autologhe), visto che alcune neoplasie (in particolare la leucemia linfatica cronica) sono caratterizzate da una disfunzione delle cellule T che non può essere completamente corretta durante il processo di trasformazione in CAR T-cells. Al momento, tuttavia, ci sono ancora parecchi ostacoli da superare per avere CAR T-cells allogeniche efficaci e sicure, in particolare per quanto riguarda il rischio di *Graft versus Host Disease* (GvHD) e quello di rigetto delle cellule infuse. Sono comunque già partiti studi di fase 1 nei quali si stanno valutando questi tipi di CAR T-cells.

CAR T-cells per i tumori solidi

Le due CAR T-cells attualmente approvate dalle agenzie regolatorie e la maggior parte degli studi in corso su questa terapia riguarda il trattamento di tumori ematologici. Tuttavia, c'è grande interesse anche per lo sviluppo di CAR T-cells destinate al trattamento di neoplasie solide, sebbene gli studi eseguiti finora abbiano dato risultati nel complesso deludenti. Per ottenere esiti migliori occorre affrontare, infatti, molte sfide, legate alla difficoltà di trovare antigeni bersaglio idonei, alla tossicità e al fatto che la complessa struttura e vascolarizzazione della matrice tumorale, così come le molecole immunosoppressive e l'alto tasso metabolico presenti nel microambiente, influenzano negativamente sia la funzione sia la migrazione dei linfociti T, limitando l'efficacia dell'immunoterapia cellulare. Ad oggi, di fatto, non è stato ancora individuato un antigene espresso dalle cellule dei tumori solidi che sia paragonabile al CD19 come bersaglio per le neoplasie ematologiche. La maggior parte dei trial clinici in corso utilizza CAR T-cells di seconda e terza generazione, mentre pochi, finora, impiegano TRUCK-cells. Queste ultime, tuttavia, sembrano rappresentare una strategia promettente per il trattamento dei tumori solidi; infatti, a causa dell'enorme diversità fenotipica presente nelle

lesioni tumorali solide, un numero ragionevole di cellule tumorali non viene riconosciuto da un determinato CAR, ma la secrezione in loco di una citochina come l'IL-12 consente di promuovere un'attivazione citochina-mediata universale, andando a colpire anche quelle cellule tumorali che sarebbero invisibili alle CAR T-cells.

Impiego dell'editing genetico per la produzione delle CAR T-cells

Gli attuali metodi di ingegnerizzazione delle cellule T non consentono di controllare in quale punto del genoma va a inserirsi il gene del CAR. I recenti sviluppi della tecnologia CRISPR di editing genetico, tuttavia, consentono oggi un'integrazione del materiale genetico in una localizzazione precisa nel genoma della cellula ingegnerizzata. Sono già partiti, quindi, alcuni studi che stanno valutando efficacia e sicurezza di CAR T-cells prodotte con tale tecnologia. In un modello murino di leucemia linfoblastica acuta, la localizzazione del CAR permessa dal sistema CRISPR/Cas9 nel locus del gene della catena alfa del recettore delle cellule T (TRAC) ha mostrato di permettere un'espressione uniforme del CAR in tutte le CAR T-cells prodotte e un aumento della citotossicità. Inoltre, questa tecnologia consente di silenziare singoli geni immunosoppressivi come CTLA-4 o PD-1, migliorando così la funzione delle cellule T senza causare un blocco totale dei meccanismi di feedback negativo immunitario.

'Geni suicidi' per rendere le CAR T-cells più sicure

Per migliorare il profilo di sicurezza delle CAR T-cells, che sono caratterizzate da tossicità nuove rispetto alle terapie antitumorali convenzionali, e in alcuni casi potenzialmente molto pericolose, si stanno sperimentando diversi approcci. Il più noto e più studiato riguarda l'inclusione nel gene del CAR di 'interrut-

tori di sicurezza', attivabili qualora il paziente sviluppi tossicità gravi, per limitare l'effetto citotossico dovuto all'attivazione incontrollata delle CAR T-cells. Il sistema più studiato consiste nell'inserimento nel gene del CAR di una sequenza inducibile che codifica per la caspasi 9, un 'gene suicida' che, in presenza di un farmaco somministrabile al paziente in caso di tossicità, si attiva e, di conseguenza, promuove una rapida induzione dell'apoptosi nelle CAR T-cells, 'spegnendo' gli effetti tossici.

Combinazioni con altri trattamenti

Infine, una strategia attualmente perseguita in vari studi, per migliorare gli outcome della terapia, consiste nella combinazione delle CAR T-cells con altri trattamenti, tra cui farmaci a bersaglio molecolare, inibitori dei checkpoint immunitari o vaccini. Per esempio, molto promettente sembra essere la combinazione delle CAR T-cells con l'inibitore della tirosin chinasi di Bruton (BTK) ibrutinib per il trattamento di pazienti con leucemia linfatica cronica recidivata/refrattaria. Inoltre, nello studio ZUMA-6 si stanno valutando le CAR T-cells axi-cel seguite da un breve trattamento con l'inibitore di PD-L1 atezolizumab in pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B refrattario. Un gruppo del Ludwig Cancer Research dell'Università di Losanna sta esplorando anche la possibilità di utilizzare le CAR T-cells in combinazione con bassi dosi di radioterapia per incrementare l'efficacia del trattamento.

Bibliografia

- [1] M.M. Boyiadzis, et al. Chimeric antigen receptor (CAR) T therapies for the treatment of hematologic malignancies: clinical perspective and significance. *J ImmunoTher Cancer* 2018;6:137; <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0460-5>.
- [2] C.H. June, et al. Is autoimmunity the Achilles' heel of cancer immunotherapy? *Nat Med.* 2017;23(5):540-7;doi: 10.1038/nm.4321.
- [3] R.D. Paucek, et al. The Cellular Immunotherapy Revolution: Arming the Immune System for Precision Therapy. *Trends Immunol.* 2019;40(4):292-309;doi: 10.1016/j.it.2019.02.002.
- [4] G.L. Beatty, W.L. Gladney. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2015;21(4):687-92;doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1860.
- [5] Grada, Z. et al. TanCAR: A novel bispecific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;2:e105;doi: 10.1038/mtna.2013.32.
- [6] M. Ruella, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest.* 2016 Oct 3;126(10):3814-26;doi: 10.1172/JCI87366.
- [7] C.C. Kloss, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31(1):71-5;doi: 10.1038/nbt.2459.
- [8] S. Wilkie, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol.* 2012;32(5):1059-70;doi: 10.1007/s10875-012-9689-9.
- [9] Chmielewski, M. & Abken, H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(8):1145-54;doi: 10.1517/14712598.2015.1046430.
- [10] Curran, K. J. et al. Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression. *Mol Ther.* 2015;23(4):769-8;doi: 10.1038/mt.2015.4.
- [11] C. Graham, et al. Allogeneic CAR-T Cells: More than Ease of Access? *Cells.* 2018;7(10). pii: E155;doi: 10.3390/cells7100155.
- [12] S. Yu, et al. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):78;doi: 10.1186/s13045-017-0444-9.
- [13] J. Li, et al. Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: Lessons learned and strategies for moving forward. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):22;doi: 10.1186/s13045-018-0568-6.
- [14] Yu, S. et al. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):78;doi: 10.1186/s13045-017-0444-9.
- [15] T. Gargett, M.P.Brown. The inducible caspase-9 suicide gene system as a 'safety switch' to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T-cells. *Front Pharmacol.* 2014;5:235;doi: 10.3389/fphar.2014.00235. eCollection 2014.

La nuova frontiera delle terapie con CAR T-cells: le CAR T allogeniche

Le due CAR T-cells attualmente approvate dalle agenzie regolatorie, tisagenlecleucel e axi-cel, sono entrambe terapie autologhe: prodotte a partire dalle cellule T del paziente raccolte dal sangue. Si tratta, quindi, di terapie paziente-specifiche, che rappresentano un esempio perfetto di medicina personalizzata. Nonostante questi prodotti stiano rivoluzionando il trattamento dei tumori per i quali sono indicati e abbiano introdotto un vero e proprio cambio di paradigma, presentano allo stato attuale alcuni limiti. Per superare, almeno in parte, queste problematiche, molti laboratori di ricerca stanno cercando di sviluppare CAR T-cells allogeniche, 'off the shelf' (pronte all'uso): terapie che possano essere prodotte su larga scala a partire da cellule di un donatore sano e utilizzate per più pazienti, e che siano prontamente disponibili al momento del bisogno; anche la messa a punto e l'impiego di questi prodotti, tuttavia, presenta al momento alcuni ostacoli (figura 1).

I limiti delle CAR T-cells autologhe attuali

Proprio perché è specifico per il paziente, ogni trattamento con CAR T-cells autologhe può essere utilizzato per un pazien-

te alla volta e solo per quel paziente. La natura personalizzata della terapia implica, inoltre, un iter produttivo complesso, a volte non coronato da successo e che al momento richiede tempi piuttosto lunghi, non sempre compatibili con quelli di una malattia che può progredire rapidamente.

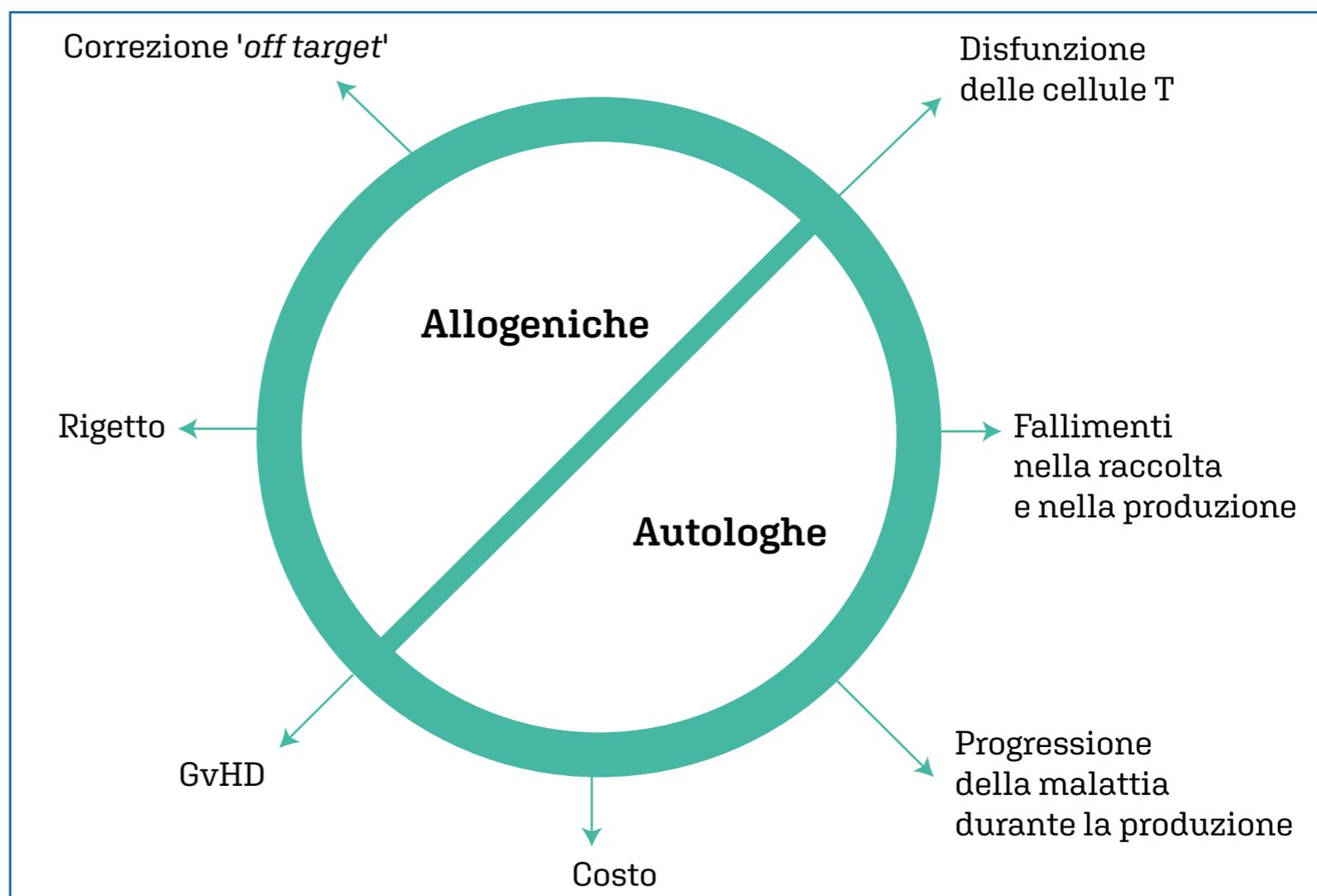


Figura 1. I principali limiti delle CAR T-cells autologhe (derivate dal paziente) e di quelle allogeniche (ottenute da un donatore sano).

Infatti, non sempre è possibile raccogliere e ingegnerizzare un numero adeguato di linfociti da pazienti che sono tipicamente linfopenici a causa della loro malattia o delle chemioterapie effettuate in precedenza. Per esempio, nello studio ELIANA, il trial che ha portato all'approvazione di tisagenlecleucel per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta, non si è potuto praticare l'infusione nel 7,6% dei pazienti a causa di 'problemi di produzione'; la percentuale è risultata ancora più alta nel caso del linfoma diffuso a grandi cellule B o il linfoma follicolare (13,2%) e si è visto che tutti i pazienti in cui la produzione è fallita avevano una conta linfocitaria assoluta < 300 cellule/ μ l.

Inoltre, dal momento che le CAR T-cells sono preparate per ogni singolo paziente a partire dal materiale raccolto con la leucoferesi, non è possibile arrivare a un prodotto finale completamente standardizzato, e caratteristiche chiave quali il numero di cellule, la loro vitalità, l'espressione del CAR e la quota di cellule T con fenotipo memoria possono essere sì monitorate, ma non saranno del tutto identiche tra una preparazione e l'altra.

Un altro limite è rappresentato dai tempi di produzione, che al momento sono almeno di 3-4 settimane, un arco temporale abbastanza lungo, durante il quale il paziente può andare in progressione. Di fatto, il progredire del tumore durante l'attesa delle CAR T-cells rappresenta ad oggi una barriera significativa di accesso a questa terapia. Sempre nello studio ELIANA, per esempio, il 7,6% dei pazienti arruolati/sottoposti alla leucoferesi è deceduto prima di poter essere trattato con le CAR T-cells. Per questo motivo, si sta lavorando attivamente per migliorare il processo produttivo, in modo da abbreviare i tempi.

Altri due problematiche attuali sono rappresentate dalla disfunzione alla quale vanno incontro le cellule T, un fenomeno che riguarda soprattutto la leucemia linfatica cronica in stadio avanzato, e dal fatto che il materiale raccolto con la leucoferesi dal paziente può essere contaminato da cellule tumorali, che in

alcuni casi possono anch'esse essere trasdotte con il CAR, generando 'CAR-blasti' che impediscono l'attacco delle CAR T-cells.

Infine, non da ultimo, un ostacolo importante per l'accesso alle due terapie risiede nel loro costo elevato: negli Stati Uniti 475.000 dollari per tisagenlecleucel e 373.000 per axi-cel, mentre nell'Unione europea il prezzo dei due prodotti è variabile a seconda delle politiche di rimborso adottate dai singoli Stati, ma è comunque molto alto.

Possibili rischi delle CAR T-cells allogene

Graft versus Host Disease

Un rischio insito nell'utilizzo di CAR T-cells allogene riguarda il possibile sviluppo di Graft versus Host Disease (GvHD). La GvHD dipende dal fatto che le cellule T derivate da donatori riconoscono una mancata corrispondenza dell'HLA attraverso il recettore delle cellule T (TCR) e attaccano i tessuti del paziente. La GvHD è un'importante complicanza del trapianto allogeneico di cellule staminali emopoietiche e nel caso delle CAR T-cells allogene, per rendere sicuro il trattamento, occorre adottare strategie per prevenirla.

Rigetto delle CAR T-cells

Un altro rischio è rappresentato dal possibile rigetto delle CAR T-cells. Le cellule T di un paziente possono riconoscere le cellule T infuse non HLA-compatibili come estranee e le rigettano. La generazione di cellule HLA-compatibili ha ridotto la frequenza del rigetto nel trapianto allogeneico di cellule staminali. Tuttavia, non tutti i pazienti hanno un donatore completamente compatibile, per cui sarebbe auspicabile avere un prodotto cellulare facilmente disponibile adatto a tutti i pazienti indipendentemente dal tipo di HLA. Un'intensificazione della linfodeplezione a cui è sottoposto il paziente potrebbe essere sufficiente per consentire alle CAR T-cells allogene di espandersi ed eliminare le cellule maligne, prima del recu-

pero del sistema immunitario dell'ospite. Per consentire ciò, si stanno sviluppando diverse strategie per rendere le cellule T del donatore resistenti agli agenti linfo-depletanti.

Potenziali rischi insiti nell'editing genetico

Una delle strategie utilizzate per produrre CAR T-cells allogene prevede l'impiego di cellule T di donatori sani trattate con tecniche di editing genetico, che permettono di correggere e modificare il genoma, per esempio in modo da inattivare o eliminare il TCR $\alpha\beta$, così da scongiurare la GvHD. L'editing genetico, però, potrebbe comportare rischi non ancora conosciuti. Quando i punti interessati dall'editing sono più d'uno, infatti, potrebbero avvenire correzioni 'off-target', cioè in punti del genoma diversi da quelli desiderati, con conseguenze a oggi poco prevedibili, ma potenzialmente dannose.

Strategie allo studio per lo sviluppo di CAR T-cells allogene

Sono attualmente allo studio diverse strategie per sviluppare CAR T-cells allogene. Per esempio, queste cellule possono essere ottenute dallo stesso donatore che le ha fornite per il trapianto allogeneico al quale il paziente può essere stato sottoposto in precedenza, e rispetto al quale è HLA-compatibile, oppure a partire da cellule di un donatore qualsiasi sottoposte a una procedura di editing genetico per consentirne la somministrazione anche a pazienti non HLA-compatibili.

Cellule T derivate dal donatore del trapianto allogeneico

Il trapianto allogeneico di cellule staminali rappresenta lo standard di cura per i pazienti con leucemia linfoblastica acuta ad alto rischio che abbiano un donatore HLA-compatibile e non è raro che i pazienti adulti ricadano dopo il trapianto; pertanto, in alcuni studi si è valutato l'impiego di CAR T-cells derivate dallo stesso donatore che le ha fornite per il trapianto. Dato che questi donatori sono HLA-compatibili con il paziente, le

CAR T-cells generate da essi hanno meno probabilità di causare GvHD e, poiché sono identiche al compartimento ematopoietico trapiantato in precedenza, non dovrebbero attaccarlo. I primi studi hanno mostrato, in effetti, un'incidenza della GvHD minima rispetto all'infusione di linfociti del donatore standard (DLI), con la quale il tasso di GvHD acuta è del 40-60%.

Da notare che il tipo di dominio co-stimolatorio utilizzato nel CAR sembra avere un impatto sul grado di GvHD, che sarebbe inferiore nel caso di CD28.

Un possibile limite delle CAR T-cells prodotte a partire dallo stesso donatore del trapianto risiede nel fatto che, sebbene rappresentino una fonte alternativa di cellule per un gruppo selezionato di pazienti e consentano di superare il problema della disfunzione delle cellule T, non sono cellule 'pronte all'uso'. Infatti, vanno preparate per ogni singolo paziente, il cui tumore deve essere tenuto sotto controllo durante la produzione. Inoltre, va tenuto presente che il trapianto allogeneico è una strategia terapeutica usata di rado in caso di linfoma diffuso a grandi cellule B o leucemia linfatica cronica recidivati, e certamente non sarebbe un ponte pratico per arrivare a fornire CAR T-cells allogene.

Cellule T derivate da donatori sani e sottoposte a editing genetico

CAR T-cells 'universali' e pronte all'uso potrebbero eliminare molti dei problemi legati ai fallimenti nella raccolta e nella produzione delle cellule associate alle loro controparti autologhe o derivate dai donatori del trapianto.

Sebbene questa strategia presenti anch'essa i suoi ostacoli, di recente sono stati fatti progressi tecnologici promettenti per superarne alcuni. Per esempio, per prevenire la GvHD, il recettore TCR $\alpha\beta$ può essere eliminato (knocked out, KO) mediante diverse tecniche di editing genetico. Il TCR $\alpha\beta$ è un eterodimero e le catene alfa e beta devono essere presenti entrambe affin-

ché sia espresso. La catena alfa è codificata da un singolo gene (TRAC), mentre la catena beta da due, perciò il KO di TRCA attraverso l'utilizzo di nucleasi è la strategia di scelta per evitare l'espressione del TCR.

Le nucleasi agiscono come 'forbici molecolari' utilizzate per effettuare l'editing del genoma. Attualmente sono allo studio diverse tecniche di editing genetico utilizzate per il KO del TCR $\alpha\beta$ al fine di produrre CAR T-cells da donatori sani, due delle quali sono, rispettivamente, le nucleasi ad anello di zinco e la tecnologia TALEN[®], una piattaforma brevettata dalla *biotech* Collectis (**tabella 1**).

La maggior parte delle strategie utilizzate per produrre CAR T-cells ottenute da donatori sani si basano su due passaggi: primo, l'introduzione del CAR con un vettore virale, seguita dal silenziamento del gene TRAC usando una nucleasi. Utilizzando questo metodo, analogamente a quanto avviene per le CAR T-cells autologhe, i geni che codificano per il CAR si integrano in modo semi-casuale nel genoma della cellula T, con livelli di espressione variabili. Alcuni gruppi, tuttavia, stanno sviluppando tecniche con le quali il gene del CAR è incorporato direttamente nel locus del TRAC, il che permette di introdurre il CAR e impedire l'espressione del TCR $\alpha\beta$ endogena in un unico passaggio.

Altre strategie

Oltre alle cellule T derivate dal donatore del trapianto allogenico e a quelle derivate da donatori sani e sottoposte a editing genetico, si stanno valutando altre possibili fonti per la produzione di CAR T-cells allogeniche. Una di esse è rappresentata dalle CAR T-cells derivate da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), al fine di eliminare la necessità di donazioni ripetute da parte di volontari sani e creare una banca di linee di CAR T-cells con diversi tipi di HLA. Un'altra possibilità, sul-

	Sito di legame	Nucleasi
Nucleasi a dita di zinco	Proteina	FOK1
TALEN [®]	Proteina	FOK1
Crispr/Cas9	gRNA	Cas9
MegaTAL nucleasi	Proteina	Meganucleasi

Tabella 1. Tecniche di editing genetico utilizzate per evitare l'espressione del TCR $\alpha\beta$.

la quale stanno puntando anche ricercatori italiani, tra cui i gruppi dell'Ospedale San Gerardo di Monza e dell'Ospedale Papa Giovanni XXIII di Bergamo, coordinati rispettivamente dai professori Andrea Biondi e Alessandro Rambaldi, è rappresentata dalle cellule mononucleate da cordone ombelicale.

Ricerche in corso sulle CAR T-cells allogeniche

Molti gruppi stanno attualmente lavorando alla messa a punto di CAR T-cells allogeniche e le ricerche sono condotte da aziende, da istituzioni accademiche, o in partnership tra queste due realtà.

Pioniera nello sviluppo di queste CAR T-cells è la *biotech* francese Collectis, che ha nella sua *pipeline* ben otto terapie allogeniche, due delle quali già in fase 1 e sviluppate in collaborazione con Servier e la californiana Allogene: UCART19, destinata a pazienti pediatrici e adulti con leucemia linfoblastica acuta CD19+ ricaduti o refrattari, sulla quale sono stati presentati i primi risultati al congresso dell'American Society of Hematology (ASH) nel 2018, e ALLO-501, per il trattamento di pazienti con linfoma non-Hodgkin ricaduto/refrattario, entrambe dirette contro l'antigene CD19. Tutti i prodotti di Collectis prevedono l'impiego della tecnologia brevettata di editing genetico TALEN[®] e, stando a quanto riferito dall'azienda, con ogni lotto si potrebbero trattare fino a 100 pazienti.

Un esempio di collaborazione pubblico-privato è quello della tecnologia che sta mettendo a punto un team della University of California Los Angeles (UCLA) in collaborazione con Kite/Gilead. I ricercatori californiani sono riusciti a trasformare cellule staminali pluripotenti (che possono essere trasformate in quasi tutti i tipi di cellule) in cellule T mature attraverso strutture chiamate organoidi del timo artificiali, che simulano l'ambiente in cui le cellule staminali emopoietiche si trasformano in cellule T nell'organismo. Il loro prossimo obiettivo è quello di combinare questa tecnica con l'editing genetico in modo da produrre CAR T-cells allogeniche pronte all'uso, che siano più facilmente accessibili per i pazienti.

Anche Fate Therapeutics, in collaborazione con il gruppo di Micheal Sadelain, del Memorial Sloan Kettering Cancer Center di New York, sta lavorando alla messa a punto di CAR T 'pronte all'uso', create a partire da cellule staminali pluripotenti, in particolare le iPSC, che hanno una capacità di rinnovamento

I principali possibili vantaggi delle CAR T-cells allogeniche:

- maggiore facilità di produzione;
- tempi di produzione più brevi e quindi tempi di attesa ridotti per i pazienti;
- minor costo;
- pronta disponibilità della terapia al momento del bisogno;
- ampliamento del numero di pazienti che possono accedere alla terapia.

Possibili limitazioni delle CAR T-cells allogeniche:

- rischio di rigetto
- rischio di GvHD
- correzioni in punti sbagliati in caso di editing genetico

praticamente illimitata e possono essere utilizzate per creare una banca cellulare. Il loro prodotto si chiama FT819 CAR T-cells e presenta altre due innovazioni tecnologiche: l'eliminazione del TCR, per evitare la GvDH, e un doppio bersaglio (grazie alla presenza del recettore Fc CD16, oltre al CAR anti-CD19).

L'Italia, nel frattempo, non sta a guardare. La *biotech* Molmed, per esempio, si sta muovendo in questa direzione e sta iniziando a sviluppare cellule allogeniche derivate non da cellule T, bensì da cellule Natural Killer, cioè CAR NK-cells, grazie anche a un accordo di ricerca firmato nel 2018 con Glycostem. I ricercatori dell'Ospedale San Gerardo di Monza e quelli dell'Ospedale Papa Giovanni XXXIII di Bergamo hanno già avviato uno studio di fase 1 nel quale si utilizzano cellule allogeniche chiamate CARCIK cells, preparate a partire da un tipo particolare di linfociti T citotossici, chiamati citokine-induced killer (CIK) cells e ottenuti dai donatori del trapianto, per il trattamento di pazienti pediatrici e adulti con leucemia linfoblastica acuta ricaduti dopo il trapianto e resistenti anche ai farmaci più innovativi oggi disponibili. Anche il gruppo del professor Franco Locatelli, all'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, sta già lavorando a un progetto di sviluppo di cellule allogeniche prodotte a partire non da cellule T, bensì da cellule NK.

Ancora molta strada da fare

Sebbene gli sforzi dei tanti laboratori che stanno studiando come produrre CAR T-cells allogeniche 'pronte all'uso' appaiano promettenti, è importante tenere presente che c'è ancora molta strada da fare per avere a disposizione prodotti di questo tipo con i quali trattare i pazienti nella pratica clinica. Nella maggior parte dei casi gli studi sono ancora in fase preclinica; le terapie in fase più avanzata di sviluppo, come UCART19, sono arrivate solo alla fase 1. Date le potenzialità di questi approcci di rendere le terapie con CAR T-cells più accessibili, tuttavia, sarà molto interessante seguire i progressi in questo settore.

ATTUALI APPLICAZIONI DELLE CAR T-CELLS E ASPETTI CLINICI

Applicazioni cliniche delle CAR T-cells in ambito ematologico

Effetti avversi delle CAR T-cells: quali sono e come si affrontano

Che cos'hanno insegnato finora gli studi sulle CAR T-cells anti-CD19

CAR T-cells, una terapia possibile anche per i tumori solidi?



Iscriviti alla newsletter
di PharmaStar

PHARMASTAR[★]
il Giornale online sui Farmaci

Applicazioni cliniche delle CAR T-cells in ambito ematologico

Al momento esistono prodotti a base di CAR T-cells approvati sia negli Stati Uniti sia nell'Unione europea (Italia compresa) fondamentalmente per due tumori di tipo ematologico: la leucemia linfoblastica acuta e il linfoma diffuso a grandi cellule B (uno dei due è approvato anche per altri tipi di linfoma non-Hodgkin aggressivo, tra cui il linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B). Sono attualmente in corso vari trial su queste applicazioni cliniche sia con i prodotti già approvati sia con altre CAR T-cells ancora sperimentali. Inoltre, vi sono svariate CAR T-cells allo studio anche per altre possibili applicazioni sempre in ambito ematologico, in particolare il mieloma multiplo e la leucemia linfatica cronica.

Leucemia linfoblastica acuta

La leucemia linfoblastica acuta è la prima neoplasia in assoluto e la prima neoplasia ematologica per la quale è stato approvato un prodotto a base di CAR T-cells. Nell'agosto 2017, infatti, l'FDA ha dato il suo via libera a **tisagenlecleucel**, le CAR T-cells anti-CD19 sviluppate da Novartis per il trattamento di pazienti pediatrici e giovani adulti (fino a 25 anni) con leucemia linfoblastica acuta a cellule B refrattaria o in seconda o ulteriore recidiva. L'ok dell'agenzia Usa ha segnato un momento storico, in quanto si è trattato della prima approvazione di una terapia a base di CAR T-cells a livello mondiale, ma anche della prima volta che l'ente ha approvato una terapia genica e una terapia antitumorale prima in una popolazione pediatrica che in una popolazione adulta. Un anno dopo (fine agosto 2018), anche l'Ema ha autorizzato l'immissione in commercio del prodotto nei Paesi membri dell'Unione europea, con un'in-

dicazione analoga (pazienti pediatrici e giovani fino a 25 anni con leucemia linfoblastica acuta a cellule B refrattari, in recidiva post-trapianto o in seconda o ulteriore recidiva). Attualmente il prodotto è disponibile in alcuni Paesi europei tra cui anche l'Italia, in quanto il 7 agosto scorso l'Aifa ha dato il via libera alla rimborsabilità di questa terapia secondo le indicazioni approvate dall'Ema.

I risultati ottenuti

La storia delle CAR T-cells di fatto, è iniziata proprio con i primi trial monocentrici su adulti e bambini con leucemia linfoblastica acuta (compreso lo studio della University of Pennsylvania nel quale è stata arruolata Emily Whitehead, la prima bambina al mondo ad essere stata sottoposta a questa terapia). Nonostante ampie differenze nel disegno, che rendono difficile un confronto testa a testa fra questi trial, tutti hanno mostrato percentuali di risposta al trattamento simili e molto promettenti, evidenziando le potenzialità delle CAR T-cells per il trattamento di questa neoplasia ematologica.

Questi lavori iniziali hanno aperto la strada a studi multicentrici più ampi, tra cui lo studio registrativo **ELIANA** (NCT02435849) che ha portato all'approvazione di tisagenlecleucel per la leucemia linfoblastica acuta, e molti di essi sono in corso e stanno tuttora arruolando pazienti. Questi studi hanno dimostrato che il trattamento con una singola infusione endovenosa di CAR T-cells anti-CD19 ha indotto costantemente una remissione completa nella stragrande maggioranza dei pazienti, soggetti ad alto rischio e pesantemen-

te pretrattati. In vari trial, nonostante differenze di struttura del CAR utilizzato (sia nel dominio di riconoscimento sia nei domini co-stimolatori) e differenze nel processo produttivo, si sono osservati tassi di remissione elevati, del 70-90%, che hanno evidenziato sia la fattibilità sia l'efficacia di questa terapia rivoluzionaria.

Inoltre, questi studi hanno dimostrato che il trattamento con le CAR T-cells, pur essendo per ora limitato al setting della malattia recidivata/refrattaria, è applicabile e può portare a risposte complete un'ampia gamma di pazienti, tra cui quelli che hanno avuto recidive multiple dopo essere stati trattati con diversi regimi precedenti, compresi coloro che hanno recidivato dopo il trapianto di cellule staminali; si sono ottenute remissioni in anche in pazienti con malattia cromosoma Philadelphia-positiva (Ph+), con leucemia linfoblastica acuta primariamente refrattaria e perfino con sindrome di Down, tutte popolazioni storicamente difficili da trattare; inoltre, si sono osservate risposte anche in pazienti ricaduti dopo essere stati trattati in precedenza con una terapia anti-CD19, come l'anticorpo bispecifico blinatumomab, e in pazienti con malattia extramidollare.

Questioni aperte

Nonostante la portata rivoluzionaria dei risultati ottenuti finora con CAR T-cells autologhe dirette contro l'antigene CD19, vi sono ancora molte questioni aperte e molte sfide da affrontare. Per esempio, resta ancora da stabilire quale sia il ruolo del trapianto dopo un trattamento con CAR T-cells, occorre capire come mai non tutti i pazienti rispondono e, anche fra coloro che rispondono, alcuni ricadono, nonché valutare se questa terapia sia applicabile anche alla malattia con coinvolgimento del sistema nervoso centrale (SNC). Inoltre, occorre lavorare molto per capire meglio le tossicità associate al trattamento e migliorarne la gestione.



Prof. Armando Santoro

CAR T-cells per la leucemia linfoblastica acuta, a che punto siamo?

 **GUARDA IL VIDEO**

Anche se le CAR T-cells anti-CD19 come tisagenlecleucel hanno portato a remissioni durature in molti pazienti, non si è ancora in grado di predire quali pazienti probabilmente saranno curati in via definitiva dal trattamento e quali no. Il fatto che alcuni pazienti rispondano, ma poi ricadano, ha acceso il dibattito fra gli esperti riguardo alla possibilità che questa forma di immunoterapia cellulare rappresenti un trattamento definitivo, da fare una sola volta, o se debba essere considerato un trattamento di consolidamento e un ponte verso il trapianto di cellule staminali.

È noto che la negatività della MRD prima del trapianto è un fattore prognostico di primaria importanza per prevedere una migliore sopravvivenza libera da leucemia nei pazienti sottoposti al trapianto di cellule staminali. Le CAR T-cells si sono dimostrate altamente efficaci nell'indurre remissioni con MRD negativa, ma la durata nel tempo dell'MRD-negatività è risultata meno prevedibile. Pertanto, la remissione indotta dalle CAR T-cells potrebbe offrire la finestra ideale per procedere al trapianto, specialmente per i pazienti che non lo avevano già fatto

prima e refrattari alle terapie standard, offrendo loro le migliori chance di sopravvivere senza recidivare. Almeno un paio di studi sulla popolazione pediatrica, uno condotto da ricercatori del Pediatric Oncology Branch (POB) dell'NCI e un altro dal Seattle Children's Hospital, hanno fornito dati a supporto di questo concetto, evidenziando nei pazienti *responder* ed MRD-negativi sottoposti al trapianto dopo la terapia con le CAR T-cells un tasso di ricadute inferiore rispetto a quelli non sottoposti alla procedura. Nonostante la tendenza verso un miglioramento della sopravvivenza libera da recidiva osservata nei pazienti pediatrici sottoposti al trapianto di staminali dopo un trattamento riuscito con CAR T-cells anti-CD19, ad oggi il trapianto non è ancora raccomandato da tutti nella popolazione pediatrica. Inoltre, i pochi dati disponibili sulla popolazione adulta suggeriscono che in questo gruppo di pazienti il trapianto praticato dopo il trattamento con le CAR T-cells potrebbe non avere un vantaggio di sopravvivenza comparabile a quello osservato nel bambino. Servono quindi ulteriori studi, randomizzati e con un follow-up di lunghezza adeguata, per dirimere la questione della validità del trapianto dopo le CAR T-cells e definire uno *standard of care*.

Riguardo all'applicabilità ai pazienti con malattia estesa al SNC, l'esperienza ad oggi è molto scarsa, in quanto la presenza di una malattia con coinvolgimento del SNC sintomatica o avanzata ha finora rappresentato un criterio di esclusione in molti studi. In un numero limitato di pazienti, il trattamento con le CAR T-cells si è dimostrato efficace nell'eradicare la leucemia nel SNC, ma non si sa ancora quali saranno gli outcome a lungo termine.

Come migliorare i risultati e prevenire le ricadute

Nonostante i promettenti risultati ottenuti e gli alti tassi di remissione osservati nei vari studi effettuati con CAR T-cells anti-CD19, una quota non trascurabile di pazienti sottoposti a questa terapia finisce per ricadere. Quello della recidiva, dunque, rappresenta tuttora un problema significativo e sono allo studio

diverse strategie per contrastarlo, mirate soprattutto ad aumentare la persistenza delle CAR T-cells, a trovare nuovi antigeni bersaglio oltre al CD19 e a sviluppare CAR T-cells bi-specifiche, in grado di riconoscere due bersagli diversi simultaneamente. Le ricadute possono essere CD19-positive (CD19+) o CD19-negative (CD19-); questi due tipi di recidiva hanno alla base meccanismi diversi e quindi presentano per i clinici e i ricercatori sfide diverse. Si è visto che quella CD19+ si sviluppa raramente durante la fase di persistenza delle CAR T-cells nell'organismo del paziente e di aplasia delle cellule B che si osserva dopo l'infusione. La persistenza delle CAR T-cells, in particolare, è uno dei fattori chiave nel determinare gli outcome a lungo termine di questa terapia; come aumentarla rappresenta, pertanto, un'area di ricerca molto attiva per la prevenzione delle recidive.

Innanzitutto, la persistenza di queste cellule sembra essere influenzata dalla struttura del CAR utilizzato, e in particolare dal tipo di dominio co-stimolatorio; da questo punto di vista, 4-1BB sembra conferire alle cellule una permanenza superiore rispetto a CD28. Anche il regime scelto per la linfodeplezione alla quale devono essere sottoposti i pazienti nei giorni precedenti l'infusione sembra avere la sua importanza, e quello basato sulla combinazione di fludarabina e ciclofosfamide si è finora dimostrato superiore rispetto ad altri. Alcuni autori hanno proposto di trattare i pazienti con più di un'infusione di CAR T-cells, ma i risultati ottenuti finora con quest'approccio sono contrastanti, anche se sembrano essere più favorevoli quando si somministra una seconda infusione durante il periodo di aplasia delle cellule B.

Basarsi solo sul CD19 come antigene bersaglio ha favorito lo sviluppo di recidive CD19-, rendendo sempre più importante la ricerca di target alternativi e di combinazioni di CAR T-cells. Sono in corso, infatti, diversi studi nei quali si stanno valutando nuovi bersagli, tra cui il CD22. Nel novembre 2017, per esempio, sono stati pubblicati su Nature Medicine i risultati di

Che cos'è la leucemia linfoblastica acuta?

La leucemia linfoblastica acuta è un tumore del sangue che si origina dai precursori dei linfociti presenti nel midollo osseo. Queste cellule vanno incontro a una trasformazione che impedisce loro di completare il processo di maturazione fino a linfocita maturo e le spinge a moltiplicarsi in modo incontrollato. La conseguenza è una produzione eccessiva di linfociti immaturi (linfoblasti) che impediscono una normale produzione delle altre cellule del sangue da parte del midollo osseo.

Esistono tre sottotipi principali di leucemia linfoblastica acuta, a seconda del tipo di linfocita che va incontro alla trasformazione neoplastica:

- a cellule B, la più comune (circa l'85% dei casi);
- a cellule T (circa il 15% dei casi);
- a cellule NK (molto più rara).

Questa forma di leucemia si definisce acuta perché esordisce all'improvviso e progredisce rapidamente, ragion per cui, una volta diagnosticata, richiede un trattamento immediato.

Il quadro clinico

I segni e sintomi più frequenti, specie in età pediatrica, sono legati a un iper-accumulo dei linfoblasti nel midollo osseo, che ne riduce la funzionalità, e rappresentati principalmente da:

- anemia (dovuta alla carenza di globuli rossi) e quindi pallore, debolezza, affaticabilità, tachicardia;
- lividi sulla cute o sanguinamenti a livello delle mucose, per esempio alle gengive e, in alcuni casi, anche emorragie gravi (dovuti alla carenza di piastrine);
- infezioni (dovute alla carenza di globuli bianchi sani, non leucemici, che riduce le difese immunitarie).

Le cellule leucemiche possono poi infiltrarsi anche nel sistema linfatico e in altri organi al di là del midollo osseo causando, a seconda della parte colpita:

- ingrossamento dei linfonodi (presente in un terzo dei casi in età pediatrica);
- ingrossamento del fegato e/o della milza (presente nel 60% dei casi in età pediatrica);
- dolori ossei e/o articolari (presenti circa in un terzo dei pazienti pediatrici);
- cefalea, nausea e vomito, in caso di penetrazione dei linfoblasti nel sistema nervoso centrale.

Quanto è frequente?

La leucemia linfoblastica acuta è considerata una neoplasia relativamente rara: rappresenta circa il 9,5% di tutte le leucemie e in Italia si stima che colpisca ogni anno circa 750 persone. Tuttavia, il tumore è decisamente più frequente in età pediatrica, nella quale rappresenta i tre quarti di tutte le leucemie, con un'incidenza pari a circa 30 casi/anno/milione di soggetti nella fascia di età 0-17 anni e un picco di incidenza fra i 2 e i 5 anni. Di fatto, è l'unica forma di leucemia più comune nei bambini rispetto agli adulti ed anche la forma più comune di tumore pediatrico, rappresentando circa il 25% delle diagnosi di cancro nella fascia di età 0-14 anni. Inoltre, più della metà dei casi è diagnosticata in soggetti con meno di 29 anni.

Come si cura?

Il trattamento della leucemia linfoblastica acuta può essere considerato a buon diritto uno dei successi dell'oncologia moderna. In pochi decenni, infatti, la sopravvivenza è aumentata notevolmente, arrivando a superare l'80-90% a 5 anni. I pazienti che non rispondono alla terapia iniziale, tuttavia, hanno ancora poche opzioni a disposizione e costitu-

iscono una popolazione per la quale vi è un bisogno clinico non soddisfatto.

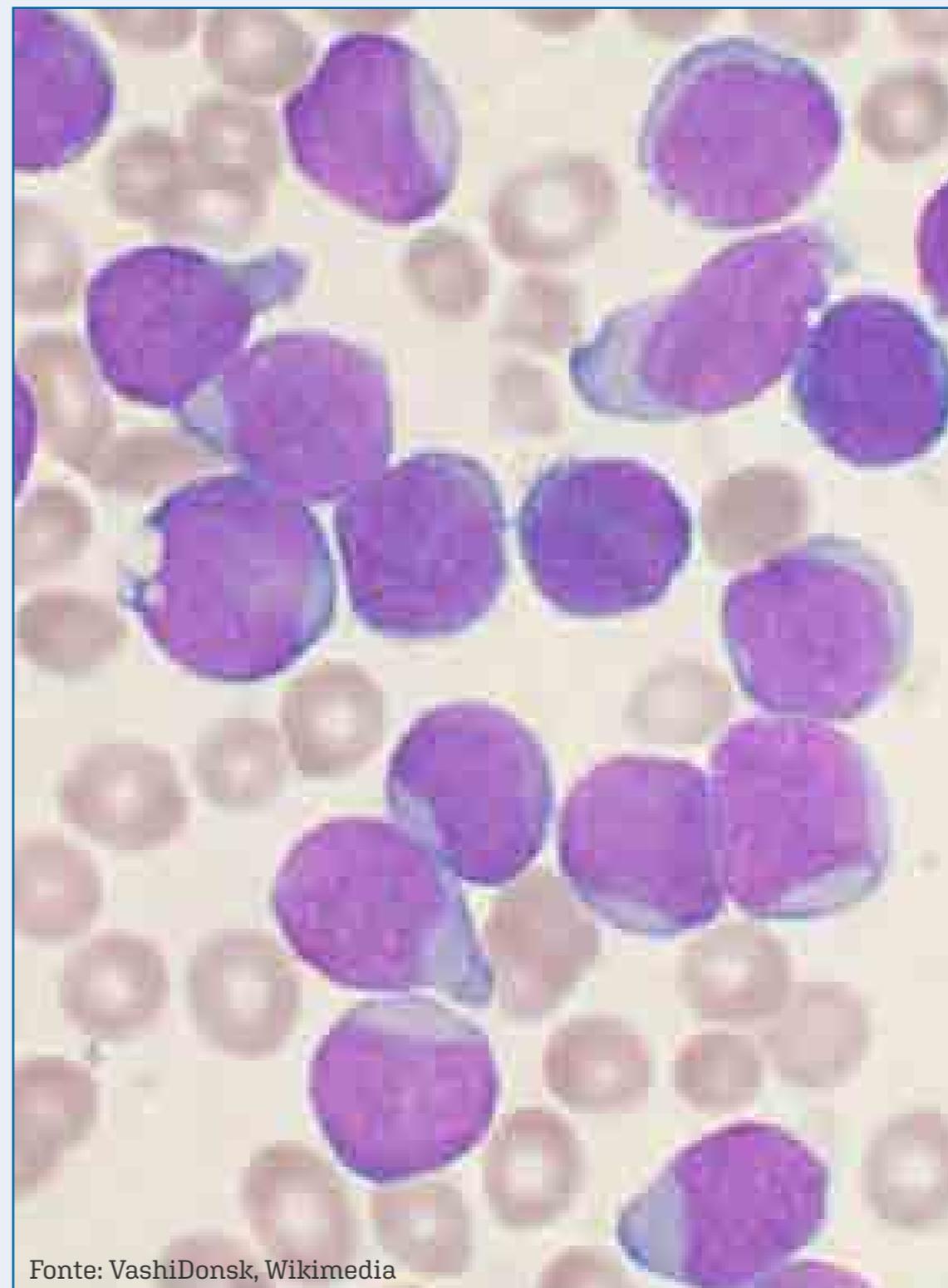
Anche se il trattamento può differire a seconda del particolare sottotipo di leucemia linfoblastica acuta, la terapia iniziale (di prima linea) è rappresentata nella stragrande maggioranza dei casi dalla chemioterapia, somministrata secondo protocolli ben definiti e articolata in quattro fasi:

- 1.** induzione della remissione (circa 2 mesi), con una scomparsa delle cellule leucemiche nel sangue e nel midollo e una normalizzazione del numero dei linfoblasti e delle altre cellule del sangue;
- 2.** consolidamento della remissione (circa 4 mesi), con farmaci diversi rispetto a quelli utilizzati per l'induzione e un trattamento più aggressivo (specie nei pazienti ad alto rischio), al fine di eliminare l'eventuale malattia minima residua ancora presente;
- 3.** reinduzione (circa 3 mesi) con gli stessi farmaci o farmaci simili a quelli usati durante l'induzione;
- 4.** mantenimento, volto a garantire un controllo a lungo termine della malattia e attuato con farmaci orali, fino a completare un periodo di terapia complessiva di 2 anni.

I pazienti a maggior rischio di ricaduta della malattia nel sistema nervoso centrale possono essere sottoposti anche a radioterapia craniale.

Solo in una piccola percentuale di casi, quelli noti per non rispondere in modo ottimale alla terapia farmacologica e/o a maggior rischio di ricaduta (circa il 5-8%) si utilizza già in prima linea il trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Dopo la terapia di prima linea, l'80-90% dei pazienti adulti raggiunge una remissione completa; di questi, tuttavia, il



Fonte: VashiDonsk, Wikimedia

Figura. Striscio ottenuto da aspirato di midollo osseo di un paziente affetto da leucemia linfoblastica acuta da precursori delle cellule B.

40-45% finisce per andare incontro a una recidiva. In età pediatrica, con gli attuali protocolli terapeutici, il tasso di guarigione è molto alto e si attesta intorno all'80-85%, mentre il 15-20% dei casi va incontro a recidiva, che, nella maggior parte dei casi (80%) si presenta durante la terapia o nei primi 2 anni successivi.

Nei pazienti che non rispondono (refrattari) o ricadono dopo la terapia iniziale, come terapia di seconda linea si può ricorrere di nuovo alla chemioterapia e, spesso, anche al tra-

pianto di cellule staminali, che è un'opzione a volte risolutiva, ma non sempre praticabile. In questi gruppi di pazienti si possono utilizzare eventuali trattamenti innovativi e/o sperimentali, tra cui spicca l'immunoterapia con anticorpi monoclonali, coniugati anticorpo-farmaco (come inotuzumab ozogamicin), anticorpi bispecifici (come blinatumomab) oppure, per la leucemia linfoblastica acuta a cellule B, con le CAR T-cells. Resta da capire, tuttavia, come questi trattamenti vadano integrati con il trapianto di cellule staminali e quale sia la sequenza ottimale con la quale utilizzarli.

uno studio di fase 1, il primo sull'uomo, nel quale si sono utilizzate CAR T-cells anti CD-22 in pazienti pediatrici e adulti con leucemia linfoblastica acuta e linfoma diffuso a grandi cellule B, al primo trattamento con CAR T-cells oppure già trattati con CAR T-cells anti-CD19 e ricaduti, con recidiva CD19+ o CD19-; nei pazienti valutabili (11 su 15), gli autori hanno riportato una percentuale di remissione completa del 73%. Questo studio è stato anche il primo su pazienti con leucemia linfoblastica acuta trattati con CAR T-cells dirette contro un antigene diverso da CD19 a mostrare risposte comparabili.

Un altro approccio possibile per ridurre il rischio di ricaduta è rappresentato dallo sviluppo di CAR T-cells bi-specifiche (o CAR T-cells tandem). Dato che in un certo numero di pazienti la ricaduta è dovuta alla perdita dell'antigene bersaglio, si è pensato che mettere a punto un CAR in grado di riconoscere e legare due bersagli diversi contemporaneamente possa aiutare a superare quest'ostacolo. Attualmente sono in corso negli Stati Uniti almeno tre studi di fase 1 nei quali si stanno testando CAR T-cells bi-specifiche dirette sia contro l'antigene CD19 sia contro l'antigene CD22. Sono inoltre all'orizzonte, ancora in fase di sviluppo preclinico, altre CAR T-cells bi-specifiche, per esempio CAR T-cells antiCD19/CD20.

Linfoma diffuso a grandi cellule B

Esistono attualmente due prodotti a base di CAR T-cells approvati dall'Fda, dall'Ema e ora anche dall'Aifa per i pazienti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B (oltre che per altri tipi di linfoma non-Hodgkin a cellule B molto meno frequenti): **axi-cel**, sviluppato da Kite/Gilead, e **tisagenlecleucel**, sviluppato da Novartis, aventi entrambi come bersaglio l'antigene CD19.

Il primo ad essere registrato è stato axi-cel, che nell'ottobre 2017 ha avuto l'ok dell'Fda come trattamento per i pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B recidivante o refrattario, trattati in precedenza con due o più linee di terapia sistemica (oltre che per i pazienti adulti con linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B, linfoma a cellule B di alto grado o linfoma diffuso a grandi cellule B derivante da un linfoma follicolare); in Europa, il prodotto è stato autorizzato dall'Ema nell'agosto 2018 come trattamento per i pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B o linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B, refrattario o recidivante dopo due o più linee di terapia sistemica, e nel novembre 2019 ha ricevuto anche il via libera dell'Aifa per queste stesse indicazioni.

Tisagenlecleucel ha avuto il via libera dell'Fda come trattamento per i pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma a

cellule B di alto grado o linfoma diffuso a grandi cellule B derivante da un linfoma follicolare, refrattario o recidivante dopo due o più linee di terapia sistemica, nel maggio 2018; 3 mesi dopo (in concomitanza con l'approvazione di axi-cel) il prodotto è stato autorizzato anche dall'EMA per il trattamento dei pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B recidivato o refrattario dopo due o più linee di terapia sistemica e nell'agosto 2019 ha avuto anche il via libera dell'Aifa per queste stesse indicazioni.

Un terzo prodotto, **liso-cel**, sviluppato da Juno/Celgene e diretto anch'esso contro l'antigene CD19, è in fase avanzata di sviluppo.

Risultati e scenari di applicazione

Le approvazioni concesse dalle agenzie regolatorie a tisagenlecleucel e ad axi-cel si devono ai risultati di due studi multicentrici a braccio singolo, rispettivamente lo studio di fase 2 **JULIET** (NCT02445248, su pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B e linfoma follicolare trasformato) e lo studio di fase 1/2 **ZUMA-1** (NCT02348216, su pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma follicolare trasformato e linfoma primitivo del mediastino a cellule B). Liso-cel è al vaglio degli sperimentatori nello studio registrativo di fase 1 **TRANSCEND-NHL-001** (NCT02631044, su pazienti con linfoma non-Hodgkin aggressivo a cellule B).

Tutti e tre questi studi hanno dato finora risultati estremamente promettenti, specialmente nei pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B, e suggeriscono come la terapia con le CAR T-cells anti-CD19 potrebbe essere realmente un *'game changer'*, in grado di sconfiggere il linfoma non-Hodgkin chemiorefrattario. A causa delle notevoli differenze tra di essi in termini di disegno, criteri di arruolamento dei pazienti, struttura del CAR, sistemi utilizzati per il *grading* delle tossicità, durata del follow-up ecc., non è possibile fare confronti diretti fra i dati emersi da questi trial. Tuttavia, nel complesso, si sono osservate remissioni complete e durature nel 30-40% dei pazienti. Anche se la sopravvivenza libera da progressione (PFS) mediana non è risultata sufficien-



Prof. Carmelo Carlo-Stella

Terapie con cellule CAR T nei linfomi: a che punto siamo?*

 **GUARDA IL VIDEO**

**L'intervista è stata realizzata poco prima dell'approvazione di axi-cel, autorizzato in Italia dall'Aifa nel novembre 2019.*

temente alta, le curve di sopravvivenza stanno mostrando un plateau e si è visto che i pazienti arrivati al traguardo dei 6 mesi senza recidiva difficilmente ricadono in seguito, a suggerire che esiste un gruppo di pazienti che probabilmente può essere guarito definitivamente dal trattamento con le CAR T-cells.

È importante sottolineare, comunque, che sebbene siano per ora indicate per il setting della malattia refrattaria o ricaduta dopo almeno due linee di terapia, anche in questo ambito le CAR T-cells non sono adatte a tutti. Una corretta selezione dei pazienti è fondamentale per massimizzare le chance di successo della terapia e deve tener conto di vari fattori, tra cui lo stato della malattia e le condizioni di partenza del soggetto. In presenza, di un linfoma molto esteso o in rapida progressione, per esempio, il trattamento non è fattibile; inoltre, il paziente deve essere in condizioni sufficientemente buone (performance status ECOG pari a 0 o 1), non presentare comorbidity importanti né una storia di patologie cerebrali.

Tenendo conto di queste condizioni, ci sono attualmente almeno tre scenari nei quali i pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (o altri linfomi non-Hodgkin a cellule B aggressivi) possono essere trattati con le CAR T-cells (**figura 1**). Il primo è rappresentato dai pazienti già sottoposti senza successo ad almeno due linee di terapia sistemica, cioè quelli che ricadono o non rispondono dopo la prima terapia di salvataggio. Il secondo, che resta ancora molto controverso, riguarda i pazienti che rispondono solo parzialmente alla prima terapia di salvataggio (attualmente circa il 25% fra quelli trattati con due linee di terapia e sottoposti a una terapia di salvataggio a base di platino). Infine, il trattamento con le CAR T-cells può essere preso in considerazione per i pazienti recidivati dopo il trapianto autologo di cellule staminali, in particolare quelli che ricadono entro un anno dalla procedura, nei quali la prognosi è tipicamente infausta, mentre in quelli che ricadono in seguito il ruolo di questa terapia è meno chiaro.

Servono, comunque, ulteriori studi prospettici per chiarire meglio il ruolo delle CAR T-cells anti-CD19 nei vari scenari clinici, oltre che studi randomizzati di fase 3 per definire il protocollo ottimale per questa terapia; inoltre, sono già in corso trial che ne stanno valutando l'impiego in setting terapeutici più precoci di quelli attuali. Attualmente, Novartis e Celgene stanno conducendo ampi studi di fase 3 (rispettivamente lo studio **BELINDA**, NCT03570892, e lo studio **TRANSFORM**, NCT03575351) su pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B recidivati o refrattari idonei al trapianto, nei quali si sta confrontando la terapia con

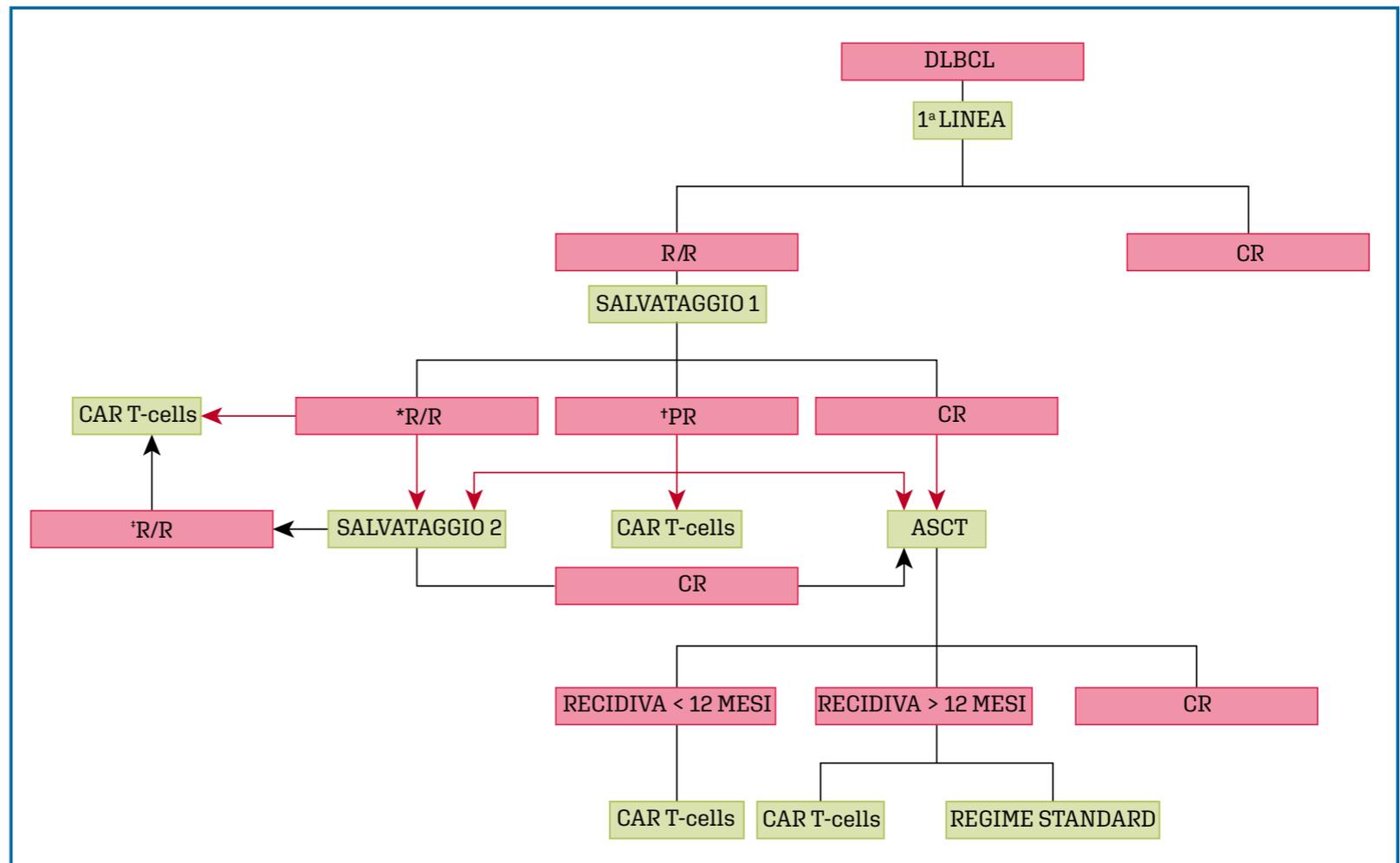


Figura 1. Algoritmo proposto per l'impiego delle CAR T-cells anti-CD19 in pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B nella pratica clinica. DLBCL: linfoma diffuso a grandi cellule B; R/R: ricaduto/refrattario; CR: risposta completa; ASCT: trapianto autologo di cellule staminali.

CAR T-cells con la terapia di salvataggio standard, seguita dal trapianto autologo di cellule staminali; i risultati di questi trial su larga scala potrebbero cambiare in futuro l'attuale pratica clinica.

Problemi da risolvere e nuove strategie

Le CAR T-cells anti-CD19 hanno dimostrato un'efficacia sostanziale nei pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B chemiorefrattario. Tuttavia, ci sono ancora diversi aspetti controversi e problemi che richiedono una soluzione, fra cui una gestione ottimale delle tossicità, come trattare i pazienti che non rispondono al trattamento con queste cellule oppure ricadono dopo una risposta iniziale e come migliorare la piattaforma di produzione delle CAR T-cells.

Che cos'è il linfoma diffuso a grandi cellule B?

Il linfoma diffuso a grandi cellule B è il sottotipo più frequente di linfoma non-Hodgkin, di cui rappresenta circa il 30-40% dei casi. La malattia è causata da una mutazione dei linfociti B, che iniziano a proliferare in modo incontrollato a livello degli organi linfatici (linfonodi, midollo osseo, milza, fegato) e/o di sedi extralinfonodali, sostituendo i globuli bianchi sani e, di conseguenza, indebolendo le difese immunitarie dell'organismo.

Non si tratta in realtà di un unico tumore, ma di un gruppo di linfomi caratterizzati da una notevole eterogeneità, clinica, biologica e molecolare, nel quale sono state individuate a oggi fino a 16 entità clinico-patologiche distinte. Una di queste è rappresentata dal linfoma diffuso a grandi cellule B primitivo del mediastino, un sottotipo che colpisce per lo più giovani adulti (principalmente donne fra i 30 e i 40 anni).

In ogni caso, il linfoma diffuso a grandi cellule B rappresenta una neoplasia aggressiva e difficile da trattare.

Il quadro clinico

Spesso il decorso della malattia, almeno nelle fasi iniziali, è asintomatico, ma si possono riscontrare comunemente anche sintomi aspecifici quali malessere generale e ridotta tolleranza allo sforzo.

Il 30% circa dei pazienti può presentare i cosiddetti "sintomi B": perdita di peso inspiegata (oltre il 10% negli ultimi 6 mesi); sudorazioni notturne ricorrenti; febbre superiore a 38 °C (per 2 settimane in assenza di infezioni).

In genere, la malattia si presenta all'esordio con un ingrossamento linfonodale esteso (a livello di collo, ascelle, inguine), sintomi sistemici e, nel 40% dei casi, l'interessamento

anche di altri organi oltre ai linfonodi. La sede extra-nodale più frequentemente coinvolta al momento della diagnosi è rappresentata dal sistema gastrointestinale, ma possono essere interessati quasi tutti gli organi e sistemi, compreso il sistema nervoso centrale.

Il linfoma diffuso a grandi cellule B primitivo del mediastino si manifesta solitamente come una massa mediastinica voluminosa, spesso associata a versamento pleurico o effusione pericardica e sindrome della vena cava superiore.

Quanto è frequente?

Il linfoma diffuso a grandi cellule B rappresenta il linfoma più frequente nei Paesi occidentali.

I dati epidemiologici su scala globale sono limitati. In Italia, secondo i dati del registro nazionale tumori, si contano circa 900 nuovi casi /anno.

Questa neoplasia ematologica può manifestarsi a qualunque età, ma colpisce soprattutto la popolazione adulta e la sua incidenza aumenta nel tempo; infatti, al momento della diagnosi oltre il 50% dei pazienti ha più di 60 anni e l'età mediana di insorgenza è intorno ai 65 anni.

Come si cura?

Data l'aggressività del tumore, una volta fatta la diagnosi occorre impostare rapidamente un piano terapeutico.

La terapia di prima linea standard del linfoma diffuso a grandi cellule B è tipicamente costituita dal regime di chemioimmunoterapia R-CHOP, costituito dall'aggiunta dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 rituximab alla chemioterapia con ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina più prednisone.

Grazie a questo regime, circa il 70% dei pazienti ottiene una remissione completa al termine del trattamento e circa il 50-60% la guarigione dalla malattia; queste percentuali variano ovviamente a seconda dell'estensione della malattia al momento della diagnosi e della presenza o meno di fattori prognostici sfavorevoli. Invece, circa il 30-40% dei pazienti non risponde al trattamento o finisce per andare incontro a una recidiva, percentuale che sale ulteriormente in alcuni sottogruppi.

Nei pazienti refrattari o recidivati occorre, pertanto, impostare una terapia di seconda linea, che nei soggetti sufficientemente giovani (con meno di 60-70 anni) prevede una chemioterapia di salvataggio seguita da una chemioterapia ad alte dosi e dal trapianto di cellule staminali autologhe, una strada, quest'ultima, non sempre percorribile. Più del 60% dei pazienti, infatti, risulta non candidabile al trapianto; tuttavia, anche in coloro che possono sottoporvisi, spesso la malattia recidiva nuovamente.

In entrambi i casi, le opzioni di trattamento a disposizione dei pazienti sono limitate e le percentuali di sopravvivenza piuttosto basse; tuttavia, per questi pazienti, una nuova prospettiva è offerta dall'impiego dei nuovi approcci di immunoterapia, tra cui gli inibitori del checkpoint immunitario PD-1/PD-L1 (come pembrolizumab, nivolumab e atezolizumab) e le CAR T-cells anti-CD19 axi-cel e tisagenlecleucel, che sembrano avere il potenziale per cambiare il decorso della malattia in alcuni pazienti.

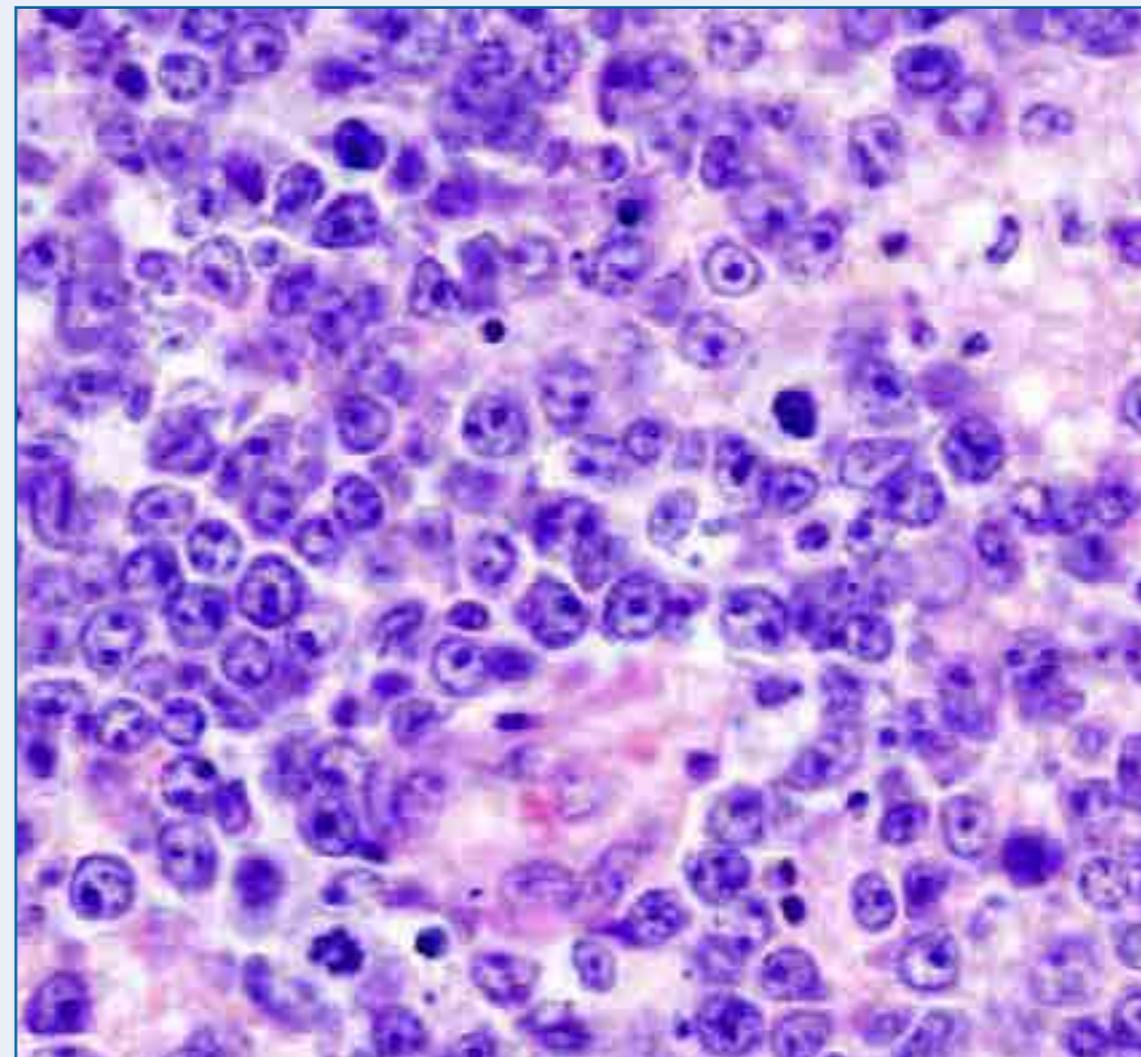


Figura.

Per quanto riguarda il problema della resistenza, sono stati proposti due possibili meccanismi: la perdita dell'antigene bersaglio, CD19, e l'espressione di checkpoint immunitari. Per esempio, un'analisi preliminare delle biopsie di pazienti in progressione nello studio ZUMA-1 ha rivelato che il 33% era CD19-negativo e il 62% era PD-L1-positivo. Perciò, una delle strategie in studio per superare quest'ostacolo prevede una terapia basata sulla combinazione di CAR T-cells anti-CD19 più un inibitore dei checkpoint immunitari. La University of Pennsylvania, per esempio, sta conducendo uno studio di fase 1/2 (NCT02650999) per valutare la fattibilità e l'efficacia dell'anti-PD-1 pembrolizumab in pazienti con linfoma non-Hodgkin a cellule B che non hanno risposto o sono ricaduti dopo il trattamento con tisagenlecleucel. Kite e Celgene, invece, stanno conducendo lo studio di fase 1/2 **ZUMA-6** (NCT02926833), su pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B refrattario trattati con una versione migliorata di axi-cel, **KTE-X19**, e poi con l'anti-PD-L1 atezolizumab; i risultati presentati al congresso ASH nel 2018 hanno evidenziato nei 10 pazienti valutabili un tasso di risposta complessiva (ORR) del 90% e un tasso di risposta completa del 60%, ma l'aggiunta dell'inibitore dei checkpoint ha aumentato la tossicità del trattamento, un aspetto, questo, che dovrà essere valutato con attenzione nei prossimi trial.

Per superare il problema delle recidive CD19-negative, si stanno valutando in alcuni studi antigeni target alternativi, tra cui il CD22. Tuttavia, per quanto CD22 sembri un bersaglio attraente, un CAR diretto contro un antigene solo potrebbe indurre nella cellula tumorale lo sviluppo di una resistenza sotto forma di una fuga dell'antigene. Per ridurre questo rischio si stanno quindi studiando terapie con CAR T-cell in grado di colpire un doppio bersaglio, obiettivo raggiungibile con tre strategie diverse; le prime due – utilizzare due tipi diversi di CAR T-cells oppure trasdurre due CAR diversi nella stessa cellula T – finora non hanno dato i risultati sperati e, richiedendo entrambe due CAR

differenti, comportano un aumento di costi, tempo e impegno necessari; la terza strategia, invece, basata sulla produzione di un CAR bi-specifico, contenente in un unico costrutto due diversi domini di riconoscimento dell'antigene, sembra essere più promettente e praticabile. Negli Stati Uniti, per esempio, è già in corso uno studio di fase 1 (NCT03448393) su pazienti con neoplasie a cellule B recidivate/refrattarie trattati con CAR T-cells contenenti un CAR bi-specifico anti-CD19/CD22 con struttura ad anello (CAR bicistronico).

Un fattore che può limitare l'efficacia della terapia con CAR T-cells è anche l'insufficiente persistenza delle cellule ingegnerizzate nell'organismo del paziente. Una possibile soluzione per questo problema è rappresentata dall'impiego di CAR di nuova generazione, contenenti più di un dominio co-stimolatorio. Un gruppo del Memorial Sloan Kettering Cancer Center sta conducendo uno studio di fase 1/2, il primo sull'uomo, su pazienti con neoplasie a cellule B trattati con CAR T-cells provviste di un CAR che contiene sia il dominio co-stimolatorio CD28 sia il ligando del dominio 4-1BB (4-1BBL) sulla sua superficie; su 9 pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B trattati, sette hanno ottenuto una risposta completa e uno una risposta parziale, ma questi risultati andranno naturalmente confermati in un numero più ampio di pazienti.

Migliorare la piattaforma di produzione delle CAR T-cells è anche una questione importante per consentire ai pazienti di accedere più facilmente a questa terapia. Nello studio JULIET, per esempio, solo il 70% dei pazienti arruolati è stato effettivamente sottoposto al trattamento, in parte a causa del tempo 'da vena a vena' relativamente lungo. Produrre le CAR T-cells rapidamente, dunque, è fondamentale per permettere ai pazienti di arrivare all'infusione. Su questo fronte, si stanno facendo notevoli passi avanti automatizzando sempre di più le varie fasi dell'iter produttivo.

Mieloma multiplo

Al momento non vi sono ancora prodotti a base di CAR T-cells approvati dall’Fda e dall’Ema per il trattamento del mieloma multiplo. Tuttavia, questa neoplasia rappresenta uno dei campi di applicazione più promettenti delle CAR T-cells in ematologia e sono attualmente in corso numerosi studi, molti dei quali condotti da gruppi cinesi, che sono all’avanguardia in questo campo.

Tra il 2013 e il 2018 sono stati approvati ben cinque nuovi farmaci per il mieloma multiplo; pertanto fino a poco tempo fa sembrava difficile poter assistere a ulteriori progressi significativi in questo campo. I dati degli studi sull’impiego di CAR T-cells in pazienti con questa patologia presentati agli ultimi congressi, invece, hanno aperto un nuovo scenario, mostrando percentuali di risposta comprese fra il 70 e il 100% a seconda della dose di CAR T-cells somministrata e dei regimi precedenti già effettuati, nel setting della malattia recidivata o refrattaria.

Un nuovo antigene bersaglio: BCMA

CD19, l’antigene bersaglio delle CAR T-cells finora approvate per la leucemia linfoblastica acuta e il linfoma diffuso a grandi cellule B, ha dimostrato di non essere un target idoneo per il mieloma multiplo. I ricercatori hanno identificato, invece, come bersaglio ideale per un CAR diretto contro le cellule mielomatose l’antigene di maturazione delle cellule B (BCMA).

BCMA è una proteina transmembrana appartenente alla superfamiglia del recettore TNF, espressa sulle cellule B della memoria mature, destinate a diventare plasmacellule, e su tutte le plasmacellule, normali e maligne. Quest’antigene è fondamentale per la sopravvivenza a lungo termine delle plasmacellule e – fatto importante – non è espresso su altre cellule B della memoria o su cellule progenitrici ematopoietiche CD34+, il che lo rende un bersaglio ideale per la distruzione mediata da cellule T, né sui tessuti non emopoietici essenziali normali.



Prof. Michele Cavo

CAR T-cells per il mieloma multiplo, a che punto siamo?

 **GUARDA IL VIDEO**

Le prime evidenze sulle potenzialità di CAR T-cells dirette contro il BCMA si sono avute nel 2016, quando il gruppo di James Kochenderfer, del National Cancer Institute, ha pubblicato sulla rivista *Blood* i risultati molto incoraggianti di uno studio monocentrico di fase 1 di *dose-escalation*, il primo sull’uomo, su 12 pazienti con mieloma multiplo recidivante/refrattario, trattati con CAR T-cells anti-BCMA. Nel 2017, al congresso dell’ASH, anche un gruppo di ricercatori della University of Pennsylvania (tra cui Carl June) ha presentato dati interessanti su questo approccio, mostrando che nella coorte trattata con la dose più attiva, quattro pazienti su sei hanno ottenuto almeno una risposta parziale.

I prodotti in fase più avanzata di sviluppo: ide-cel e LCAR-B38M/JNJ-4528

I prodotti a base di CAR T-cells anti-BCMA attualmente in fase più avanzata di sviluppo sono due: **ide-cel** (bb2121, sviluppato da Bluebird Bio e Celgene) e **LCAR-B38M/JNJ-4528** (sviluppato in collaborazione dalla cinese Legend Biotech e da Janssen).

Ide-cel è un prodotto a base di CAR T-cells autologhe anti-BCMA, attualmente sviluppato per i pazienti con mieloma multiplo ricaduto o refrattario. I risultati più maturi attualmente disponibili su questa terapia sono quelli dello studio di fase 1 **CRB-401** (NCT02658929), presentati nel giugno 2018 al congresso dell'ASCO e pubblicati nel maggio 2019 sul *New England Journal of Medicine*. Nei primi 33 pazienti trattati, l'ORR è risultato dell'85%, con un 45% di risposte complete e un 27% di risposte parziali molto buone; nei pazienti trattati con una dose attiva di ide-cel l'ORR è risultato del 95,5%, con un 50% di risposte complete un 36,4% di risposte parziali molto buone. La PFS è risultata di 11,8 mesi; tutti i pazienti *responder* valutabili sono risultati MRD-negativi e in questo gruppo la PFS mediana è risultata di 17,7 mesi. La CRS ha avuto un'incidenza del 63% (solo nel 5% dei casi di grado 3 o superiore e comunque risultata gestibile), mentre la neurotossicità di grado ≥ 3 un'incidenza del 2%.

Proprio sulla base dei risultati della parte di *dose escalation* dello studio CRB-401, ide-cel ha ricevuto nel 2017 la designazione di terapia fortemente innovativa (*breakthrough therapy*) dall'FDA e il pronunciamento dell'agenzia in merito alla sua approvazione è atteso per la seconda metà del 2020. Inoltre, sono già in corso gli studi di fase 2 (**KarMMA 2**) e fase 3 (**KarMMA 3**).

LCAR-B38M/JNJ-4528 è un prodotto a base di CAR T-cells autologhe anti-BCMA, caratterizzate dalla presenza di un CAR bi-specifico, la cui porzione extracellulare contiene, cioè, due domini di riconoscimento diretti contro altrettanti epitopi specifici del BCMA, proprietà che gli conferisce un'alta affinità di legame con l'antigene bersaglio. I dati più maturi disponibili sono quelli dello studio multicentrico di fase 1/2 **LEGEND-2** (NCT03090659), il primo sull'uomo, condotto in Cina. Al congresso ASH 2018 sono stati presentati i dati relativi a 57 pazienti trattati presso un singolo centro e seguiti per una mediana di 12 mesi. L'ORR è risultato dell'88%, mentre la PFS mediana è

risultata di 15 mesi in tutti i pazienti e 24 mesi nel gruppo che ha raggiunto l'MRD-negatività. La CRS ha avuto un'incidenza del 90% (nel 7% dei casi di grado 3) e un solo paziente ha sviluppato neurotossicità, di grado 1.

Legend e Janssen hanno già depositato la domanda di approvazione di LCAR-B38M/JNJ-4528 sia all'FDA sia all'EMA e il 3 aprile 2019 l'agenzia europea ha concesso al prodotto la designazione PRIME (PRiority MEDicines), che garantisce un iter regolatorio accelerato. Nel frattempo sono in corso anche lo studio multicentrico fase 1b/2 **CARTITUDE-1** (NCT03548207) e lo studio confermativo di fase 2 **CARTIFAN-1** (NCT03758417).

Nuove strategie per migliorare i risultati

Numerosi gruppi sono al lavoro per trovare nuovi approcci che permettano di migliorare ulteriormente i risultati finora ottenuti, già molto incoraggianti. Alcuni si stanno concentrando sulla possibilità di colpire sia la plasmacellula patologica sia la possibile cellula "progenitrice" del mieloma, che potrebbe avere proprietà più simili a quelle delle cellule B.

Ricercatori della University of Pennsylvania e della Soochow University di Jiangsu, in Cina, stanno valutando di colpire con le CAR T-cells sia l'antigene CD19 sia il BCMA, dopo aver sottoposto i pazienti al trapianto autologo di cellule staminali. Il gruppo cinese, per esempio, ha presentato al congresso ASH 2018 i risultati dello studio **SZ-CART-MM 02** (NCT03455972) su 10 pazienti con mieloma ad alto rischio, non refrattari al trattamento, sottoposti a chemioterapia ad alte dosi e al trapianto, seguito dall'infusione di CAR T-cells anti-CD19 e, un giorno dopo, di CAR T-cells anti-BCMA. Al momento dell'ultima valutazione (oltre i 90 giorni), il 100% dei pazienti aveva raggiunto una risposta parziale molto buona o migliore, che nel 50% dei casi era una risposta completa stringente e il 60% dei pazienti era MRD-negativo, il tutto a fronte di una tossicità lieve e reversibile. In questi pazienti con mieloma ad alto rischio, il picco dell'amplificazione

Che cos'è il mieloma multiplo?

Il mieloma multiplo è una neoplasia ematologica caratterizzata da una replicazione incontrollata delle plasmacellule, che, di conseguenza, si accumulano nel midollo osseo. Inoltre, le plasmacellule mielomatose tendono a produrre anticorpi non funzionanti e tutti uguali tra di loro, spesso in grande quantità, noti come componente monoclonale (componente M), che possono essere ritrovati nel sangue e/o nelle urine dei pazienti.

Il quadro clinico

La proliferazione massiccia delle plasmacellule determina una riduzione della normale funzione immunitaria e, quindi, una riduzione dei livelli di immunoglobuline e un aumento del rischio di infezioni, nonché un'insufficienza midollare con conseguente anemia e/o riduzione dei globuli bianchi o delle piastrine. Il mieloma multiplo è inoltre caratterizzato da lesioni ossee, causate da uno squilibrio tra produzione dell'osso ad opera degli osteoblasti e riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti; le conseguenze sono dolore osseo, che è il sintomo più comune e della malattia, possibili fratture ossee spontanee e ipercalcemia (legata all'invasione dell'osso da parte delle cellule neoplastiche), che a sua volta può essere responsabile di sintomi neurologici. Inoltre, fino al 50% dei pazienti può sviluppare insufficienza renale (presente nel 20% dei casi già al momento della diagnosi).

Quanto è frequente?

Il mieloma multiplo è al secondo posto fra le neoplasie ematologiche più frequenti dopo il linfoma non-Hodgkin e colpisce soprattutto gli anziani, con un'età media alla diagnosi di circa 70 anni (solo il 2% circa dei pazienti ha meno di 40

anni); inoltre, è leggermente più diffuso nel sesso maschile. L'incidenza stimata è di circa 39.000 nuovi casi ogni anno in Europa, di cui circa 5800 in Italia (3100 tra gli uomini e 2700 tra le donne; dati 2017).

Come si cura?

Negli ultimi anni, la disponibilità di nuovi farmaci più efficaci e più sicuri ha portato a un miglioramento dell'aspettativa di vita dei pazienti affetti da mieloma multiplo. Grazie alle terapie innovative, infatti, il tasso di sopravvivenza dai primi anni del 2000 a oggi è praticamente raddoppiato. Tuttavia, nella maggior parte dei casi le terapie attuali non permettono ancora di ottenere una guarigione definitiva, perché quasi tutti i pazienti finiscono per avere una ricaduta e gli outcome peggiori si osservano nei soggetti con un profilo citogenetico associato a un alto rischio di progressione oppure con malattia refrattaria al trattamento. Al momento attuale, l'obiettivo del trattamento è quello di ottenere un controllo più duraturo possibile della malattia e migliorare la qualità di vita del paziente. C'è bisogno, quindi, di trovare nuove terapie che prolunghino ulteriormente la durata della remissione e, possibilmente, siano curative. Le CAR T-cells hanno le potenzialità per rispondere a questi requisiti.

Oggi, la terapia del mieloma multiplo si basa principalmente sull'utilizzo della chemioterapia convenzionale, degli steroidi, del trapianto di cellule staminali ematopoietiche e di farmaci innovativi come gli immunomodulatori (lenalidomide, pomalidomide), gli inibitori del proteasoma (bortezomib, carfilzomib, ixazomib), anticorpi monoclonali (daratumumab, elotuzumab). Il tipo di trattamento viene scelto sulla base di diversi fattori tra cui l'età del paziente, lo stadio e le caratteristiche della malattia, la presenza o meno di comorbidità.

Nei pazienti che al momento della diagnosi presentano la malattia in stadio iniziale si adotta in genere un approccio attendista, senza somministrare alcuna terapia. In caso di stadio più avanzato, la strategia terapeutica differisce a seconda che il paziente sia candidabile o meno al trapianto di cellule staminali, per lo più autologo. Possono essere sottoposti a questa procedura e a un trattamento più aggressivo i soggetti con meno di 65 anni o, se privi di comorbidità, anche 70 anni.

Nei soggetti candidabili al trapianto, il trattamento inizia con la terapia di induzione, finalizzata a ridurre la massa tumorale e alleviare i sintomi, e basata su una combinazione di farmaci, comprendente in genere uno steroide ed eventualmente farmaci chemioterapici. L'induzione solitamente non richiede il ricovero ed è ben tollerata; una volta terminata, in assenza di controindicazioni, si può procedere con il trapianto, preceduto da una terapia mieloablattiva per eliminare i blasti e preparare al trapianto.

Nei casi in cui il trapianto non è praticabile, la terapia di prima linea consiste nell'utilizzo di farmaci chemioterapici e non, spesso in combinazione, al fine di ridurre il più possibile e per il maggior tempo possibile il carico di malattia, mantenendo un'adeguata qualità di vita.

Sia i pazienti trapiantati sia quelli non trapiantati vengono per lo più sottoposti comunque a una terapia di mantenimento con farmaci immunomodulatori, allo scopo di mantenere sotto controllo la malattia il più a lungo possibile.

I miglioramenti della sopravvivenza nei pazienti con mieloma sono stati ottenuti anche grazie al notevole miglioramento avvenuto negli ultimi anni delle terapie disponibili per la recidiva di malattia. Dagli anni 2000 a oggi sono stati approvati molti farmaci di nuova generazione (immunomo-

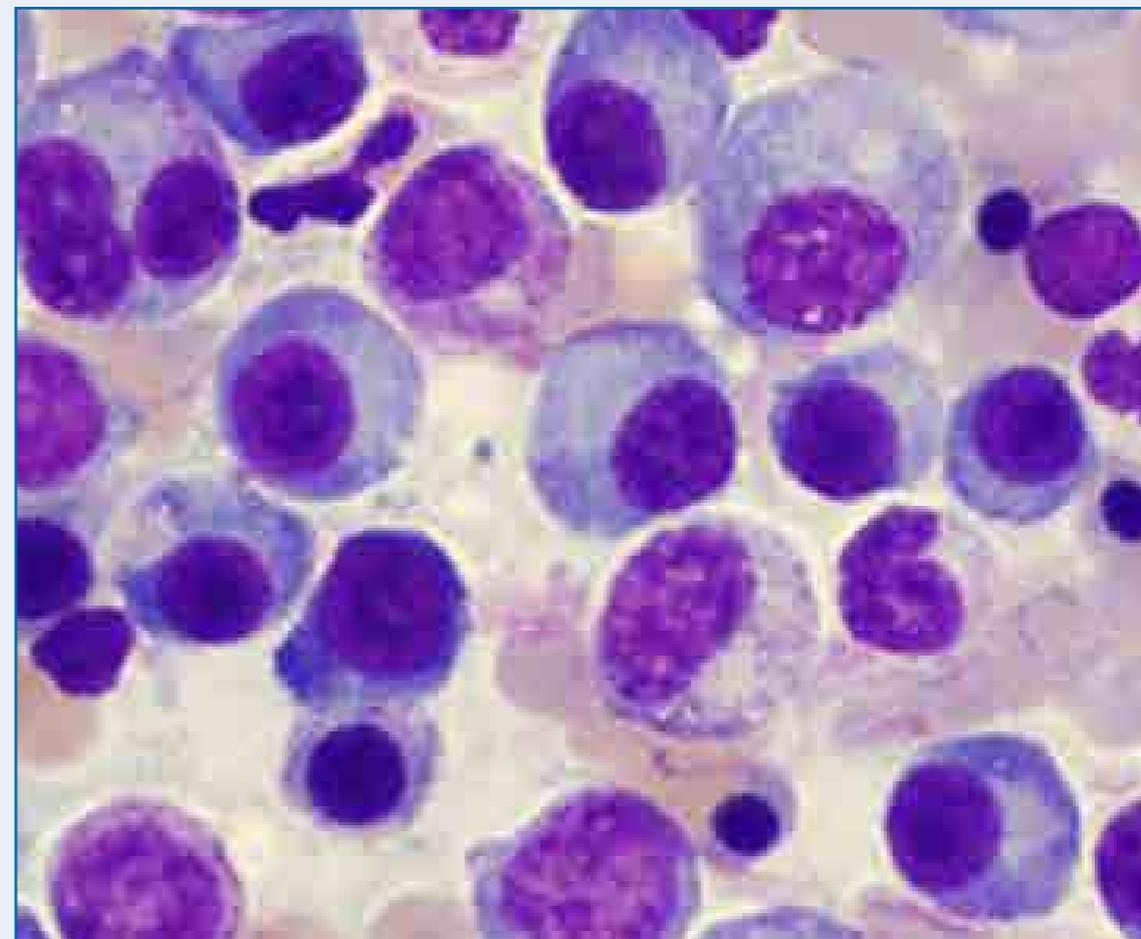


Figura.

dulatori, inibitori del proteasoma e anticorpi monoclonali) efficaci e ben tollerati, che si utilizzano per lo più in associazione, fino alla progressione della malattia o alla comparsa di un'eventuale intolleranza da parte del paziente, allo scopo di ottenere una remissione della malattia più duratura possibile, a fronte di limitati effetti collaterali.

Nonostante tali progressi, la recidiva rappresenta purtroppo un evento ineluttabile nella maggior parte dei casi, il che rende necessaria una continua ricerca di nuovi approcci terapeutici; tra questi figurano, appunto, le CAR T-cells, che si stanno dimostrando estremamente promettenti nel setting della malattia recidivata/refrattaria.

delle CAR T-cells si è raggiunto più tardi, ma si è mantenuto più a lungo rispetto ai pazienti recidivati o refrattari.

Altri ricercatori stanno lavorando sulla possibilità di aumentare la persistenza delle cellule T o la percentuale di cellule T della memoria. Per esempio, al congresso ASH 2018 sono stati presentati dati interessanti su **bb21217**, una nuova versione di bb2121 (ide-cel) 'migliorata' in modo da aumentare la persistenza cellulare. Quest'obiettivo è raggiunto modificando il processo produttivo in modo da aggiungere un inibitore dell'enzima PIK3, al fine di ottenere un arricchimento di cellule T con un fenotipo *memory-like*. Al congresso ASH sono stati presentati i dati dello studio di fase 1 **CRB-402** (NCT03274219) su 12 pazienti, tutti altamente pretrattati e più della metà (il 58%) con citogenetica ad alto rischio. Con il primo livello di dose testato, l'ORR è risultato dell'83,3%; il 67% dei pazienti ha sviluppato una CRS, ma solo di grado 1 o 2 in tutti i casi tranne uno, e il 25% ha manifestato neurotossicità.

Anche le CAR T-cells **JCARH125** (sviluppate da Juno e Celgene) sono strutturate e preparate in modo tale che il prodotto finale sia arricchito di cellule T con un fenotipo *memory-like*. Al congresso ASH 2018 sono stati presentati risultati dello studio di fase 1/2 **EVOLVE** (NCT03430011) su 44 pazienti con malattia altamente refrattaria. L'ORR è risultato dell'82% con un 27% di risposte complete e un 48% di risposte parziali molto buone; la CRS ha avuto un'incidenza dell'80% (nel 9% dei casi di grado 3 o superiore) e la neurotossicità un'incidenza del 18% (nel 7% dei casi di grado 3 o superiore).

Un prodotto arricchito di cellule T staminali della memoria è anche **P-BCMA-101** (sviluppato da Poseida Therapeutics), preparato utilizzando per la trasduzione delle cellule un sistema brevettato, il PiggyBac®, basato sull'impiego di trasposoni. Al congresso ASH 2018 sono stati presentati i primi risultati di uno studio di *dose-finding* di fase 1 su 21 pazienti ricaduti/re-

frattari già sottoposti ad almeno tre linee di trattamento. Con la dose più alta, i ricercatori hanno osservato un ORR del 100%; nell'intero gruppo trattato solo il 9,5% dei pazienti ha sviluppato una CRS, in ogni caso di grado lieve.

Altri sforzi sono diretti nella direzione di arrivare a prodotti meno costosi e più facili da produrre. In quest'alveo si inserisce, per esempio, **ALLO-715**, un trattamento sviluppato da Cellectis e Allogene a base di CAR T-cells anti-BCMA allogeneiche, ottenute, cioè, non dal paziente, ma da un donatore sano, e preparate con la tecnologia di editing genetico TALEN®, brevettata da Cellectis, che permette di inattivare i geni CD52 e TRAC. Questa modifica consente di ridurre il rischio di GvHD e di resistenza all'anticorpo anti-CD52 alemtuzumab utilizzato come agente linfo-depletante. All'ASH 2018 sono stati presentati diversi dati preclinici, ma il prodotto non ha ancora iniziato la sperimentazione clinica.

Leucemia linfatica cronica

Così come per il mieloma multiplo, anche per la leucemia linfatica cronica non sono disponibili, al momento, prodotti a base di CAR T-cells approvati dalle agenzie regolatorie. Tuttavia, sono in corso molti studi che prevedono l'impiego di CAR T-cells dirette contro l'antigene CD19 in pazienti affetti da questo tumore del sangue, alcuni dei quali ne hanno dimostrato le potenzialità nell'indurre remissioni profonde e durature, forse addirittura una guarigione, in soggetti altamente pretrattati e con malattia ad alto rischio, recidivata o refrattaria. L'osservazione che oggi ci sono pazienti che hanno ottenuto una remissione completa e l'hanno mantenuta per più di 8 anni dopo una singola infusione di CAR T-cells anti-CD19 suggerisce che quest'approccio potrebbe guarire almeno alcuni pazienti con leucemia linfatica cronica recidivata o refrattaria.

A oggi, il limite maggiore delle CAR T-cells in questo setting risiede nel fatto che nella maggior parte dei trial la remissione

completa è stata raggiunta solo da una minoranza di pazienti; tuttavia, gli studi più recenti hanno iniziato a dare qualche indicazione su quali siano i fattori maggiormente predittivi di risposta e a suggerire strategie per ottimizzare i risultati. Inoltre, l'efficacia di questo trattamento potrebbe aumentare ulteriormente utilizzando le CAR T-cells in combinazione con altri trattamenti o in una fase più precoce lungo il decorso della malattia.

I risultati ottenuti finora

La leucemia linfatica cronica è, in effetti, la neoplasia ematologica nella quale le CAR T-cells sono state testate per la prima volta nell'uomo. Nel 2010, un gruppo della University of Pennsylvania ha trattato i primi tre pazienti, affetti da malattia recidivata/refrattaria, con CAR T-cells anti-CD19 (CTL019, ora note come tisagenlecleucel), dopo averli sottoposti a una chemioterapia linfodepletante; due di essi hanno raggiunto una remissione completa (a oggi mantenuta per più di 8 anni), mostrando un'espansione delle cellule infuse di 1000-10.000 volte, e uno ha ottenuto una remissione parziale. Questo primo studio pilota ha poi coinvolto in totale 14 pazienti, nei quali si è osservato complessivamente un tasso di risposta del 58% e una percentuale di MRD-negatività del 29%; al momento della pubblicazione dello studio, nel 2015, dopo una mediana di 40 mesi di follow-up, nessuno dei pazienti aveva recidivato e gli autori hanno osservato una correlazione tra il grado di espansione delle CAR T-cells *in vivo* e la risposta clinica, nonché una persistenza a lungo termine delle cellule nei pazienti che avevano ottenuto una remissione completa e la negatività della MRD.

Di recente, lo stesso gruppo ha condotto uno studio randomizzato di fase 2 per identificare la dose ottimale di CTL019, i cui risultati dovrebbero essere pubblicati a breve; i dati finora disponibili hanno comunque suggerito che con una dose più alta (500 milioni di cellule vs 50 milioni) si ottengono tassi superiori di risposta complessiva (55% contro 31%) di risposta completa (36% vs 8%).

Anche un gruppo del Memorial Sloan Kettering Cancer Center di New York (in collaborazione con l'NCI) ha condotto uno studio (ancora in corso) su CAR T-cells di seconda generazione anti-CD19 come trattamento per la leucemia linfatica cronica; il CAR, in questo caso, conteneva però come dominio co-stimolatorio CD28, e non 4-1BB. Il trial ha coinvolto 8 pazienti con malattia refrattaria e 'bulky', sottoposti o meno a linfodeplezione prima dell'infusione delle CAR T-cells, e si è visto che i primi hanno ottenuto una risposta parziale o una stabilizzazione della malattia perdurata per diversi mesi, mentre i secondi non hanno risposto. Nonostante i tassi di risposta relativamente bassi, questo studio è importante perché ha evidenziato l'importanza della linfodeplezione prima della somministrazione delle cellule per aumentare l'efficacia del trattamento.

L'NCI ha poi sviluppato altre CAR T-cells simili, contenenti anch'esse CD28 come dominio co-stimolatorio nel CAR, con le quali ha trattato inizialmente 8 pazienti con leucemia linfatica cronica recidivata/refrattaria in due studi clinici. L'ORR è risultato piuttosto elevato (87%) e il 50% dei pazienti ha ottenuto una risposta completa durata dai 14 ai 23 mesi.

Un altro prodotto in fase di sperimentazione come trattamento per la leucemia linfatica cronica è **liso-cel**, sviluppato da Juno Therapeutics, ora acquisita da Celgene, nello studio di fase 1/2 **TRANSCEND CLL-004** (NCT03331198). I primi risultati del trial sono stati presentati nel dicembre 2018 al congresso dell'ASH e hanno mostrato un ORR a 3 mesi dall'infusione dell'80% e una percentuale di risposta completa del 50%; inoltre, a 30 giorni dal trattamento il 73,3% dei pazienti aveva l'MRD non rilevabile alla citometria a flusso.

Anche Kite/Gilead sta sviluppando un suo prodotto per la leucemia linfatica cronica, **KTE-X19** una versione migliorata del suo prodotto già approvato (axi-cel), nello studio **ZUMA-8**, che è partito nell'autunno 2018 e del quale non si hanno ancora i risultati.

Che cos'è la leucemia linfatica cronica?

La leucemia linfatica cronica è una neoplasia ematologica caratterizzata dall'accumulo di piccoli linfociti B maturi nel sangue, e negli organi linfoidei (midollo osseo, linfonodi e milza).

Il quadro clinico

L'andamento clinico della malattia è piuttosto eterogeneo: alcuni pazienti sono asintomatici alla diagnosi e restano stabili per anni senza dover fare alcuna terapia, altri invece mostrano precocemente sintomi di vario tipo e hanno una malattia progressiva, per cui devono iniziare tempestivamente il trattamento.

Alcuni soggetti presentano sintomi sistemici, quali febbre, sudorazioni notturne e calo ponderale, o disturbi autoimmuni. Inoltre, l'accumulo delle cellule leucemiche negli organi linfoidei può determinare ingrossamento dei linfonodi (presente nell'80% dei casi circa) e della milza (nella metà dei casi). Con il progredire della malattia, le cellule leucemiche sostituiscono nel midollo osseo le cellule emopoietiche, responsabili della produzione di globuli rossi, piastrine e globuli bianchi, che, di conseguenza, si riduce. Questo può causare anemia (e quindi pallore e stanchezza) e aumentare il rischio di emorragie e infezioni. Inoltre, l'espansione delle cellule leucemiche può ridurre la capacità del corpo di produrre anticorpi e, in alcuni casi, favorire l'aggressione da parte del sistema immunitario dei normali tessuti (reazione autoimmune).

Quanto è frequente?

Secondo i dati del registro nazionale tumori, in Italia si contano ogni anno poco meno di 3000 nuovi casi. La leucemia linfatica cronica è la leucemia più comune tra gli adulti nei

Paesi occidentali ed è una malattia tipica dell'anziano. L'età media alla diagnosi è di 65-70 anni e solo il 15% dei nuovi casi viene diagnosticato prima dei 55 anni.

Come si cura?

La terapia è per lo più farmacologica e dipende da diversi fattori quali stadio del tumore, età, condizioni generali del paziente, caratteristiche cliniche e biologiche della malattia (per esempio, la presenza della delezione 17p o di mutazioni del gene TP53, che favoriscono la resistenza alla chemioterapia).

Se è in fase iniziale e asintomatica, il paziente non necessita di alcuna terapia e deve solo sottoporsi a controlli periodici (sorveglianza attiva) per valutare nel tempo l'eventuale progressione della malattia.

In presenza di sintomi già alla diagnosi o ai successivi controlli, occorre iniziare una terapia farmacologica basata sulla chemioterapia, associata o meno all'immunoterapia con anticorpi monoclonali, come rituximab. I farmaci utilizzati (da soli o in combinazione) vengono scelti in base all'età e alle condizioni cliniche del paziente.

In alcuni casi molto selezionati, per lo più giovani con malattia aggressiva, si può prendere in considerazione il trapianto allogenico di cellule staminali.

Negli ultimi anni, le opzioni terapeutiche sono aumentate e cambiate radicalmente, grazie ai nuovi farmaci mirati come gli inibitori della tirosin chinasi di Bruton (BTK), primo su tutti ibrutinib, e della proteina anti-apoptotica BCL2, come venetoclax, che si sono dimostrati molto efficaci. Con queste nuove terapie, da sole o in combinazione, si ottengo-

no tassi di risposta che possono arrivare al 95%. Nonostante queste percentuali di risposta elevate, solo il 10-30% dei pazienti trattati con gli inibitori più potenti come ibrutinib e venetoclax ottiene una remissione completa e una quota ancora più bassa raggiunge la negatività della MRD. Inoltre, circa la metà dei pazienti trattati con questi farmaci va incontro a una recidiva entro 3-4 anni e coloro in cui la malattia progredisce durante la terapia con questi agenti hanno poche opzioni a disposizione e una sopravvivenza breve.

Il trapianto allogenico di cellule staminali potrebbe essere in alcuni casi curativo, ma la maggior parte dei pazienti con leucemia linfatica cronica ricaduta o refrattaria non può sottoporvisi per via dell'età avanzata, della presenza di comorbilità, della refrattarietà della malattia e della morbidità e mortalità elevate associate alla procedura trapiantologica, che in effetti è praticabile solo in un sottogruppo molto selezionato. Per queste ragioni, i pazienti con leucemia linfatica cronica multirefrattaria o recidivata più volte hanno attualmente una prognosi molto infausta e ben poche opzioni a disposizione. Proprio in questo setting sono state sviluppate inizialmente e testate CAR T-cells dirette contro l'antigene CD19, che in alcuni casi hanno portato a ottenere remissioni profonde e durature e, forse, addirittura una guarigione.

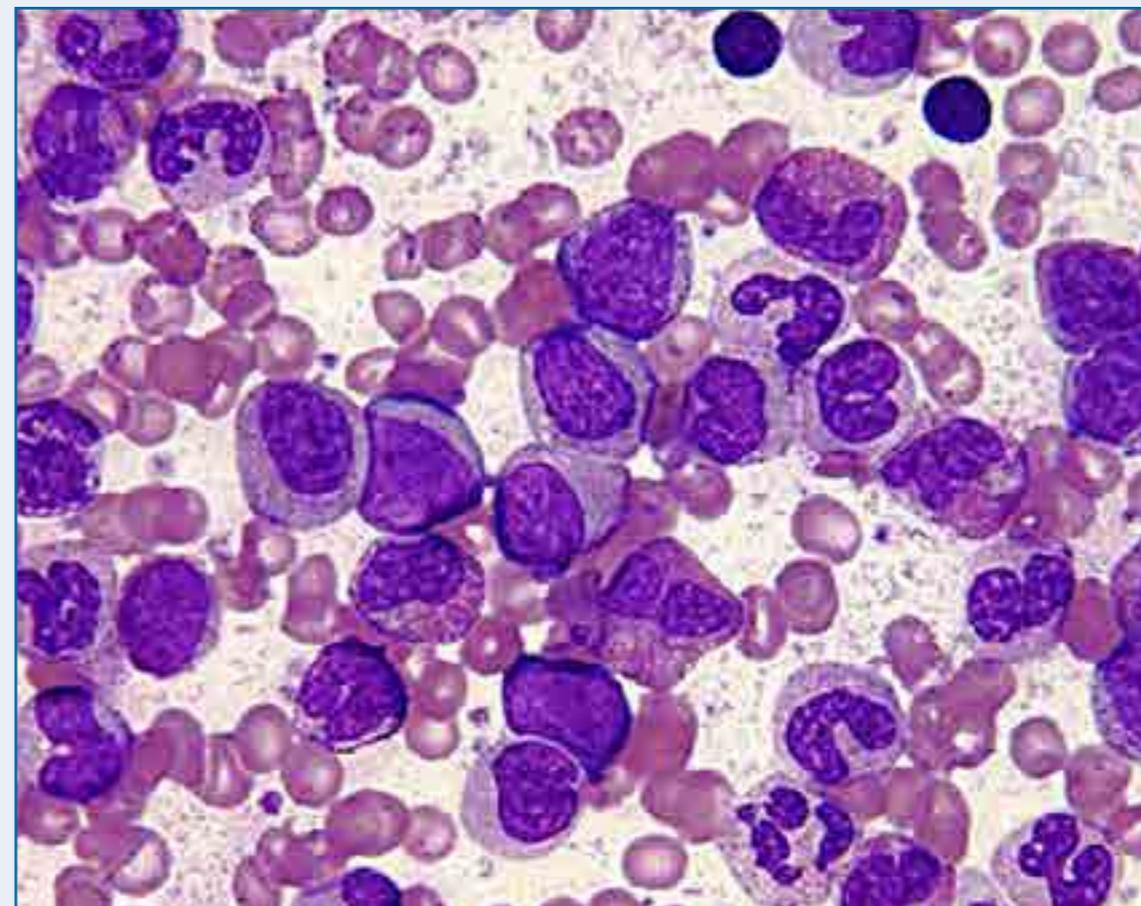


Figura.

CAR T-cells in combinazione con ibrutinib

Per quanto incoraggianti, i risultati finora ottenuti con le CAR T-cells anti-CD19 contro la leucemia linfatica cronica sono inferiori rispetto a quelli osservati contro la leucemia linfoblastica acuta in termini sia di tassi di risposta sia di durata della risposta. Ciò potrebbe dipendere dal fatto che la disregolazione del sistema immunitario caratteristica della leucemia linfatica cronica potrebbe impattare negativamente sulla risposta alle CAR T-cells. Per arginare quest'ostacolo e migliorare gli

outcome, alcuni gruppi di ricerca hanno pensato di combinare questo trattamento con l'inibitore della BTK ibrutinib e sono in corso diversi studi in cui si sta testando questa strategia.

È noto, infatti, che ibrutinib è in grado di modulare diversi compartimenti del sistema immunitario indipendentemente dal suo effetto di inibizione della trasduzione del segnale attraverso il pathway del recettore delle cellule B (BCR). Studi pre-clinici hanno dimostrato che può modulare la funzione delle

cellule T, aumentando la capacità delle CAR T-cells anti-CD19 di espandersi *in vivo* ed esercitando un effetto antitumorale. Inoltre, si è visto che le cellule T raccolte da pazienti trattati con ibrutinib si espandono maggiormente *ex vivo* e contengono una frazione maggiore di cellule T con fenotipo della memoria centrale rispetto alle cellule T dei pazienti non trattati con l'inibitore. In coloro che avevano assunto ibrutinib prima della raccolta delle cellule T si è anche osservato un ORR superiore.

Di recente, ricercatori della University of Pennsylvania hanno condotto uno studio prospettico nel quale hanno combinato CAR T-cells anti-CD19 (**CTL119**) con ibrutinib. Il trial ha coinvolto 19 pazienti che non avevano raggiunto una remissione completa nonostante un trattamento con l'inibitore di BTK per almeno 6 mesi. Nei 14 pazienti valutabili, a 3 mesi dall'infusione l'ORR è risultato del 71% e la percentuale di risposta completa del 43%, mentre 15 pazienti su 17 sono risultati MRD-negativi alla citometria a flusso.

Dati simili sono stati ottenuti in uno studio condotto presso il Fred Hutchinson Cancer Research Center di Seattle e presentato all'ultimo congresso dell'ASH. Il trial ha coinvolto 38 pazienti con leucemia linfatica cronica recidivata/refrattaria sottoposti a una singola infusione di CAR T-cells anti-CD19 (**JCAR014**), metà dei quali trattati anche in concomitanza con ibrutinib, iniziando 2 settimane prima della leucaferesi e

continuando fino ad almeno 3 mesi dopo l'infusione delle CAR T-cells. L'ORR è risultato più alto nel gruppo trattato con l'inibitore rispetto al gruppo che ha ricevuto solo le CAR T-cells (83% contro 65%), mentre la percentuale di risposta completa nel midollo osseo (misurata mediante sequenziamento di ultima generazione), è risultata rispettivamente dell'85% contro 50%.

Questi dati, nel loro insieme, suggeriscono che l'aggiunta di ibrutinib per almeno 2 settimane prima della leucaferesi può migliorare in modo significativo l'efficacia delle CAR T-cells, ma serve naturalmente un follow-up maggiore per confermarli. Nel frattempo, è stato già avviato lo studio di fase 1/2 **TRANSCEND-CLL 17004** (NCT03331198), nel quale si confronteranno sicurezza ed efficacia delle CAR T-cells liso-cel da sole o in combinazione con ibrutinib in pazienti con leucemia linfatica cronica o piccolo linfoma linfocitico recidivati/refrattari.

Altre strategie per migliorare gli outcome

Una possibile strategia per migliorare i risultati si basa sull'impiego di CAR T-cells allogeniche, ottenute a partire da cellule T di donatori sani e non dai pazienti. Ci sono studi in corso in cui si utilizzano CAR T-cells allogeniche in pazienti con leucemia linfoblástica acuta, ma il ruolo di quest'approccio nella leucemia linfatica cronica è ancora tutto da definire e i dati disponibili sono pochissimi.



Un'altra possibilità è quella di sviluppare CAR T-cells dirette contro antigeni diversi dal CD19 e sono attualmente in corso studi per lo più preclinici nei quali si stanno testando, per esempio, CAR T-cells aventi come bersaglio l'antigene CD20 (NCT03277729) o la catena leggera kappa (NCT00881920).

Infine, si stanno valutando CAR T-cells in grado di colpire più di un antigene (per esempio, CD19 più CD20 o CD19 più CD123), al fine di prevenire o superare la resistenza mediata dalla perdita dell'antigene CD19.

Bibliografia

- [1] K.C. Pehlivan, et al. CAR-T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Transforming the Treatment of Relapsed and Refractory Disease. *Curr Hematol Malig Rep* (2018) 13:396-406.
- [2] D.W. Lee, et al. Long-term outcomes following CD19 CAR T cell therapy for B-ALL are superior in patients receiving a fludarabine/cyclophosphamide preparative regimen and post-CAR hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2016;128:218.
- [3] R.A. Gardner, et al. Intent to treat leukemia remission by CD19CAR T-cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*. 2017:769208.
- [4] J.H. Park, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):449-59. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709919>.
- [5] D.W. Lee, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2015;385(9967):517-28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61403-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61403-3).
- [6] T.J. Fry, et al. CD22-targeted CAR T-cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med*. 2018; 24(1);20-8. <https://doi.org/10.1038/nm.4441>.
- [7] V.A. Chow, et al. Translating anti-CD19 CAR T-cell therapy into clinical practice for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2018;132(8):777-81.
- [8] S. Makita, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma: opportunities and challenges. *Drugs in Context* 2019; 8: 212567; doi: 10.7573/dic.212567.
- [9] E.A. Chong, et al. Sequential anti-CD19 directed chimeric antigen receptor modified T-cell therapy (CART19) and PD-1 blockade with pembrolizumab in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2018 132:4198; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-119502>.
- [10] C.A. Jacobson, Locke FL, Miklos DB, et al. End of phase 1 results from ZUMA-6: axicabtagene ciloleucel (axi-cel) in combination with atezolizumab for the treatment of patients with refractory diffuse large B cell lymphoma. *Blood*. 2018 132:4192; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111523>.
- [11] J.H. Park, et al. A phase I first-in-human clinical trial of CD19-targeted 19-28z/4-1BBL "Armored" CAR T-cells in patients with relapsed or refractory NHL and CLL including Richter's transformation. *Blood*. 2018 132:224; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-117737>.
- [12] S.A. Ali, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(13):1688-700;doi: 10.1182/blood-2016-04-711903. Epub 2016 Jul 13.
- [13] A.D. Cohen, et al. B-Cell Maturation Antigen (BCMA)-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART-BCMA) for Multiple Myeloma (MM): Initial Safety and Efficacy from a Phase I Study. *Blood* 2016 128:1147.
- [14] N.S. Raje, et al. bb2121 anti-BCMA CAR T-cell therapy in patients with relapsed/refractory multiple myeloma: Updated results from a multicenter phase I study. *J Clin Oncol*. 2018;36 (suppl; abstr 8007). https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.8007
- [15] N.S. Raje, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New Engl J Med*. 2019;380:1726-37; doi:10.1056/NEJMoa1817226.
- [16] W-H. Zhao, et al. Updated Analysis of a Phase 1, Open-Label Study of LCAR-B38M, a Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy Directed Against B-Cell Maturation Antigen, in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood* 2018 132:955; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110548>
- [17] X. Shi, et al. Tandem Autologous Transplantation and Combined Infusion of CD19 and Bcma-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells for High Risk MM: Initial Safety and Efficacy Report from a Clinical Pilot Study. *Blood* 2018 132:1009; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-117964>.
- [18] S. Mailankody, et al. JCARH125, Anti-BCMA CAR T-cell therapy for relapsed/refractory multiple myeloma: Initial proof of concept results from a phase 1/2 multicenter study (EVOLVE). *Blood* 2018 132:957; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-113548>.
- [19] T. Gregory, et al. Efficacy and safety of P-BCMA-101 CAR-T cells in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood* 2018 132:1012; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111419>.
- [20] S.M. Bair, D.L. Porter. Accelerating chimeric antigen receptor therapy in chronic lymphocytic leukemia: The development and challenges of chimeric antigen receptor T-cell therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2019;94(S1):S10-S17. doi: 10.1002/ajh.25457.

Effetti avversi delle CAR T-cells: quali sono e come si affrontano

La terapia con CAR T-cells rappresenta un approccio estremamente promettente per il trattamento delle neoplasie per le quali è stata approvata e studiata, ma, come tutte le terapie antitumorali, può causare effetti avversi, alcuni dei quali nuovi rispetto a quelli dei trattamenti convenzionali e peculiari di questo approccio terapeutico. Alcuni di queste tossicità possono essere molto gravi, e in qualche caso potenzialmente letali, ma i clinici stanno imparando a controllarle, via via che aumenta l'esperienza d'uso delle CAR T-cells. In ogni caso, la gestione di questi avversi richiede un attento monitoraggio e l'impiego di personale altamente specializzato e specificamente addestrato.

Gli eventi avversi risultati più frequenti nei pazienti finora trattati con le CAR T-cells sono la sindrome da rilascio di citochine (CRS), indicata anche (seppure impropriamente) come 'tempesta citochinica', le tossicità neurologiche, le infezioni e l'ipogammaglobulinemia. Possono, inoltre, comparire effetti 'on-target, off-tumor': CD19, infatti, l'antigene target delle CAR T-cells attualmente approvate, è espresso in varia misura, oltre che sulle cellule tumorali, anche su quelle normali, e ciò può portare alla comparsa di eventi avversi correlati all'azione del farmaco su queste cellule sane, come l'aplasia delle cellule B. Oltre all'aplasia delle cellule B, l'esperienza clinica che sta maturando sulle CAR T-cells indica che questo trattamento può indurre anche altre tipi di citopenie prolungate.

Negli ultimi anni, sono stati sviluppati vari algoritmi atti a fornire un *grading* accurato e coerente delle tossicità associate alle CAR T-cells e a dare indicazioni per il monitoraggio e la gestione degli eventi avversi associati alla terapia con queste cellule, in particolare dedicati alla CRS e alla neurotossicità [box].

La sindrome da rilascio di citochine (CRS)

La CRS è una tossicità immuno-mediata caratterizzata da un'iperattivazione del sistema immunitario, determinata da un rilascio massiccio di citochine infiammatorie da parte delle CAR T-cells e di altre cellule da esse attivate o lisate quando si espandono e si attivano nell'organismo.

Questo effetto avverso rappresenta la tossicità comparsa con maggiore frequenza nel corso dello sviluppo e dell'applicazione clinica delle CAR T-cells, in alcuni casi anche in modo severo, tanto da impattare sull'outcome del trattamento e portare, talvolta, addirittura alla morte del paziente. In generale, si sviluppa in circa l'80% e oltre dei soggetti trattati con CAR T-cells e finora si è manifestato in tutte le tipologie di pazienti, indipendentemente dall'età e dalla patologia oncoematologica di base. Negli studi registrativi sulle CAR T-cells finora approvate, la CRS ha mostrato un'incidenza compresa fra il 57% e il 93%, ma è bene ricordare che le differenze tra i due prodotti non sono comparabili, perché in tali studi l'incidenza è stata misurata con scale diverse (la *Penn grading scale* per tisagenlecleucel, i criteri di Lee per axi-cel).

Gli algoritmi per il *grading* della CRS

Gli algoritmi per il *grading*, il monitoraggio e la gestione della CRS e della neurotossicità, sono in continua evoluzione e ne sono stati proposti diversi nel corso del tempo.

- Il sistema di *grading* della CRS utilizzato nei primi studi clinici sulle CAR T-cells è stato quello del National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versione 4.03. In questo sistema, tuttavia, la definizione di CRS non comprendeva come prerequisito la febbre (oggi riconosciuta come sintomo cardine della CRS); inoltre, il sistema era più applicabile alla tossicità che si osserva con le infusioni di anticorpi piuttosto che con le infusioni di cellule.
- Questo sistema è stato in seguito migliorato e perfezionato da un gruppo di oncologi pediatri di diversi centri in cui stavano conducendo studi sulle CAR T-cells negli Stati Uniti, che hanno pubblicato un sistema di *grading* aggiornato e noto a tutti come **criteri di Lee**. In questa pubblicazione il gruppo di specialisti ha ridefinito i segni e sintomi associati alla CRS, incorporando le esperienze cliniche maturate nel frattempo con le CAR T-cells e includendo per la prima volta la febbre come tratto distintivo della sindrome. I criteri di Lee sono stati ampiamente adottati da molti gruppi che studiavano le CAR T-cells, soprattutto perché sono stati i primi a correlare ogni grado a un algoritmo terapeutico suggerito.
- Successivamente, la University of Pennsylvania ha proposto un ulteriore sistema di *grading*, noto come **Penn grading scale** (o **criteri di Porter**) e utilizzato in tutti gli studi sulle CAR T-cells condotti presso questo ateneo.

Questa scala tende ad assegnare un grado di CRS più alto rispetto ai criteri di Lee, ostacolando i confronti fra i dati di sicurezza prodotti in centri diversi.

- Più di recente, un gruppo di autori che hanno partecipato ai diversi studi registrativi, coordinato dall'MD Anderson Cancer Center della University of Texas, ha costituito il CAR-T-cell-Therapy-associated TOXicity (CARTOX) Working Group e nel settembre 2017 ha pubblicato su Nature Reviews Clinical Oncology un articolo contenente indicazioni per il *grading*, il monitoraggio e la gestione della CRS e della neurotossicità associate alla terapia con CAR-T-cells. La **scala CARTOX** è molto simile ai criteri di Lee, ma ha il vantaggio di essere più semplice da utilizzare e di proporre un sistema separato per il *grading* della neurotossicità.

I sistemi di *grading* di queste tossicità sono quindi cambiati nel tempo e i vari centri impegnati nella ricerca clinica sulle CAR T-cells hanno fino a pochissimo tempo fa utilizzato nei loro studi sistemi differenti, il che ha reso difficile, se non impossibile, comparare i risultati di sicurezza fra prodotti diversi e trial diversi. Per superare questo limite, armonizzare una volta per tutte il *grading* della CRS e della neurotossicità e far sì che i vari autori possano parlare un linguaggio comune quando vogliono confrontarsi su questi aspetti, nel giugno 2018 l'American Society for Blood and Marrow Transplantation, ASBMT (che da poco ha cambiato il nome in American Society for Transplantation and Cellular Therapy, ASTCT), ha convocato una consensus conference che ha riunito i maggiori esperti del settore e nella quale sono state proposte nuove definizioni e due nuovi sistemi di *gra-*

ding separati per la CRS e la tossicità neurologica. Le raccomandazioni e le indicazioni contenute in questa consensus dovrebbero quindi diventare d'ora in avanti quelle accettate e seguite in tutti i prossimi studi sulle CAR T-cells.

	Criteri di Lee	Penn grading scale (criteri di Porter)	Consensus ASTCT
Grado 1	Sintomi non fatali, che richiedono solo un trattamento sintomatico; per es, febbre, nausea, spossatezza, cefalea, mialgie, malessere	Reazione lieve trattata solo con terapia di supporto	Febbre $\geq 38^\circ\text{C}$
Grado 2	I sintomi richiedono e rispondono a un intervento moderato: richiesta di ossigeno $< 40\%$ o ipotensione responsiva ai fluidi o vasopressori a basse dosi o tossicità d'organo di grado 2	Reazione moderata richiedente una terapia endovena o nutrizione parenterale; segni lievi di disfunzione d'organo (creatinina \leq grado 2 o alterazioni epatiche \leq grado 3)	Febbre $\geq 38^\circ\text{C}$ con ipotensione non richiedente vasopressori e/o ipossia richiedente cannula nasale a basso flusso di ossigeno o blow by
Grado 3	I sintomi richiedono e rispondono a un intervento aggressivo: richiesta di ossigeno $< 40\%$ o ipotensione richiedente vasopressori multipli o ad alte dosi o tossicità d'organo di grado 3 o transaminite di grado 4	Reazione severa, richiedente ospedalizzazione; segni moderati di disfunzione d'organo (creatinina grado 3 o alterazioni epatiche grado 4) correlati alla CRS; ipotensione trattata con fluidi endovena o vasopressori a basse dosi; ipossiemia richiedente ossigenazione, BiPAP o CPAP	Febbre $\geq 38^\circ\text{C}$ con ipotensione richiedente un vasopressore con o senza vasopressina e/o ipossia richiedente cannula nasale ad alto flusso di ossigeno o maschera nonrebreather o maschera di Venturi
Grado 4	Sintomi potenzialmente fatali, che richiedono ventilazione di supporto per tossicità d'organo di grado 4 (transaminite esclusa)	Complicanze potenzialmente fatali, tra cui ipotensione richiedente sostanze vasoattive ad alte dosi o ipossiemia richiedente ventilazione meccanica	Febbre $\geq 38^\circ\text{C}$ con ipotensione richiedente più vasopressori (vasopressina esclusa) e/o ipossia richiedente pressione positiva (per es. CPAP, BiPAP, intubazione e ventilazione meccanica)

Figura. Confronto fra i sistemi di *grading* più usati in passato per il monitoraggio e il trattamento della CRS conseguente all'infusione di CAR T-cells (criteri di Lee e *Penn grading scale*) e il *grading* proposto di recente dalla consensus della ASTCT.

Anche se può comparire fino a 3 settimane dopo l'infusione delle CAR T-cells, in genere la sindrome si sviluppa entro la prima settimana e tende a progredire ulteriormente nelle due settimane successive. Negli studi registrativi il tempo medio di esordio è stato di 2-3 giorni.

Fisiopatologia della CRS

Il meccanismo fisiopatogenetico responsabile della CRS indotta dalle CAR T-cells non è ancora chiaro al 100% e molti gruppi di ricerca sono al lavoro per comprenderlo appieno in tutti i suoi aspetti. Sulla base delle conoscenze attuali, si ritiene che questa tossicità si sviluppi in due passaggi principali. Primo, l'interazione tra le CAR T-cells e le cellule bersaglio provoca l'attivazione e l'espansione delle CAR T-cells stesse e la lisi delle cellule immunitarie normali e tumorali, eventi che scatenano un rilascio di svariate citochine infiammatorie come l'interferone- γ (IFN- γ) e il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α). La combinazione di questi segnali innesca l'attivazione di macrofagi, monociti, cellule dendritiche e cellule endoteliali. Queste cellule attivate rilasciano a loro volta livelli elevati di citochine proinfiammatorie. In particolare, i macrofagi e le cellule endoteliali producono grandi quantità di interleuchina-6 (IL-6), che con un meccanismo di feedback positivo attiva ulteriormente le cellule T e altre cellule immunitarie provocando la tempesta citochinica e la progressione della sindrome. Nella **figura 1** è illustrato il possibile meccanismo patogenetico alla base della CRS.

Di recente, un team di ricercatori dell'IRCCS Ospedale San Raffaele di Milano, guidato da Attilio Bondanza, ha fatto una scoperta interessante, che ha permesso di migliorare e approfondire ulteriormente le conoscenze sulla patogenesi sia della CRS sia della neurotossicità, e che potrebbe avere una ricaduta terapeutica importante. Il gruppo ha sviluppato un modello di topo umanizzato – un topo con un sistema immunitario

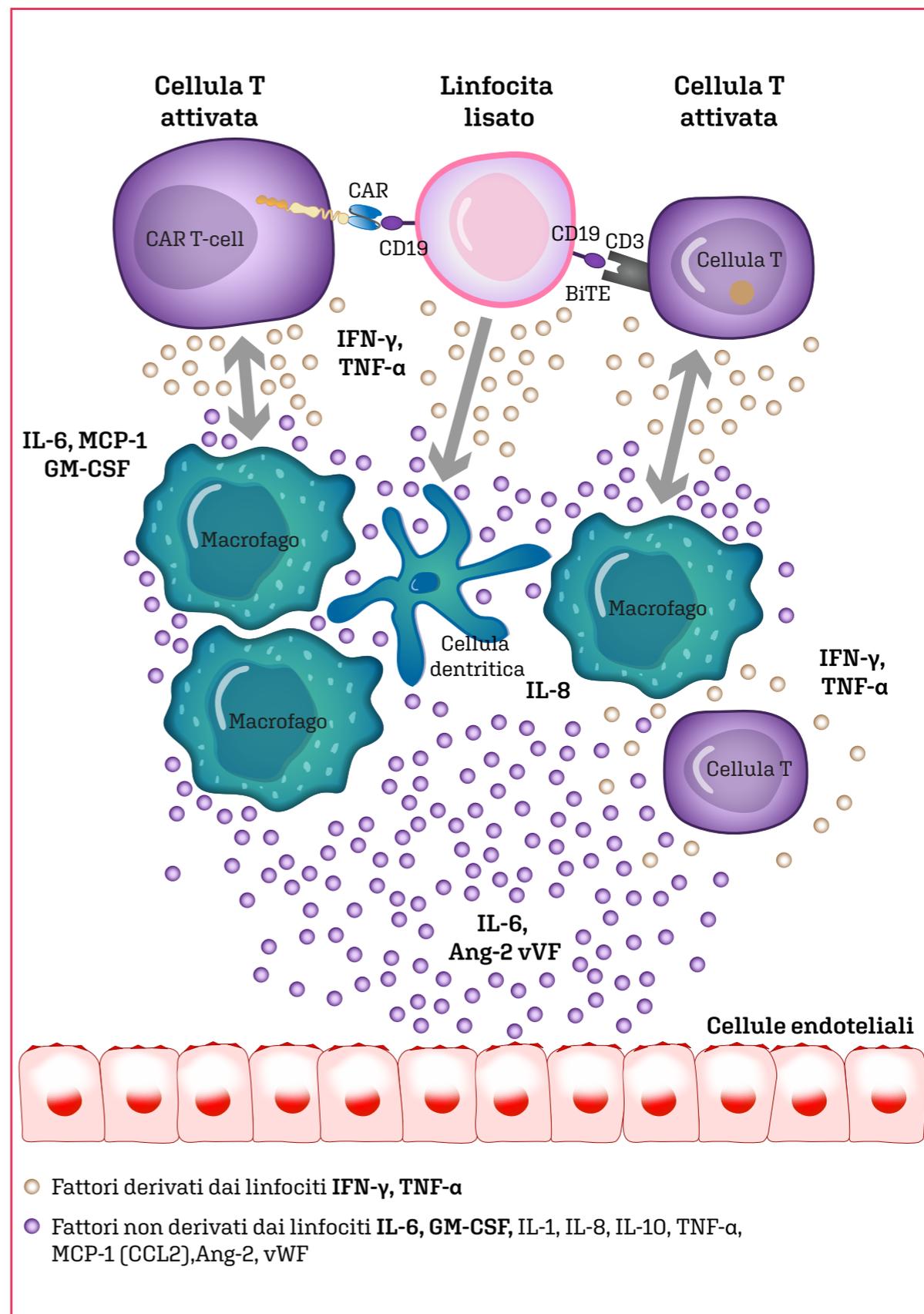


Figura 1. Meccanismo fisiopatogenetico proposto per la CRS.

molto simile a quello umano – in grado di riprodurre per la prima volta sia gli effetti terapeutici sia quelli tossici delle CAR T-cells osservati nell'uomo. In questo modello, i ricercatori hanno dimostrato che la CRS e la neurotossicità associate alle CAR T-cells sono causate in origine dall'interleuchina -1 (IL-1), una citochina diversa dall'IL-6. Studiando la relazione tra IL-1 e IL-6, il gruppo ha dimostrato che la prima citochina a essere prodotta è in realtà l'IL-1, il cui rilascio ad opera principalmente dei monociti innesca una reazione a catena che porta a sua volta al rilascio dell'IL-6 e, quindi, all'insorgere della CRS e della tossicità neurologica.

Le manifestazioni della CRS

Clinicamente, la CRS può presentarsi con svariati sintomi che paiono essere determinati in gran parte dall'aumento dell'IL-6, possono andare da una sindrome prodromica a manifestazioni potenzialmente letali e possono coinvolgere diversi organi e apparati (**tabella 1**).

La sindrome prodromica si manifesta come una sindrome simil-influenzale caratterizzata da febbre, affaticamento, mal di testa, mialgia, artralgia e malessere. La febbre alta

($\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) è il più frequente e spesso il primo segno clinico della CRS; in alcuni casi può salire oltre i $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e nei pazienti che sviluppano una CRS grave raggiunge il picco più velocemente e dura più a lungo rispetto ai coloro che sviluppano una CRS lieve o moderata. Sono comuni anche i sintomi gastrointestinali come nausea, vomito, diarrea e anoressia. Inoltre, sono state osservate reazioni avverse aggiuntive a livello di altri organi e apparati, tra cui insufficienza cardiaca transitoria e aritmia, ipotensione, dispnea, tachipnea, ipossia, edema polmonare, insufficienza renale, incremento delle transaminasi e della bilirubina. In alcuni casi, contestualmente alla CRS, sono state riportate alterazioni della coagulazione anche gravi come la coagulazione intravascolare disseminata (CID), bassi livelli di fibrinogeno, sindrome da aumentata permeabilità capillare (CLS) e linfoistiocitosi emofagocitica/sindrome da attivazione macrofagica (HLH/MAS).

La CRS grave è caratterizzata da instabilità emodinamica e disfunzione d'organo, ma è spesso preceduta da segni lievi o moderati come l'ipossia e un'ipotensione lieve, a cui i clinici devono porre attenzione.

Sintomi generali	Gastrointestinali	Cardiovascolari	Polmonari	Ematologici	Altri organi
Febbre	Nausea	Tachicardia	Ipossia	Citopenie prolungate	Transaminite/epatite
Malessere	Vomito	Ipotensione	Dispnea	Coagulazione intravascolare disseminata	Danno renale acuto
Artralgia/mialgia	Diarrea	Aritmie cardiache	Edema polmonare dovuto ad aumentata permeabilità capillare		
Nausea	Anoressia	Shock	Sindrome da distress respiratorio acuto		
Mal di testa					
Rash					
Diaforesi					

Tabella 1. I sintomi principali della CRS.

I fattori di rischio per la CRS e la sua correlazione con l'efficacia del trattamento

Nei pazienti pediatrici e giovani adulti con leucemia linfoblastica acuta a cellule B, i fattori di rischio di CRS grave sono una percentuale di blasti nel midollo $\geq 50\%$ (elevato carico di malattia prima dell'infusione), un'accelerazione incontrollata dei blasti in seguito alla chemioterapia, infezioni in corso. Nei pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B, i fattori di rischio per lo sviluppo di CRS grave non sono ancora del tutto noti.

In linea generale, lo sviluppo di una CRS è associato all'efficacia clinica del trattamento, a un carico elevato di malattia (maggiore è la sua estensione, maggiore è la probabilità di sviluppare una CRS severa), nonché alla dose e alla potenza delle CAR T-cells somministrate. Tuttavia, la CRS rappresenta una limitazione importante della terapia con CAR T-cells e la gestione delle sue manifestazioni rappresenta tuttora una sfida, nonostante si stiano facendo progressi notevoli su questo fronte via via che aumenta il numero di pazienti trattati e si prosegue il follow-up.

Il trattamento della CRS

Come si tratta un paziente che sviluppa una CRS? L'attuale gestione della CRS segue un sistema di *grading* basato sui sintomi e i segni vitali. I sistemi di *grading* più utilizzati fino a poco tempo fa per il monitoraggio e il trattamento di una CRS insorta dopo l'infusione di CAR T-cells erano i criteri di Lee e la *UPenn grading scale*. Entrambi prevedono quattro gradi di severità, ma presentano alcune differenze che impediscono di fare confronti fra i due prodotti e i risultati dei diversi studi. Per risolvere queste discrepanze e armonizzare le definizioni e i sistemi di *grading* della CRS e della neurotossicità, l'American Society for Transplantation and Cellular Therapy (ASTCT; nota fino a poco tempo fa come American Society for

Blood and Marrow Transplantation, ASBMT) ha convocato nel giugno 2018 una consensus conference nella quale è stato sviluppato un sistema di *grading* uniforme, obiettivo, di facile impiego e, in ultima analisi, più accurato nel classificare la gravità di queste due tossicità (box). Nella figura 2 sono schematizzati il sistema di *grading* proposto dalla consensus dell'ASTCT e i diversi approcci di gestione della sindrome a seconda del livello di gravità.

Quando compaiono i sintomi di una CRS iniziale, il paziente deve essere sottoposto a stretta osservazione e a terapie di supporto standard (antipiretici e/o analgesici), cercando di evitare i FANS, che possono influire sulla funzione renale; inoltre, occorre escludere la presenza di infezioni ed eseguire una profilassi con antibiotici ad ampio spettro se il paziente è neutropenico, per contrastare il rischio infettivo, di per sé elevato (specie per quanto riguarda le infezioni batteriche) nei pazienti trattati con una chemioterapia linfodepletiva e poi con le CAR T-cells.

Nei pazienti con CRS di grado 2, bisogna fare attenzione a non eccedere con la somministrazione di fluidi endovena per via del rischio di aumentata permeabilità capillare e di conseguente edema polmonare.

Nei casi di CRS severa (grado 3 e 4), un pronto riconoscimento dei sintomi e una tempestiva impostazione di un trattamento adeguato sono cruciali per ottenere una risoluzione del problema. Per gestire gli episodi di CRS severa, il farmaco attualmente più utilizzato, sia negli studi clinici sia nella pratica clinica, in virtù del ruolo dell'IL-6 nella patogenesi della sindrome, è tocilizumab, un anticorpo monoclonale ad azione antinfiammatoria diretto contro la citochina e in uso già da diversi anni per il trattamento dell'artrite reumatoide e altre malattie reumatologiche. Il farmaco ha dimostrato di blocca-

re questa citochina infiammatoria portando a una risoluzione molto rapida (poche ore) dei sintomi della sindrome (compresi la febbre e l'ipotensione), sembra senza causare l'eliminazione delle CAR T-cells infuse e comprometterne l'attività. Parallelamente all'approvazione di tisagenlecleucel e axi-cel, i due prodotti a base di CAR T-cells finora autorizzati, sia l'Fda sia l'EmA hanno quindi dato il loro via libera a tocilizumab come trattamento per la CRS severa o potenzialmente letale. Questa

nuova indicazione del farmaco si basa su un'analisi retrospettiva dei dati ottenuti dagli studi condotti su pazienti trattati con CAR T-cells, nella quale si è valutata l'efficacia di tocilizumab nel trattamento della CRS e si è visto che dopo una o due somministrazioni di anticorpo il 69% dei pazienti aveva ottenuto una risoluzione completa della sindrome entro 2 settimane. Sebbene il farmaco sia indicato solo per il trattamento della CRS grave, il suo impiego andrebbe comunque preso in

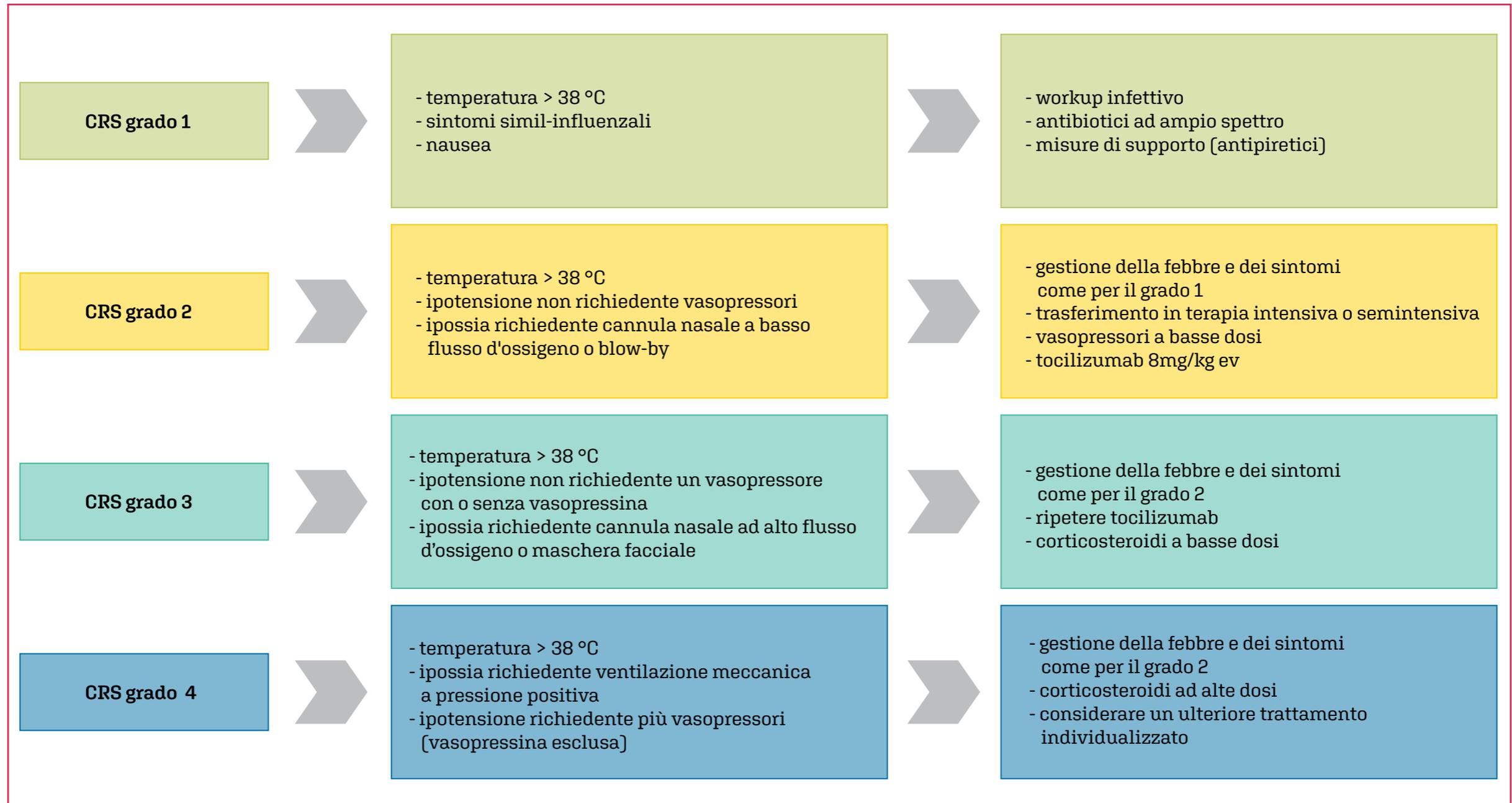


Figura 2. Grading della CRS proposto dalla consensus conference della ASTCT e gestione dei diversi gradi della sindrome.

considerazione anche in caso di CRS moderata (grado 2). I ricercatori stanno tuttora valutando l'effetto del blocco dell'IL-6 sull'espansione delle CAR T-cells infuse, sulla loro persistenza e, soprattutto, sul loro effetto antitumorale. Nonostante questi aspetti ancora da chiarire, tuttavia, l'impiego di tocilizumab è ad oggi generalmente accettato come trattamento di prima linea per la CRS severa insorta dopo un'infusione di CAR T-cells.

In presenza di CRS severa, è molto utilizzato anche il trattamento con corticosteroidi sistemici. Questi farmaci vanno utilizzati entro 12-24 ore dall'inizio di tocilizumab in assenza di un miglioramento clinico o in qualsiasi momento in presenza di un peggioramento. L'agente di prima scelta è considerato desametasone, in virtù della sua maggiore penetrazione nel sistema nervoso centrale. La dose iniziale utilizzata è per lo più 10 mg di desametasone ogni 6 ore o equivalente, ma la dose può essere incrementata (fino a 1000 mg di metilprednisolone ogni 24 ore o equivalente) e la durata del trattamento varia in base alla sintomatologia da trattare. Tuttavia, non vi è accordo unanime sull'utilizzo di una terapia steroidea per tempi lunghi (oltre 14 giorni); infatti, l'uso prolungato di corticosteroidi sistemici ad alte dosi ha dimostrato di ridurre la persistenza e potenzialmente l'efficacia a lungo termine delle CAR T-cells somministrate.

La scoperta sopracitata del team del San Raffaele di Milano sul ruolo dell'IL-1 all'origine delle manifestazioni cliniche della CRS e della neurotossicità potrebbe avere un'importante ricaduta anche sul fronte del trattamento di tali tossicità. I ricercatori hanno dimostrato, infatti, la potenziale efficacia contro di esse di anakinra, un farmaco che interferisce con l'IL-1 ed è attualmente approvato per il trattamento dei segni e dei sintomi dell'artrite reumatoide, in associazione a metotrexate, nei pazienti che non rispondono adeguatamente al solo metotrexate. La scoperta di Bondanza e i suoi collaboratori, pubbli-

cata nel maggio 2018 su Nature Medicine, potrebbe rendere la terapia con CAR T-cells molto più sicura, in quanto la somministrazione di anakinra potrebbe contrastare sia la CRS sia la neurotossicità. L'efficacia del farmaco, dimostrata per ora sul modello murino, dovrà, tuttavia, essere confermata prossimamente sull'uomo.

In letteratura sono riportati anche casi aneddotici di utilizzo dell'anticorpo anti-TNF- α infliximab e di etanercept (entrambi approvati per il trattamento di malattie infiammatorie quali artrite reumatoide, artrite psoriasica, psoriasi e morbo di Crohn) che hanno mostrato di portare a un miglioramento dei sintomi della CRS. Un'ulteriore possibilità è rappresentata dall'impiego dell'anticorpo monoclonale siltuximab, che si lega all'IL-6 solubile; questo farmaco, tuttavia, non è stato studiato come terapia di prima linea della CRS e non è attualmente approvato per quest'indicazione.

La neurotossicità (ICANS)

La neurotossicità è uno degli eventi avversi più comuni nei pazienti trattati con le CAR T-cells. La tossicità neurologica correlata a questa terapia, indicata in passato come sindrome encefalopatica correlata alle CAR T-cells (CRES), alla luce della pubblicazione della consensus dell'ASTCT sul nuovo sistema di *grading* della CRS e della neurotossicità viene ora indicata come sindrome da neurotossicità associata alle cellule effettrici immunitarie (ICANS).

L'incidenza del problema può andare dallo 0 all'87%, ma si è visto che la frequenza dei sintomi neurologici varia in base alla patologia oncoematologica di base e all'età del soggetto. Tossicità neurologiche quali confusione e convulsioni si sono osservate nella maggior parte degli studi sulle CAR T-cells. Tuttavia, nella maggior parte dei casi queste neurotossicità si sono dimostrate di breve durata e reversibili. Un'evenienza più

grave, che in qualche caso ha addirittura causato il decesso del paziente, è rappresentata dall'edema cerebrale, osservato in alcuni dei trial su CAR T-cells sviluppate per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta. Il problema, tuttavia, sembra avere un'incidenza limitata.

Nella stragrande maggioranza dei pazienti (il 90% circa), gli eventi neurologici si manifestano in concomitanza con la CRS

o anche in seguito alla sua risoluzione; nel 10% circa, invece, si sviluppano anche in assenza della CRS, ma in questi casi i segni e sintomi neurologici sono tipicamente lievi. Viceversa, una CRS grave tende ad associarsi a una neurotossicità grave, così come un carico elevato di malattia.

Fisiopatologia della neurotossicità

La fisiopatologia delle tossicità neurologiche delle CAR T-cells non è ancora pienamente compresa, ma l'assenza di una sua stretta associazione temporale con la CRS indica che potrebbe essere almeno parzialmente indipendente da quella alla base della CRS stessa, come suggerito anche dal fatto che il trattamento con l'anti-IL-6 tocilizumab non sembra essere di beneficio nel trattamento dei sintomi neurologici.

I meccanismi in gioco sembrano essere più d'uno (**figura 3**), ma gli studi più recenti suggeriscono un ruolo di primo piano per la produzione dell'IL-1 da parte dei monociti e per la distruzione della barriera ematoencefalica (formata dalle cellule endoteliali circondate dalla lamina basale, dai periciti, dalla microglia e dagli astrociti), determinata da vari fattori, tra cui l'attivazione delle cellule endoteliali e i macrofagi perivascolari e il rilascio di citochine infiammatorie come l'IFN- γ , il TNF- α , l'IL-6 e l'IL-1. Anche il disegno del CAR sembra avere un ruolo in questo senso.

Il danno subito dalla barriera ematoencefalica, in particolare, permette la migrazione delle cellule T (fra cui le CAR T-cells) nel parenchima cerebrale e la diffusione passiva delle citochine effettrici nel fluido cerebrospinale, portando a un'infiammazione del sistema nervoso centrale.

Presentazione clinica della neurotossicità

I sintomi e la presentazione della neurotossicità sono variabili e possono andare da segni sottili, come cefalea, affaticamento, lievi difficoltà della parola o afasia, a presentazioni più

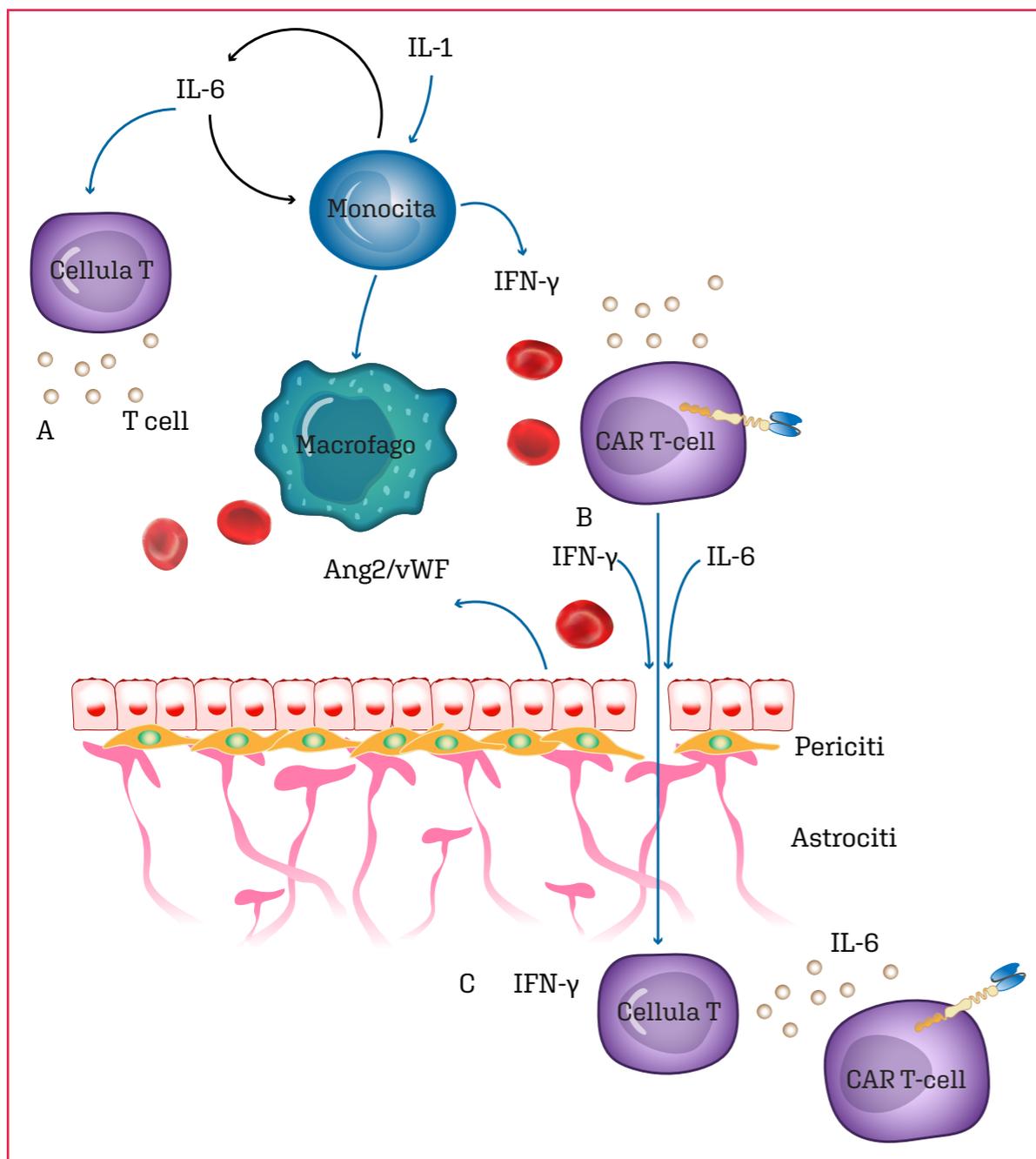


Figura 3. Meccanismi fisiopatogenetici proposti per la neurotossicità.

gravi e potenzialmente letali quali convulsioni, innalzamento della pressione intracranica con edema cerebrale, encefalopatia e coma (**tabella 2**). Altre possibili manifestazioni sono perdita di memoria, vertigini, meningismo, alterazioni dello stato mentale (confusione, disorientamento, deficit dell'attenzione, agitazione, delirio, allucinazioni) e disturbi del movimento (tremori, mioclono, automatismi facciali).

Negli studi registrativi, il tempo mediano di esordio della neurotossicità è risultato di 4-6 giorni (dunque, leggermente superiore rispetto a quello della CRS), mentre la durata mediana dell'evento avverso è stata di 17 giorni con axi-cel e rispettivamente 6 giorni nei pazienti con leucemia linfoblastica acuta e 14 giorni in quelli con linfoma diffuso a grandi cellule B trattati con tisagenlecleucel.

Gestione della neurotossicità

Così come la CRS, anche la neurotossicità deve essere riconosciuta prontamente, vista la sua potenziale pericolosità. I pazienti trattati con le CAR T-cells vanno quindi sottoposti a uno stretto monitoraggio per cogliere l'eventuale comparsa di eventi neurologici e, in tal caso, sottoposti a opportuni esami diagnostici e trattati in base alla specifica sintomatologia neurologica.

Così come per la CRS, la gestione della neurotossicità si basa su un sistema di *grading* e nella **figura 4** è illustrato un algoritmo di gestione basato sul *grading* proposto dalla consensus dell'ASTCT.

Attualmente non vi è consenso sull'impiego della profilassi anticonvulsivante con levetiracetam nei pazienti trattati con le CAR T-cells: mentre alcuni centri la prescrivono prima dell'infusione e fino a 30 giorni dopo, altri la riservano ai pazienti ad alto rischio di neurotossicità.

In caso di ICANS lieve (grado ≤ 1), il paziente deve essere monitorato strettamente e ricevere terapie di supporto, se necessario. In presenza di una ICANS più grave (grado ≥ 2) si suggerisce di considerare il ricovero in terapia intensiva, che è raccomandato se la tossicità è di grado ≥ 3 . In alcuni casi, l'ICANS può richiedere l'intubazione del paziente e la ventilazione meccanica per una protezione delle vie aeree anche in assenza di insufficienza respiratoria.

Il trattamento si basa attualmente sull'utilizzo dei corticosteroidi a dosi diverse a seconda della gravità dell'ICANS. Il trattamento raccomandato consiste nella somministrazione di desametasone 10 mg ogni 6 ore fino alla risoluzione dei sintomi; nei pazienti con ICANS di grado 4 si suggeriscono alte dosi di metilprednisolone (per esempio, 1000 mg ogni 24 ore), ma l'impiego di steroidi ad alto dosaggio resta controverso a causa dell'inibizione esercitata da questi farmaci sull'espansione delle CAR T-cells.

Sintomi generali	Disturbi del linguaggio	Alterazioni dello stato mentale	Disturbi del movimento
Cefalea	Disartria	Confusione	Tremori
Affaticamento	Afasia	Disorientamento	Mioclono
Perdita di memoria		Deficit dell'attenzione	Automatismi facciali
Meningismo		Agitazione	
Convulsioni		Delirio	
Aumento della pressione intracranica		Allucinazioni	
Edema cerebrale		Coma	

Tabella 2. Le principali manifestazioni della neurotossicità.

È importante sottolineare che il trattamento con tocilizumab è raccomandato solo in presenza di una CRS concomitante. Infatti, mentre l'anticorpo è molto efficace contro la CRS, la neurotossicità di per sé non risponde al blocco dell'IL-6 nella maggior parte dei pazienti e tocilizumab può addirittura aggravarla.

Inoltre, non ci sono ad oggi evidenze sufficienti per fornire raccomandazioni di trattamento per i pazienti che non rispondono agli steroidi. Il trattamento con l'anti-IL-1 anakinra si è dimostrato efficace nello spegnere la neurotossicità nel modello murino, ma la sua validità deve ancora essere confermata nell'uomo. Ulteriori opzioni, anch'esse ancora da testare in studi clinici, potrebbero essere rappresentate dall'inibizione

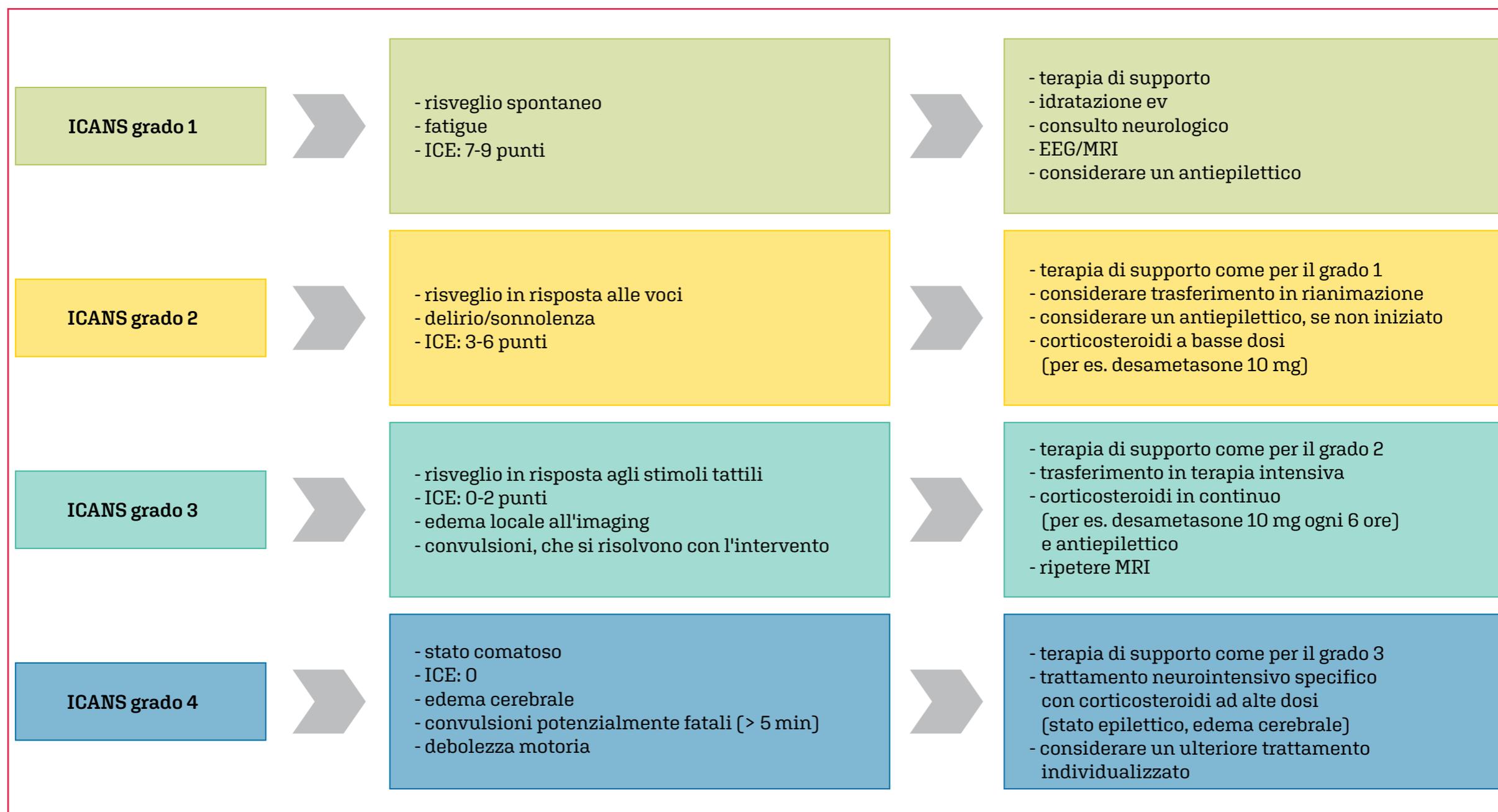


Figura 4. Grading della neurotossicità (ICANS) proposta dalla consensus conference della ASTCT e gestione dell'evento avverso in funzione del livello di gravità. L'ICE (Immune Effector Cell-Associated Encephalopathy) score è un sistema non validato di scoring neurologico utilizzato per stimare facilmente lo stato neurologico dei pazienti trattati con CAR T-cells.

del GM-CSF con l'anticorpo lenzilumab, per prevenire l'infiammazione sistemica causata dall'attivazione dei monociti, e dall'impiego di natalizumab per inibire la penetrazione delle cellule T nel sistema nervoso centrale.

Infezioni e ipogammaglobulinemia

I pazienti che presentano infezioni in corso non dovrebbero essere trattati con le CAR T-cells fino a che l'infezione non si è risolta. I pazienti che vengono sottoposti a questo trattamento, invece, devono essere monitorati per cogliere gli eventuali segni e sintomi di infezione e, se opportuno, sottoposti a una profilassi antibiotica; inoltre, prima e durante il trattamento con CAR T-cells vanno eseguiti esami di controllo (per esempio, emocromo, VES, PCR, dosaggio delle immunoglobuline, emocolture e urinocolture al bisogno). Le infezioni, infatti, sono una delle possibili complicanze della CRS, ma nel contempo possono facilitarne l'insorgenza, qualora già in atto al momento dell'infusione delle cellule.

In caso di neutropenia febbrile, l'infezione deve essere valutata e gestita in modo appropriato con antibiotici ad ampio spettro, fluidi e altre terapie di supporto, come da indicazione medica.

Nei pazienti trattati con CAR T-cells che sviluppano infezioni, le cause possono essere diverse: le patologie ematologiche di base, le terapie già effettuate dai pazienti per curare tali patologie, ma anche la prolungata citopenia che ne può talvolta derivare e che va trattata come indicato dalle linee guida standard. In presenza di infezioni non è raccomandato l'utilizzo dei fattori di crescita mieloide (GM-CSF), perché possono peggiorare i sintomi della CRS se utilizzati nelle prime 3 settimane di terapia o fino a quando la sindrome non si è risolta.

Nei pazienti trattati con CAR T-cells sono stati anche segnalati casi di riattivazione del virus dell'epatite B (HBV), che ta-

lora ha portato a insufficienza epatica o epatite fulminante. È fondamentale, quindi, eseguire uno screening sierologico per i virus HBV, HCV e HIV prima di iniziare il trattamento chemioterapico linfodepletante e l'infusione delle CAR T-cells.

Inoltre, dopo il trattamento con le CAR T-cells possono verificarsi episodi di ipogammaglobulinemia e agammaglobulinemia, che sono in realtà una conseguenza dell'aplasia delle cellule B, una tossicità *'on-target, off-tumor'* delle CAR T-cells anti-CD19 (vedi sotto) che può manifestarsi in alcuni casi. Pertanto, nei pazienti sottoposti a questa terapia è importante monitorare il livello di immunoglobuline ed eseguire una profilassi antibiotica e infusioni di immunoglobuline come raccomandato clinicamente nella normale gestione del paziente neutropenico e/o ipogammaglobulinemico.

Tossicità *'on-target, off-tumor'*

Tale tipo di tossicità è legata al fatto che l'antigene target (*'on target'*) delle CAR T-cells è espresso anche sulle cellule normali (*'off tumor'*), oltre a quelle tumorali. Di conseguenza, le CAR T-cells somministrate al paziente riconoscono e colpiscono anche l'antigene presente nei tessuti sani, e non solo nel tumore. Questa forma di tossicità autoimmune può essere letale se l'antigene in questione è iperespresso in tessuti vitali, e in particolare nei polmoni, nel cuore, nel fegato o in altri organi essenziali.

L'aplasia delle cellule B

Una tossicità *'on target, off tumor'* che si manifesta soprattutto in pazienti sottoposti a molte linee di terapia prima della somministrazione di CAR T-cells anti-CD19, come tisagenlecleucel e axi-cel, è l'aplasia midollare, in particolare l'aplasia delle cellule B. Tale tossicità dipende dall'espressione dell'antigene CD19 (bersaglio di queste CAR T-cells) sulle cellule B tumorali, ma anche sulle cellule B normali, sia in via di differenziazione sia mature, che quindi possono essere anch'esse attaccate

delle CAR T-cells. L'aplasia delle cellule B che ne può derivare, e l'ipogammaglobulinemia che ne è una diretta conseguenza, oltre ad essere clinicamente gestibili, sono considerate anche biomarker del funzionamento delle CAR T-cells anti-CD 19.

Tuttavia, un'aplasia e un'ipogammaglobulinemia prolungate possono impattare in modo severo sulla morbilità e la mortalità dei pazienti, perché aumentano notevolmente il rischio di infezioni, che vanno prevenute tramite una profilassi con antibiotici e/o un trattamento sostitutivo con immunoglobuline in tutti i pazienti che presentano aplasia midollare.

I meccanismi in base ai quali tale aplasia si manifesta in alcuni pazienti e altri no sono ancora poco conosciuti. Un follow-up più lungo dei pazienti trattati con CAR T-cells permetterà di avere maggiori informazioni al riguardo e valutare se potranno svilupparsi o meno altri effetti *'on-target, off-tumor'* (per esempio, seconde neoplasie).

Citopenie prolungate

Nonostante l'attenzione dei ricercatori, in tema di sicurezza delle CAR T-cells, si sia concentrata soprattutto sulla CRS e sulla neurotossicità, che sono complicanze 'nuove' rispetto a quelle delle terapie antitumorali più convenzionali, l'esperienza finora maturata con le CAR T-cells antiCD-19 approvate dalle autorità regolatorie ha evidenziato che un'altra tossicità da non trascurare è rappresentata dalle citopenie prolungate, fra le quali rientra anche l'aplasia delle cellule B, che espongono il paziente a un rischio aumentato di infezioni.

Le citopenie si sono rivelate l'effetto avverso di grado > 3 osservato con maggiore frequenza con tisagenlecleucel e axi-cel e si è visto che possono persistere per svariate settimane (anche mesi) dopo l'infusione e avere un'incidenza paragonabile a quella associata alle tradizionali chemioterapie di salvataggio.

Sebbene non siano ancora del tutto noti, i fattori più importanti correlati allo sviluppo di citopenie sembrano essere il regime di condizionamento, le citochine rilasciate durante la CRS, la sindrome da attivazione macrofagica e l'esposizione precedente a molteplici regimi chemioterapici.

Le citopenie più comuni sono la trombocitopenia severa (11-38% nei due studi registrativi) e la neutropenia, inclusa la neutropenia febbrile (17-37%). Ciononostante, l'impiego dei fattori di crescita mieloide, in particolare il GM-CSF, non è raccomandato nelle prime 3 settimane post-infusione e finché un'eventuale CRS non si sia risolta, perché si è visto che i pazienti nei quali si ha neurotossicità grave presentano livelli elevati di G-CSF e GM-CSF, che potrebbero essere correlati allo sviluppo di quest'evento avverso.

Bibliografia

- [1] A. Titov, et al. The biological basis and clinical symptoms of CAR-T therapy-associated toxicities. *Cell Death Dis.* 2018;9(9):897; doi: 10.1038/s41419-018-0918-x.
- [2] National Cancer Institute. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE). Version 4.0. https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf
- [3] D.W.Lee, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 2014;124(2):188-95; doi:10.1182/blood-2014-05-552729.
- [4] S. Neelapu, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy – assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018 Jan;15(1):47-62; doi: 10.1038/nrclinonc.2017.148. Epub 2017 Sep 19
- [5] D. Porter. *Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel.* *J Hematol Oncol.* 2018; 11(1):35; doi: 10.1186/s13045-018-0571-y.
- [6] D. W. Lee, et al. ASTCT Consensus *Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells.* *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(4):625-38; doi: 10.1016/j.bbmt.2018.12.758.
- [7] M. Norelli, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T-cells. *Nat Med.* 2018;24(6):739-48; doi: 10.1038/s41591-018-0036-4. Epub 2018 May 28.
- [8] L. Yanez, et al. CAR T cell Toxicity: Current Management and Future Directions. *HemaSphere.* 2019;3:2;p e186; doi: 10.1097/HS9.000000000000186.
- [9] In the Eye of the Storm: Immune-mediated Toxicities Associated With CAR-T Cell Therapy; *HemaSphere.* 2019;3:2;p e191; doi: 10.1097/HS9.000000000000191.



Che cos'hanno insegnato finora gli studi sulle CAR T-cells anti-CD19

Dai risultati degli studi registrativi che hanno coinvolto le due terapie con CAR T-cells anti-CD19 ad oggi approvate dalle agenzie regolatorie (tisagenlecleucel e axi-cel) e dai primi dati di *'real life'* già disponibili, sono emersi alcuni principi clinici generalizzabili che, sebbene necessitino di ulteriori conferme nel lungo periodo, possono già orientare i medici e i ricercatori attivi in questo campo in rapidissima evoluzione ([tabella 1](#)).

Le terapie precedenti possono impattare su composizione e funzione delle cellule T

Prima di essere sottoposti all'infusione, i pazienti potrebbero aver fatto varie terapie (per esempio, la chemioterapia linfodepletiva, anticorpi con lunga emi-vita o terapie orali continue come gli inibitori delle tirosin-chinasi) che potrebbero impattare in vario modo sulle cellule T utilizzate come materiale di partenza per la produzione delle CAR T-cells, e ci sono prove che la funzionalità del prodotto è influenzata dalla composizione dei sottogruppi di cellule T circolanti al momento del prelievo. Anche la composizione in cellule T del prodotto finale è importante e influenzata dal materiale di partenza. Per esempio, si è visto che la presenza di un subset di cellule naïve/della memoria centrale CCR7+ correla con un picco di espansione delle CAR T-cells e con un funzionamento ottimale, e che i pazienti ottengono risultati migliori quando si utilizzano subset capaci di secernere tipi diversi di citochine.

Un esempio di terapia in grado di influire sulle cellule T è rappresentato dall'inibitore di BTK ibrutinib, che, oltre a inibire la

proliferazione delle cellule B tumorali, stimola la produzione di linfociti Th 1. Inoltre, pazienti che erano stati trattati con ibrutinib prima dell'infusione con le CAR T-cells hanno mostrato una maggiore espansione *ex vivo* delle cellule e un mag-

Alcune lezioni apprese dagli studi condotti fino ad oggi con le CAR T-cells anti-CD19

- Le terapie effettuate dal paziente prima della leucaferesi possono influire sulla composizione del materiale di partenza per la produzione delle CAR T-cells.
- La chemioterapia linfodepletiva praticata prima dell'infusione favorisce espansione e persistenza delle CAR T-cells infuse.
- Un carico tumorale elevato prima del trattamento è associato a risultati peggiori.
- L'espansione delle CAR T-cells nell'organismo del paziente è necessaria per ottenere una risposta al trattamento.
- Raggiungere una risposta completa o molecolare è essenziale ai fini dell'outcome.
- La tossicità della terapia è correlata all'espansione delle CAR T-cells.
- Diversi meccanismi contribuiscono allo sviluppo di resistenza alla terapia con CAR T-cells.

Tabella 1.

giore attecchimento *in vivo* rispetto a quelli che non avevano ricevuto l'inibitore.

Pertanto, un obiettivo clinico emergente è quello di utilizzare trattamenti che ottimizzino la funzionalità delle cellule T circolanti prima della raccolta per la produzione delle CAR T-cells.

L'utilità della chemioterapia linfodepletiva

È stato ampiamente dimostrato che sottoporre i pazienti a una chemioterapia linfodepletiva prima dell'infusione migliora l'efficacia delle CAR T-cells, in quanto crea un ambiente favorevole per la loro espansione, una volta infuse. Il regime linfodepletante attualmente più utilizzato è costituito da ciclofosfamide e fludarabina somministrate per 1-3 giorni. La ciclofosfamide ha mostrato in modelli murini di ridurre il carico tumorale e nel contempo di migliorare l'espansione e la persistenza delle CAR T-cells, in parte riducendo le cellule Treg, modificando il profilo citochinico e riducendo le risposte immuni anti-CAR T-cells; l'aggiunta della fludarabina favorisce una persistenza più duratura delle CAR T-cells. Un'ulteriore ottimizzazione del regime linfodepletante potrebbe aumentare ancor di più espansione e persistenza delle cellule infuse, riducendo la tossicità del trattamento.

Un carico di malattia elevato è associato ad outcome peggiori

Sia nel linfoma diffuso a grandi cellule B, sia nella leucemia linfoblastica acuta a cellule B, sia nella leucemia linfatica cronica, un alto carico di malattia iniziale aumenta il rischio di avere una risposta limitata al trattamento con gli agenti standard. Allo stesso modo, un carico elevato di malattia prima dell'infusione delle CAR T-cells sta emergendo come fattore predittivo di outcome sfavorevole, quanto meno per le leucemie. Per esempio, nella leucemia linfoblastica acuta a cellule B si è osservato che i pazienti con più del 5% di blasti nel mi-

dollo osseo prima del trattamento hanno avuto risposte meno durature rispetto a quelli con una quantità di blasti inferiore. Inoltre, un alto carico di malattia ha mostrato di essere un fattore predittivo dello sviluppo di CRS. Il carico di malattia potrebbe essere un surrogato imperfetto dell'eterogeneità clonale, dell'evasione immunitaria o di altri processi che potrebbero contribuire allo sviluppo di resistenza alla terapia. Pertanto, strategie mirate a ridurre tale carico prima della somministrazione delle CAR T-cells potrebbero migliorare gli outcome.

Espansione delle CAR T-cells fattore chiave per la risposta

Espansione e persistenza delle CAR T-cells stanno dimostrando di essere forti fattori predittivi di risposta a questa terapia. Per esempio, in uno studio recente del gruppo di James Kochenderfer, pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B che hanno ottenuto una risposta completa o parziale hanno mostrato un picco di concentrazione delle CAR T-cells sei volte superiore rispetto a quelli nei quali la malattia si era solo stabilizzata o aveva progredito. Anche nello studio registrativo ZUMA-1 il picco e il numero cumulativo delle CAR T-cells (axi-cel) sono risultati predittivi dell'outcome. Sebbene possa anche succedere che un paziente non risponda al trattamento nonostante una forte espansione delle cellule somministrate, in genere un'espansione debole è associata a un fallimento terapeutico. Molti gruppi di ricerca, quindi, stanno lavorando attivamente per migliorare la struttura dei CAR in modo da aumentare l'espansione delle cellule infuse, al fine di favorire un miglioramento dei risultati clinici.

Raggiungere una risposta completa è importante ai fini dell'outcome

Nel caso di neoplasie aggressive a cellule B come il linfoma diffuso a grandi cellule B o la leucemia linfoblastica acuta, la durata della risposta alla chemioterapia è breve se i pazien-

ti non raggiungono una risposta completa. Invece, nel caso di neoplasie tipicamente indolenti come la leucemia linfatica cronica, si possono avere risposte durature anche in presenza di una risposta solo parziale, sebbene l'outcome sia in genere migliore in caso di risposta completa. Anche se le CAR T-cells hanno un meccanismo d'azione totalmente diverso rispetto alla classica chemioterapia, sembra che raggiungere una risposta profonda sia comunque un fattore chiave per il successo di questo trattamento. Nello studio ZUMA-1, per esempio, la percentuale di risposta completa è risultata inizialmente del 54% e dopo un follow-up mediano di 8,7 mesi era ancora del 39%, mentre i pazienti che hanno raggiunto una risposta parziale hanno recidivato entro 2 mesi. Tuttavia, negli studi sulla leucemia linfoblastica acuta, nonostante il trattamento con le CAR T-cells si sia associato ad alte percentuali di risposta completa con MRD negativa, molti pazienti in seguito hanno recidivato. Dunque, le CAR T-cells sono in grado di indurre risposte profonde e sembra che il raggiungimento di una risposta profonda sia essenziale per il successo del trattamento, ma resta da stabilire quale sia il grado di profondità adeguato per ciascuna patologia.

Tossicità della terapia correlata all'espansione delle CAR T-cells

Diversi studi hanno evidenziato una forte correlazione tra espansione delle CAR T-cells e neurotossicità. Allo stesso modo, la CRS è correlata con i livelli di citochine circolanti, che a loro volta possono essere correlati alla funzionalità delle CAR T-cells. In alcuni trial, anche caratteristiche della patologia di base come l'infiltrato midollare e il carico tumorale hanno mostrato di poter influire sullo sviluppo di queste complicanze del trattamento.

Finora, il trattamento delle tossicità si è basato per lo più sull'utilizzo dei corticosteroidi e, nel caso della CRS, di anti-

corpi anti-IL-6 (tocilizumab). Sebbene questi agenti possano limitare l'espansione delle CAR T-cells e ridurre i livelli di citochine circolanti, in generale sembrano non impattare negativamente sulle percentuali di risposta, forse perché i pazienti che sviluppano tali effetti avversi hanno già un numero sufficiente di CAR T-cells funzionali circolanti. Una strada possibile per mitigare la tossicità potrebbe essere quella di effettuare una profilassi e i risultati dei primi studi nei quali si è testata questa strategia sembrano essere promettenti.

Diversi meccanismi di resistenza

La terapia con CAR T-cells può non funzionare per diverse ragioni. Alcuni pazienti non rispondono fin dall'inizio, il che potrebbe dipendere da una mancata espansione delle cellule infuse o da una resistenza intrinseca del tumore; altri inizialmente rispondono, ma finiscono poi per ricadere.

Nella leucemia linfoblastica acuta a cellule B, si sono osservate recidive legate a uno *switch* della linea cellulare da una leucemia linfoide CD19-positiva a una leucemia mieloide CD19-negativa oppure a mutazioni o *splicing* alternativo del gene CD19, che danno origine a recidive CD19-negative (fuga o evasione antigenica).

Un altro meccanismo di resistenza è legato al fatto che le CAR T-cells possono non persistere sufficientemente a lungo e che si ha una ripresa delle cellule tumorali CD19-positive una volta che le CAR T-cells si sono ridotte di numero.

Altra possibilità è l'esaurimento funzionale delle CAR T-cells mediato dal tumore. L'esame di biopsie di pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B eseguite prima e dopo l'infusione delle CAR T-cells anti-CD19, per esempio, ha evidenziato una variazione significativa del microambiente tumorale dopo il trattamento, caratterizzata da una sovraregolazione dei

checkpoint immunitari. Sulla base di questo riscontro, sono già stati avviati i primi studi in cui si stanno valutando CAR T-cells in combinazione con inibitori dei checkpoint immunitari.

Infine, sta emergendo come possibile causa di resistenza la presenza di CAR-blasti, cioè cellule leucemiche che esprimono il CAR. I pazienti con malattia refrattaria hanno spesso cellule leucemiche circolanti nel sangue che vengono raccolte durante la leucoferesi assieme alle cellule T. Di norma, queste cellule tumorali vengono uccise dalle cellule T trasdotte con il CAR durante il processo di produzione. Tuttavia, sono stati segnalati casi in cui anche la cellula leucemica viene trasdotta con il gene del CAR, il quale, una volta espresso sulla superficie della cellula, si pensa possa bloccare il CD19 presente anch'esso sulla sua superficie, impedendo il riconoscimento e l'attacco da parte delle CAR T-cells, e ciò ha portato alla comparsa di cellule leucemiche recidivanti esprimenti il CAR.

Fattori predittivi di outcome positivi della terapia con CAR T-cells:

- basso carico di malattia iniziale;
- chemioterapia linfodepletiva prima dell'infusione;
- espansione elevata delle cellule T una volta infuse nel paziente;
- raggiungimento di una risposta profonda.

Fattori predittivi di tossicità:

- alto carico tumorale;
- forte espansione delle CAR T-cells;
- rilascio massiccio di citochine.

Possibili meccanismi di resistenza:

- *switch* da fenotipo linfoide a fenotipo mieloide;
- mutazioni o *splicing* alternativo del gene CD19 (fuga antigenica);
- esaurimento funzionale delle CAR T-cells mediato dal tumore;
- presenza di blasti che esprimono il CAR.

CAR T-cells, una terapia possibile anche per i tumori solidi?

A partire dal 2010 fino ad oggi, la terapia con CAR T-cells dirette contro l'antigene CD19 ha dato risultati molto incoraggianti nei tumori ematologici delle cellule B, risultati che stanno aprendo una nuova frontiera nel trattamento di queste neoplasie, con percentuali di remissione che in alcuni casi superano il 90%. Per questo motivo, gli sforzi dei ricercatori si sono presto indirizzati anche verso un possibile impiego dell'immunoterapia cellulare con CAR T-cells anche nei tumori solidi.

Tuttavia, nonostante i progressi compiuti nella messa a punto di CAR T-cells sempre più efficaci e persistenti, le neoplasie solide restano ancora una terra di conquista per questa forma di immunoterapia cellulare. Gli studi condotti finora, infatti, oltre ad essere molto più preliminari rispetto a quelli sui tumori del sangue, hanno dato risultati decisamente meno favorevoli. Nonostante dati preclinici positivi, non si sono ancora osservati guadagni clinici realmente significativi e aleggia ancora un certo scetticismo sul fatto che le CAR T-cells potranno avere nei tumori solidi lo stesso successo ottenuto in quelli ematologici.

Molte sfide da superare

La messa a punto di CAR T-cells adatte al trattamento di lesioni neoplastiche solide, infatti, è complessa e ostacolata da diversi fattori, tra cui:

- difficoltà di trovare antigeni adatti;
- microambiente tumorale ostile e immunosoppressivo;
- scarsa capacità delle CAR T-cells di raggiungere il tumore da colpire;



Dott.ssa Alessandra Curioni-Fontecedro

Le CAR T-cells nei tumori solidi: mito o realtà?

 **GUARDA IL VIDEO**

- proliferazione e persistenza limitate nell'ospite;
- forte barriera stromale in alcuni tumori.

Difficile trovare antigeni idonei da colpire

Alcuni ritengono che trovare antigeni adatti per colpire tumori solidi sia l'ostacolo principale nella creazione di CAR T-cells realmente efficaci contro queste neoplasie e che potrebbe rivelarsi nella maggior parte dei casi troppo difficile.

Innanzitutto, si ritiene che la stragrande maggioranza degli antigeni tumorali si trovi all'interno delle cellule tumorali, e quindi fuori dalla portata delle CAR T-cells, che possono le-

garsi solo agli antigeni presenti sulla superficie cellulare. In secondo luogo, gli sforzi per identificare antigeni presenti unicamente sulla superficie dei tumori solidi finora sono stati in gran parte infruttuosi.

Ancor più che nelle neoplasie ematologiche, si è rivelato molto difficile costruire un CAR diretto contro un antigene espresso solo sul tumore, ma non nel tessuto sano, mantenendo l'efficacia e nel contempo limitando la tossicità al di fuori del tessuto tumorale. Pertanto, la maggior parte degli studi su CAR T-cells utilizzate contro neoplasie solide ha evidenziato finora tossicità gravi, e in presenza di CAR T-cells potenti persino una bassa espressione degli antigeni bersaglio in tessuti distanti dal tumore ha mostrato di poter dar luogo a effetti devastanti. Per esempio, la somministrazione di una dose elevata di CAR T-cells dirette contro ERBB2 in un paziente affetto da carcinoma del colon-retto ha causato un'insufficienza multiorgano, con una tossicità polmonare acuta, dovuta all'espressione dell'antigene sull'epitelio polmonare, che ha portato al decesso del paziente entro 5 giorni dall'infusione delle cellule. Alcuni antigeni tumore-specifici sono stati identificati; tuttavia, le CAR T-cells sviluppate contro di essi, pur mostrando un profilo di sicurezza più favorevole, si sono rivelate scarsamente efficaci nei pazienti, portando, nella maggior parte dei casi, non più che a una stabilizzazione della malattia.

Il microambiente tumorale 'rema contro'

Anche ipotizzando di riuscire a identificare e colpire l'antigene perfetto per una neoplasia solida, un altro ostacolo chiave per il trattamento di questi tumori è che i componenti del microambiente circostante concorrono in vario modo a sopprimere la risposta immunitaria, per esempio, tramite componenti cellulari come le cellule T regolatorie (Treg) o le cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC) e citochine immunosoppressive come l'IL-10, l'IL-4 o il TGF- β o altri fattori come l'espressione dell'enzima indolamina 2,3 diossigenasi (IDO), che

blocca la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule T, la deplezione di glucosio, la deprivazione di nutrienti, l'acidosi. D'altro canto, le stesse CAR T-cells, una volta attivate, esprimono recettori ad azione immunorepressiva, tra cui PD-1, CTLA-4 o Fas, che in seguito all'interazione coi rispettivi ligandi sopprimono la risposta delle cellule T.

Difficoltà nel raggiungere il tumore da colpire

Mentre nel caso delle neoplasie ematologiche le cellule tumorali da colpire circolano nel sangue e sono raggiungibili 'semplicemente' eseguendo un'infusione endovenosa delle CAR T-cells, la localizzazione dei tumori solidi, a volte poco vascolarizzati e circondati da vari strati di cellule, rende più difficile trovare un modo per far arrivare le CAR T-cells al tumore bersaglio.

Barriera stromale da penetrare

Inoltre, alcuni tumori solidi hanno una forte barriera stromale che ostacola la penetrazione delle CAR T-cells nella lesione e ci sono evidenze crescenti che un trattamento efficace dei tumori avanzati richieda la rottura di questa barriera e l'eliminazione delle cellule dello stroma, quest'ultima mediata dal rilascio di IFN- γ e accompagnata da un'infiltrazione di macrofagi M1.

Diverse strategie possibili per superare gli ostacoli

Per tutte queste ragioni, alcuni autori ritengono che altre forme di immunoterapia, cellulare e non, possano essere più adatte delle CAR T-cells per il trattamento dei tumori solidi. Non c'è dubbio che finora, per queste neoplasie, l'immunoterapia con gli inibitori dei checkpoint immunitari (come l'anti-CTLA-4 ipilimumab e gli anti-PD-1 pembrolizumab e nivolumab) e l'immunoterapia cellulare con linfociti infiltranti il tumore (TIL) abbiano avuto molto più successo rispetto alle CAR T-cells.

Per questo motivo, una possibilità al vaglio dei ricercatori è quella di combinare le cellule T 'riprogrammate' con questi

due tipi di immunoterapia, nella speranza di ottenere un effetto sinergico e aumentarne in tal modo l'efficacia nei confronti delle neoplasie solide.

Nonostante i successi limitati ottenuti finora, infatti, la ricerca non si ferma, vi sono molti trial in corso sulle CAR T-cells come possibile trattamento per i tumori solidi e sono allo studio diverse strategie che permettano di superare gli ostacoli sopra menzionati.

CAR T-cells di quarta generazione e approccio su tre fronti

Secondo molti autori, per riuscire a mettere a punto CAR T-cells efficaci contro i tumori solidi bisognerà arrivare a produrre CAR di quarta generazione, adottando un approccio che coinvolga tre fronti (**figura 1**):

- 1) costruire un CAR in grado di legarsi con alta affinità non solo a uno, ma a più di un antigene tumorale;
- 2) selezionare un sottogruppo di cellule T con una potente capacità di migrazione verso la sede tumorale e di auto-rinnovamento, al fine di garantire una persistenza e un'immunità prolungate;
- 3) capacità di sinergizzare con la risposta endogena dell'ospite ai neoantigeni tumorali.

Fino a oggi, infatti, agire su uno solo di questi aspetti non è stato sufficiente per ottenere risposte durature da parte di tumori solidi aggressivi.

Cellule T 'armored'

Per superare il problema del microambiente tumorale immunosoppressivo, diversi gruppi stanno progettando CAR T-cells 'armored' con CAR dotati di domini aggiuntivi rispetto a quelli attuali, che permettano di limitare i segnali soppressivi o con-

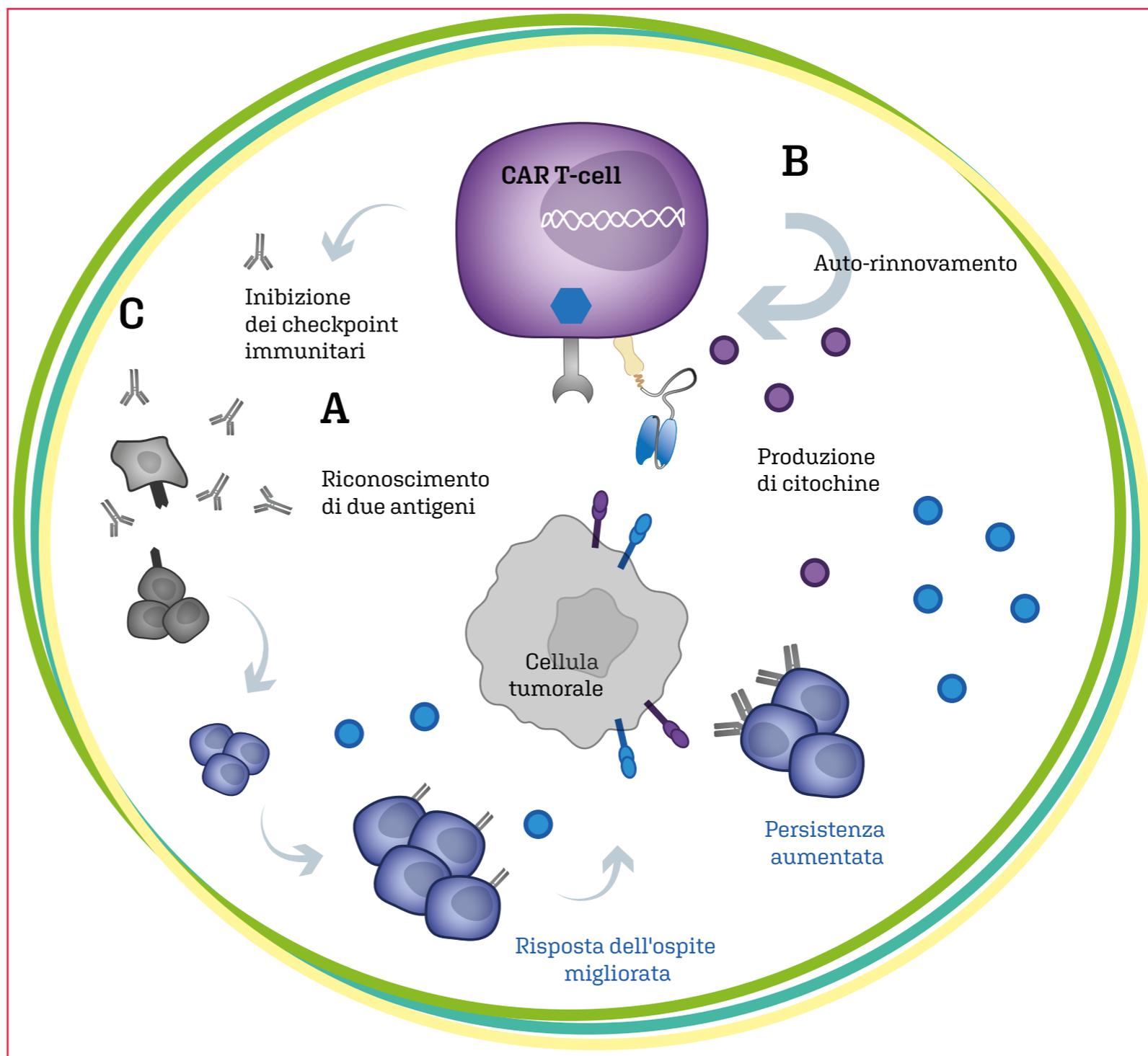


Figura 1

vertire i segnali soppressivi in segnali attivanti, al fine di aumentare efficacia e persistenza di queste cellule.

Ricercatori del Memorial Sloan Kettering Cancer Center di New York, per esempio, sono al lavoro per produrre CAR T-cells dotate di queste proprietà, ma non sono gli unici.

Vi sono diverse varianti di CAR T-cells 'armored' allo studio; tra le più promettenti vi sono quelle ingegnerizzate in modo da secernere la citochina infiammatoria IL-12 (di norma prodotta non dalle cellule T, ma da cellule dendritiche, macrofagi e neutrofili), oppure esprimere sulla loro superficie le proteine CD40L o 4-1BBL. Queste molecole hanno dimostrato di aumentare l'efficacia e la persistenza delle CAR T-cells in un microambiente tumorale ostile attraverso diversi meccanismi. Per esempio, la secrezione costitutiva di IL-12 da parte di CAR T-cells appositamente modificate può aumentare l'efficacia di queste cellule modulando il microambiente tumorale attraverso la stimolazione autocrina delle CAR T-cells stesse, la soppressione delle cellule Treg, la riprogrammazione dei macrofagi associati ai tumori e l'aumento della secrezione di IL-12 da parte delle cellule dendritiche (figura 2).

Alcune applicazioni promettenti

Glioblastoma

La neoplasia solida che sembra rappresentare una delle applicazioni più pro-

mettenti delle CAR T-cells in questo ambito è il glioblastoma ricorrente, un tumore cerebrale molto aggressivo, grazie all'espressione dell'antigene EGFRvIII, specifico di questo tumore, ma anche dell'antigene IL-13R α 2 (recettore alfa2 dell'IL-13), sovraespresso da più del 50% dei glioblastomi e associato a una bassa percentuale di sopravvivenza.

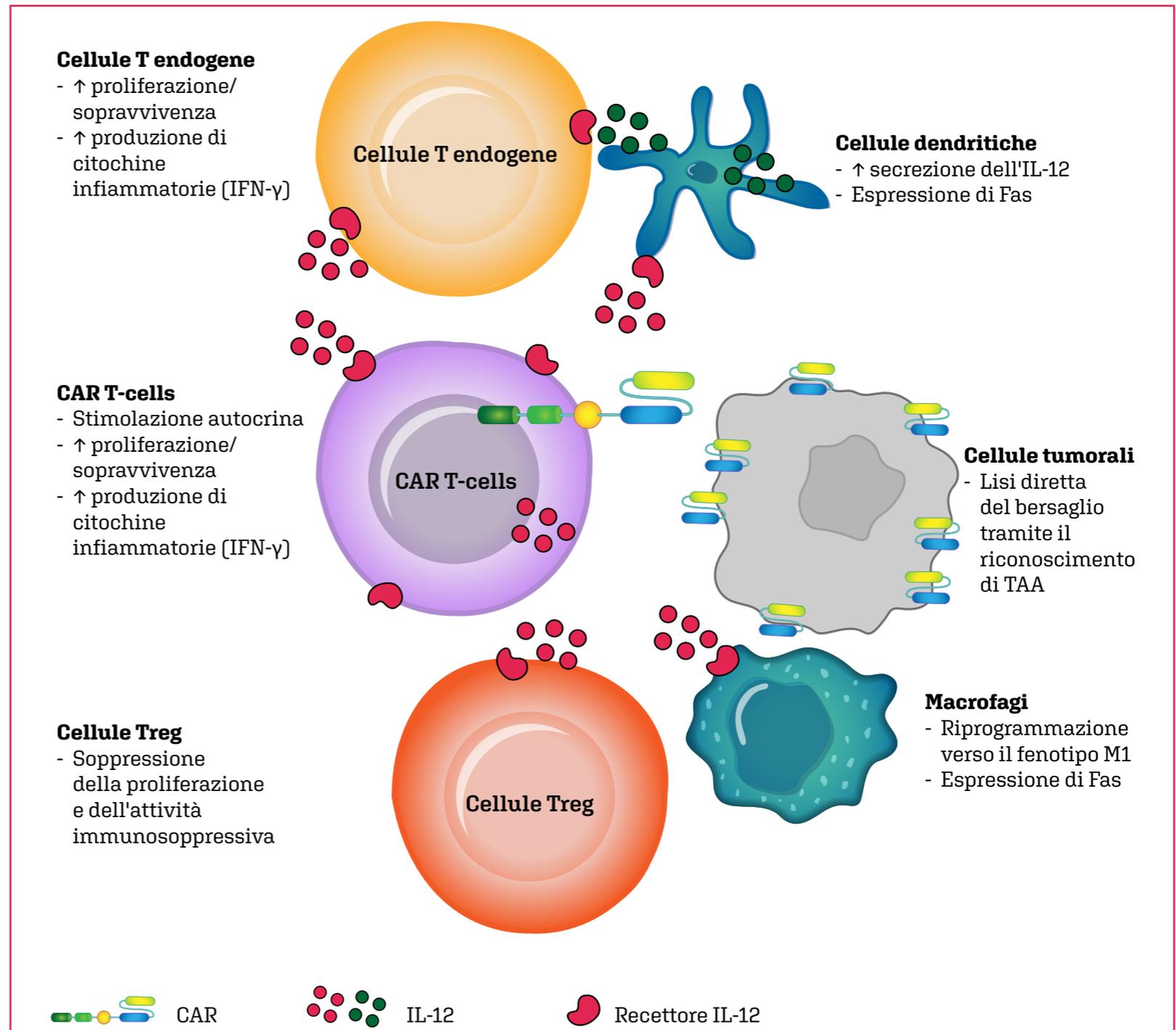


Figura 2

Uno studio recente su pazienti con glioblastoma ricorrente trattati con CAR T-cells anti-EGFRvIII ha dimostrato la sicurezza e la fattibilità di quest'approccio, ma ha anche evidenziato un'alta frequenza di perdita dell'antigene.

Invece, in uno studio pilota pubblicato sul *New England Journal of Medicine*, la somministrazione intracranica di CAR T-cells anti-IL-13R α 2 in un paziente con glioblastoma ricorrente multifocale si è associata a una risposta obiettiva mantenutasi per 7,5 mesi.

L'esperienza dell'Ospedale Bambino Gesù sul neuroblastoma

Presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma è in corso uno studio di fase 1/2 (NCT03373097) nel quale si stanno valutando sicurezza ed efficacia di CAR T-cells di terza generazione dirette contro l'antigene GD2 (GD2-CART01) 'home made Pediatrico', cioè prodotte presso l'Officina Farmaceutica del Bambino Gesù, su pazienti affetti da neuroblastoma (il tumore extracranico più comune in età pediatrica) recidivati/refrattari e/o ad alto rischio.

Per la fase 1, ormai conclusa, sono stati arruolati e trattati 9 pazienti. Sul fronte della sicurezza, tutti hanno sviluppato una CRS, che in tutti i casi, tranne uno, è stata di grado 1-2, tutti hanno sviluppato neutropenia, sei su 9 anche trombocitopenia, ma non si sono registrati episodi di neurotossicità. I dati di farmacocinetica sono molto positivi, perché mostrano che queste CAR T-cells si espandono nel paziente ancora di più rispetto a quanto osservato nella leucemia, in modo indipendente dal dosaggio. Anche i primi risultati di efficacia sono incoraggianti e l'imaging ha dimostrato che si può ottenere una risposta parziale o completa già dopo 6 settimane dall'infusione non solo sul tumore primitivo, ma anche sulle metastasi ossee e linfonodali.

CAR T-cells contro i sarcomi

All'ultimo congresso dell'American Association for Cancer Research (AACR) sono stati presentati i risultati di uno studio di fase 1 nel quale un gruppo del Baylor College of Medicine di Houston, coordinato da Shoba Navai, ha testato la combinazione di una chemioterapia linfodepletante seguita dal trattamento con CAR T-cells dirette contro la proteina HER2 in pazienti affetti da sarcoma ricorrente/refrattario HER2+, ottenendo risultati incoraggianti sia in termini di sicurezza sia di efficacia.

I ricercatori sono partiti dal presupposto che circa il 40% dei pazienti affetti da osteosarcoma esprime HER2 sulla superficie delle cellule tumorali e che l'HER2-positività aumenta il rischio di metastasi; vista l'inefficacia dimostrata da farmaci mirati anti-HER2 come trastuzumab contro questi tumori, il team ha pensato di provare un trattamento con CAR T-cells dirette contro questo bersaglio, preceduto da una linfodeplezione chemioterapica.

Il trial ha coinvolto 10 pazienti (cinque con osteosarcoma, tre con rhabdomyosarcoma, uno con sarcoma di Ewing e uno con sarcoma sinoviale; uno, affetto da rhabdomyosarcoma, è stato riarruolato e ritrattato) sia adulti sia pediatrici, affetti da sarcoma HER2+ refrattario/metastatico. I partecipanti sono stati sottoposti a un massimo di tre infusioni da 100 milioni di cellule/m² dopo la linfodeplezione con fludarabina o fludarabina più ciclofosfamide.

Il trattamento si è rivelato ben tollerato. 8 pazienti su 11 hanno sviluppato una CRS di grado 1-2 entro 24 ore dall'infusione, ma il problema si è risolto completamente dopo la somministrazione di una terapia di supporto entro 5 giorni dall'esordio. Inoltre, in alcuni pazienti si è osservato un beneficio clinico. Le CAR T-cells somministrate si sono espanse e nel 100% dei casi erano ancora rilevabili nell'organismo 6 settimane dopo l'infusione. In un paziente affetto da osteosarcoma con metastasi polmonari si è osservata una risposta completa mante-

nutasi per almeno 12 mesi. Un paziente con rhabdomyosarcoma e metastasi midollari ha ottenuto una risposta completa per 12 mesi, ma poi ha recidivato ed è stato quindi ritrattato con le CAR T-cells, raggiungendo di nuovo una risposta completa perdurata per circa 17 mesi. In tre pazienti si è osservata una stabilizzazione della malattia, mentre cinque sono andati incontro a una progressione del tumore.

Gli autori concludono che le CAR T-cells anti-HER2 da loro testate meritano di essere ulteriormente valutate in uno studio di fase 2, da sole o in combinazione con un altro approccio.

CAR T-cells anti-mesotelina

Uno degli antigeni bersaglio più promettenti nello sviluppo di CAR T-cells destinate al trattamento di tumori solidi è senza dubbio la mesotelina, che è sovraespressa sulle cellule di alcune delle neoplasie più aggressive, come il mesotelioma e il tumore al pancreas, ma non solo. Attualmente, diversi gruppi di ricerca stanno lavorando alla messa a punto di CAR T-cells dirette contro questo target.

Per esempio, ricercatori dell'NCI, guidati da Steven Rosenberg, stanno conducendo uno studio di fase 1/2 (NCT01583686) nel quale si stanno valutando la sicurezza, la dose ottimale e l'efficacia di CAR T-cells anti-mesotelina in pazienti con diversi tipi di tumori (ovarico, della cervice uterina, pancreatico, polmonare e mesotelioma) metastatici o non resecabili che esprimono la proteina, già trattati senza successo con almeno una terapia sistemica standard.

Un altro centro che sta lavorando su CAR T-cells di questo tipo è il Pancreatic Cancer Research Center della University of Pennsylvania. Nel marzo scorso, Gregory L. Beatty, direttore della ricerca traslazionale, ha presentato all'Immunotherapy of Cancer Clinical Immuno-Oncology Symposium organizzato dall'ASCO i dati di uno studio di fase 1 nel quale si stanno uti-

lizzando CAR T-cells anti-mesotelina messe a punto presso il suo centro in pazienti con carcinoma pancreatico. Questo antigene, infatti, è sovraespresso nelle cellule dell'adenocarcinoma duttale del pancreas. Beatty e i colleghi hanno valutato sicurezza, fattibilità e attività del trattamento con CAR T-cells anti-mesotelina in sei pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas metastatico e refrattario, già trattati con almeno due linee di terapia. Le CAR T-cells sono state infuse tre volte alla settimana per un totale di 9 dosi. Non si sono osservate tossicità dose-limitanti né casi di CRS. Gli eventi avversi più comuni sono risultati l'affaticamento e il dolore addominale, che potrebbero essere correlati al tumore in sé stesso. La migliore risposta obiettiva osservata è stata una stabilizzazione della malattia in due pazienti, nei quali si è osservata una PFS rispettivamente di 3,8 e 5,4 mesi. A un mese dal trattamento, tutte le metastasi epatiche si erano ridotte completamente, mentre la lesione primaria non è risultata intaccata dalle CAR T-cells. Secondo gli autori, comunque, lo studio dimostra che le CAR T-cells anti-mesotelina possono avere un'attività biologica nei pazienti con carcinoma pancreatico, sebbene nella specifica sede anatomica della malattia possano intervenire meccanismi di evasione differenti.

Sta lavorando su CAR T-cells dirette contro questo bersaglio anche un gruppo del Memorial Sloan Kettering Cancer Center, coordinato da Prasad S. Adusumili. All'ultimo congresso dell'AACR, l'autore ha presentato i dati incoraggianti di sicurezza ed efficacia di un trial di fase 1 su pazienti affetti da neoplasia maligna pleurica (correlata a un mesotelioma pleurico primario o a una malattia metastatica secondaria) sottoposti a una singola somministrazione intrapleurica di CAR T-cells anti-mesotelina (con o senza un precondizionamento con ciclofosfamide). Lo studio ha coinvolto 21 pazienti (di cui 19 con mesotelioma primario), circa il 40% dei quali già trattati con diversi cicli di chemioterapia. Il trattamento si è dimostrato

sicuro, senza tossicità *'on-target, off-tumor'*, e sono emerse evidenze di attività antitumorale, hanno riferito gli autori. Alcuni pazienti sono stati trattati anche con un inibitore di PD-1 e in questo gruppo la percentuale di risposta è risultata del 73%. Adusumili ha detto che questi dati rappresentano “la prima storia di successo della terapia a base di CAR T-cells nei tumori solidi”. Alla luce di questi risultati incoraggianti, il team ha già pianificato uno studio su una combinazione di CAR T-cells anti-mesotelina e inibitori dei checkpoint immunitari, che dovrebbe partire nel secondo trimestre del 2019.

Questi risultati presentati agli ultimi congressi stanno iniziando a cambiare lievemente la percezione dei clinici riguardo alle possibilità di applicazione e di successo della terapia con CAR T-cells nei tumori solidi. Tuttavia, la ricerca su questo fronte ha ancora molta strada da fare, perché bisognerà innanzitutto verificare se l'attività incoraggiante preliminare si mantiene anche nel lungo periodo. Gli ultimi studi, inoltre, sembrano suggerire che nel caso dei tumori solidi questo trattamento potrebbe richiedere più di un'infusione e che le CAR T-cells potrebbero dover essere usate non in alternativa, bensì in combinazione con altri approcci terapeutici; una possibilità, questa, che tra l'altro riporta in primo piano la questione di non poco conto dei costi del trattamento.

Bibliografia

- [1] A. Holzinger & H. Abken. T Cells for the Adoptive Cell Therapy of Malignant Diseases. In: Immunotherapy - Myths, Reality, Ideas, Future; 169-99; <http://dx.doi.org/10.5772/66496>
- [2] H.M. Knochelmann, et al. CAR T-cells in Solid Tumors: Blueprints for Building effective Therapies. *Frontiers in Immunology* 2018; Volume 9; Article 1740; doi: 10.3389/fimmu.2018.01740.
- [3] O.O. Yeku & R.J. Brentjens. Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(2):412-8; doi: 10.1042/BST20150291.
- [4] D.M. O'Rourke, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T-cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med.* 2017;9(399). pii: eaaa0984; doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
- [5] C.E. Brown, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *N Engl J Med* 2016;375(26):2561-9; doi:10.1056/NEJMoa1610497.
- [6] C. DeRenzo, et al. The Landscape of CAR T-cells Beyond Acute Lymphoblastic Leukemia for Pediatric Solid Tumors. *ASCO Educational Book 38* (May 23, 2018) 830-837; doi: 10.1200/EDBK_200773.
- [7] S. Navai, et al. Administration of HER2-CAR T-cells after lymphodepletion safely improves T cell expansion and induces clinical responses in patients with advanced sarcomas. *AACR 2019*; abstract LB-147/4. <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/6812/presentation/9413>
- [8] G.L. Beatty, et al. Activity of mesothelin-specific chimeric antigen receptor T cells against pancreatic carcinoma metastases in a phase 1 trial. *Gastroenterology.* 2018;155(1):29-32. doi: 10.1053/j.gastro.2018.03.029.
- [9] P.S. Adusumilli, et al. A phase I clinical trial of malignant pleural disease treated with regionally delivered autologous mesothelin-targeted CAR T-cells: Safety and efficacy. *AACR 2019*; abstract CT036. <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/6812/presentation/9837>

CAR T-CELLS 'INDUSTRIALI' APPROVATE O DI PROSSIMA APPROVAZIONE

Tisagenlecleucel (Novartis)

Axi-cel (Gilead)

Liso-cel e ide-cel (Celgene)

JnJ-4528 (Janssen)

UCART19 (Servier)



Iscriviti alla newsletter
di PharmaStar

PHARMASTAR[★]
il Giornale online sui Farmaci

Tisagenlecleucel, le CAR T-cells anti-CD19 di Novartis

Tisagenlecleucel (noto inizialmente con la sigla CTL019) è stata la prima terapia a base di CAR T-cells in assoluto ad essere approvata dalle agenzie regolatorie statunitensi ed europee, Fda ed Ema.

Il prodotto è stato messo a punto inizialmente all'Università della Pennsylvania dal gruppo di Carl June e poi, dopo la firma di uno storico accordo tra l'ateneo statunitense e Novartis nel 2012, sviluppato ulteriormente e messo in commercio dalla multinazionale, con il marchio Kymriah.

Che cos'è tisagenlecleucel

Tisagenlecleucel è un'immunoterapia cellulare a base di CAR T-cells di seconda generazione che hanno come bersaglio l'antigene CD19, presente in modo ubiquitario sulla superficie delle cellule della linea B e su quelle dei tumori derivati da cellule B.

Il prodotto è costituito da cellule T autologhe estratte dal sangue del paziente, riprogrammate geneticamente in laboratorio in modo da esprimere un CAR capace di riconoscere l'antigene CD19, legarsi alle cellule che esprimono quest'antigene sulla loro superficie, e, di conseguenza, attivarsi ed eliminarle.

Come si produce tisagenlecleucel

Una volta separate dal sangue periferico mediante leucaferesi (processo che richiede da 2 a 3 ore), le cellule T vengono inviate al sito di produzione, dove vengono poste in coltura, attivate, trasdotte con un transgene chimerico codificante per il CAR caratteristico di tisagenlecleucel, utilizzando come vettore un

lentivirus (eliminato dopo 3 giorni di coltura) ed espanse. Le CAR T-cells così ottenute vengono quindi concentrate, lavate e, infine, criopreservate in un mezzo infusibile, per garantirne la sopravvivenza durante il trasporto al centro dove saranno somministrate al paziente.

Attualmente, Novartis produce le sue CAR T-cells presso due impianti produttivi: quello di Morris Plains, nel New Jersey (il primo a ricevere l'autorizzazione dell'Fda per la produzione di un'immunoterapia cellulare negli Stati Uniti e il sito dove sono state finora prodotte le cellule necessarie a tutti i pazienti che hanno partecipato ai trial di Novartis), e il Fraunhofer Institut für Zelltherapie di Lipsia, in Germania, che grazie a una partnership allargata con Novartis attualmente supporta la produzione di tisagenlecleucel per le sperimentazioni cliniche globali e per la produzione post-approvazione. La multinazionale potrebbe però ampliare presto la sua capacità produttiva grazie all'acquisizione, annunciata nel gennaio scorso, della *biotech* francese CELLforCURE, una delle prime e più importanti CDMO (*Contract Development and Manufacturing Organization*) che producono terapie cellulari e geniche in Europa. Nel 2020, inoltre, dovrebbe partire anche la produzione commerciale di tisagenlecleucel presso lo stabilimento Novartis di Stein, in Svizzera.

Al momento attuale, per la produzione di tisagenlecleucel e il suo invio nei centri autorizzati al suo impiego occorrono di norma 3-4 settimane, ma l'azienda continua a lavorare per migliorare il processo produttivo e per ridurre ulteriormente il tempo 'da vena a vena' (cioè il lasso di tempo intercorrente tra l'estra-

zione delle cellule T e la loro infusione nel paziente, una volta modificate).

Le cellule vengono somministrate mediante una singola infusione endovenosa da 2 a 14 giorni dopo che il paziente è stato sottoposto alla linfo-deplezione chemioterapica.

Attualmente la percentuale di successo nella produzione di queste CAR T-cells è in media del 93%.

Una volta infuse, le CAR T-cells di tisagenlecleucel si espandono da 1000 a 10.000 volte. Il picco di espansione si raggiunge entro 10-14 giorni e, nei pazienti che sviluppano la CRS, coincide con o segue l'esordio dei sintomi clinici della sindrome, che di norma si sviluppa da uno a 21 giorni dopo la prima infusione. È stato dimostrato che queste CAR T-cells migrano efficacemente nel midollo osseo e sono state trovate anche nel fluido cerebrospinale.

Per quanto riguarda la persistenza, sono stati riportati numeri diversi in trial differenti. Studi recenti hanno confermato la presenza di livelli misurabili di tisagenlecleucel fino a 780 giorni nei pazienti con leucemia linfoblastica acuta.

Il CAR di tisagenlecleucel

Il CAR di tisagenlecleucel è costituito da una proteina chimerica formata da tre parti principali, con una porzione extracellulare e una intracellulare (figura 1). La parte extracellulare è costituita da un frammento di anticorpo murino a catena singola (scFv) che riconosce l'antigene CD19 (FMC63) ed è collegata alla parte intracellulare, formata dal dominio co-stimolatorio 4-1BB (CD137) e dal dominio di segnalazione CD3 zeta. I due domini intracellulari svolgono un ruolo essenziale nel funzionamento di tisagenlecleucel: CD3 zeta è fondamentale per iniziare l'attivazione delle cellule T e per l'attività antitumorale, mentre 4-1BB aumenta l'espansione e la persistenza delle CAR T-cells infuse nel corpo del paziente.

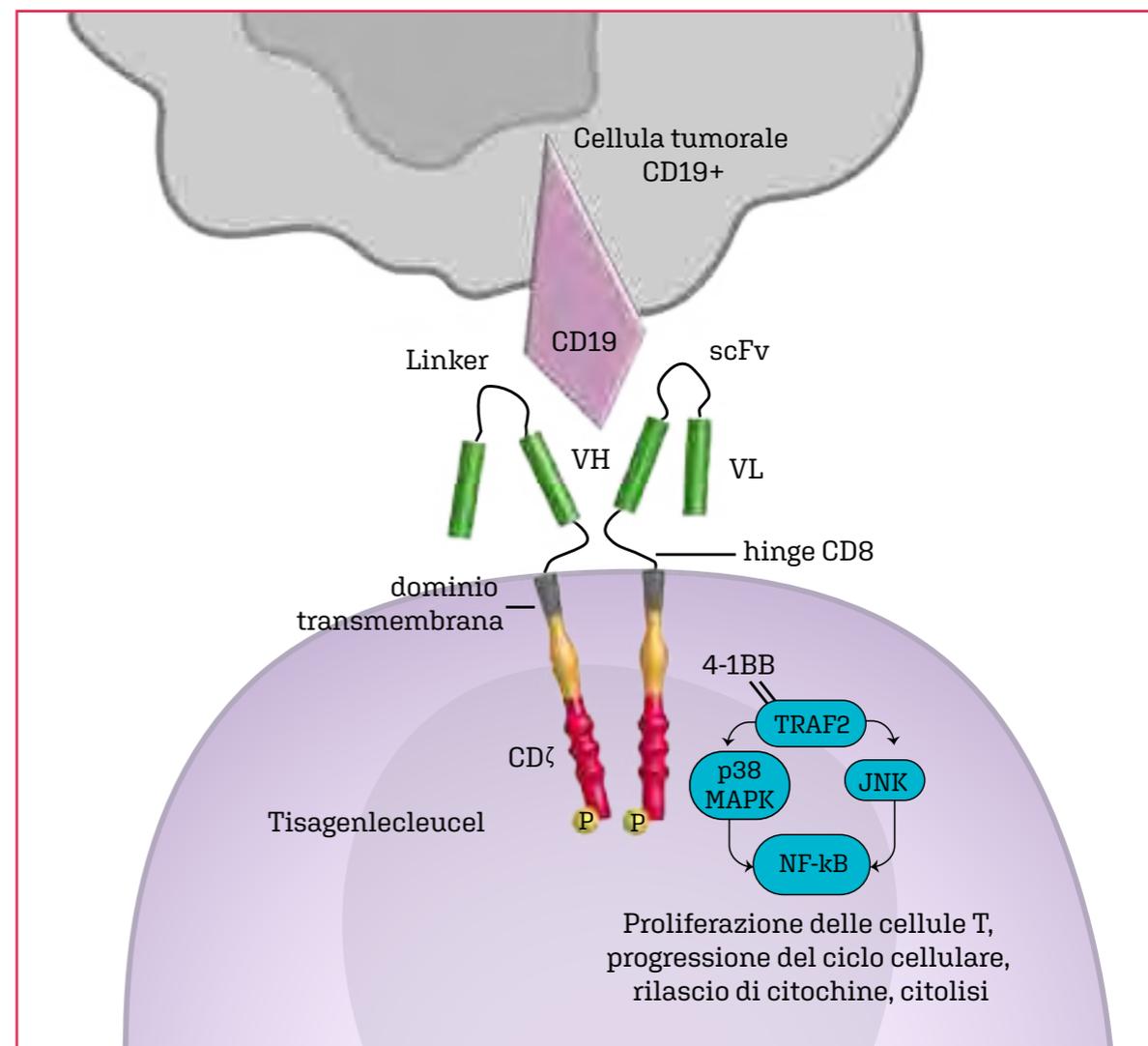


Figura 1. Struttura e meccanismo d'azione di tisagenlecleucel.

Indicazioni attualmente approvate

Tisagenlecleucel è attualmente indicato negli Usa e nell'Unione europea, ma anche in Canada e Australia, per il trattamento di due tumori ematologici – leucemia linfoblastica acuta a cellule B e linfoma diffuso a grandi cellule B – ed è stato il primo trattamento in assoluto a base di CAR T-cells a ricevere l'approvazione di un'agenzia regolatoria, oltre ad essere l'unico ad oggi autorizzato per due indicazioni distinte (figura 2).

Il prodotto è ora disponibile anche per i pazienti italiani. Infatti, il 7 agosto scorso l'Aifa ha diffuso un comunicato nel quale si afferma che 'con l'approvazione da parte del Consiglio di

amministrazione..., si è concluso l'iter procedurale per garantire l'accesso a queste nuove terapie salvavita ad esito di una negoziazione contrassegnata da uno spirito di responsabile collaborazione con l'azienda. L'approvazione avviene attraverso un nuovo modello di rimborso, il pagamento al risultato (*payment at results*), utilizzato da Aifa per la prima volta'.

Tisagenlecleucel è stato il primo prodotto a base di CAR T-cells approvato dall'Aifa e reso disponibile per i pazienti italiani secondo le indicazioni approvate.

L'accordo siglato raccoglie la sfida posta dall'avvento delle terapie avanzate nel contesto terapeutico italiano e prevede il ricorso a un sistema innovativo di rimborso basato sui risultati terapeutici della terapia nel tempo. Questa modalità potrà garantire l'accesso ai pazienti idonei alla terapia, preservando l'obiettivo comune della sostenibilità di sistema.

L'intesa con l'Aifa prevede, inoltre, che le Regioni identifichino i centri ematologici autorizzati a erogare il trattamento, centri che saranno opportunamente qualificati sulle procedure ne-

cessarie a somministrare tisagenlecleucel a cura di Novartis, in linea con le richieste dell'Ema.

Per quanto riguarda l'Unione europea, oltre all'Italia, al momento questa terapia è accessibile, in quanto soggetta a precisi accordi tra Stato e azienda, in Germania, nel Regno Unito, in Francia, in Spagna e in Norvegia.

Leucemia linfoblastica acuta

Nell'agosto 2017, l'Fda, con oltre un mese di anticipo rispetto ai tempi canonici, ne ha autorizzato l'immissione in commercio per il trattamento di pazienti pediatrici e giovani adulti (fino a 25 anni) con leucemia linfoblastica acuta a cellule B refrattari o in seconda o ulteriore recidiva.

Un anno dopo (fine agosto 2018), è arrivata anche l'approvazione dell'Ema per un'indicazione analoga: pazienti pediatrici e giovani fino a 25 anni con leucemia linfoblastica acuta a cellule B refrattari, in recidiva post-trapianto o in seconda o ulteriore recidiva.

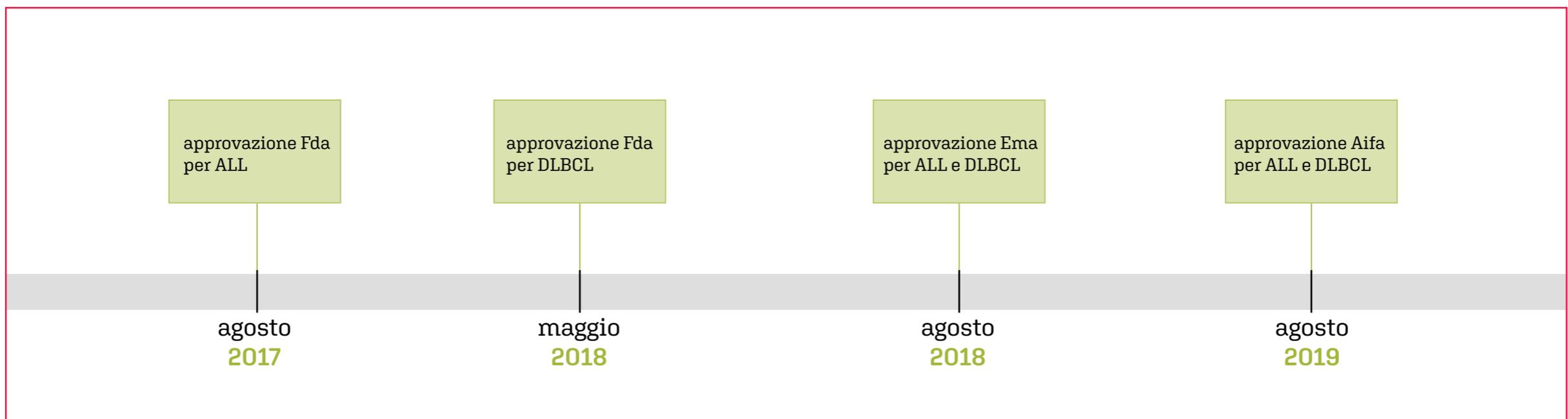


Figura 2. Timeline delle approvazioni di tisagenlecleucel da parte delle agenzie del farmaco statunitense, europea e italiana.
ALL: leucemia linfoblastica acuta; DLBCL: linfoma diffuso a grandi cellule B

Il 7 agosto 2019, l'Agenzia italiana del farmaco (Aifa) ha dato il suo via libera alla rimborsabilità di tisagenlecleucel da parte del Sistema sanitario nazionale (Ssn) per quest'indicazione approvata dall'EmA, presso centri specialistici selezionati dalle Regioni.

Linfoma diffuso a grandi cellule B

Nel maggio 2018, l'Fda ha autorizzato un ampliamento delle indicazioni di tisagenlecleucel, dandogli il suo via libera anche come trattamento per i pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma a cellule B di alto grado o linfoma diffuso a grandi cellule B derivante da un linfoma follicolare, già trattati con almeno due linee di terapia sistemica.

Poco dopo, nell'agosto 2018, il prodotto è stato autorizzato anche dall'EmA (con la procedura di revisione prioritaria dell'agenzia, PRIME, e in contemporanea con la sua approvazione per la leucemia linfoblastica acuta) per il trattamento dei pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B refrattario o recidivato dopo due o più linee di terapia sistemica.

Il 7 agosto 2019, l'Aifa ha autorizzato la rimborsabilità di tisagenlecleucel da parte dell'Ssn anche per questa seconda indicazione approvata dall'EmA.

I dati clinici

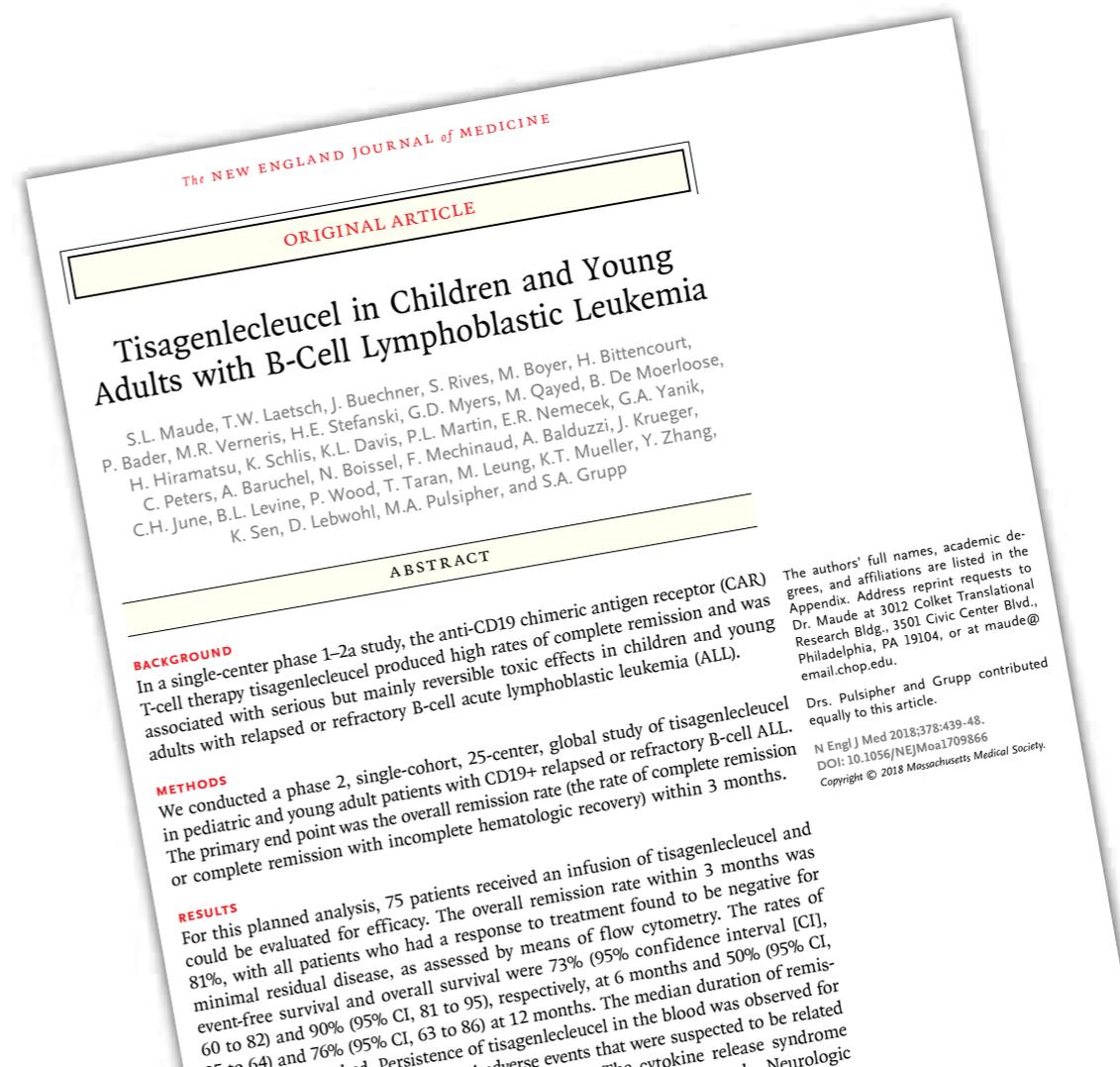
L'approvazione delle due indicazioni di tisagenlecleucel si deve principalmente ai risultati positivi di due studi multicentrici di fase 2 – lo studio **ELIANA** per la leucemia linfoblastica acuta e lo studio **JULIET** per il linfoma diffuso a grandi cellule B – entrambi pubblicati sul New England Journal of Medicine (Njrm), rispettivamente l'1 febbraio 2018 e nel dicembre 2018.

Leucemia linfoblastica acuta: lo studio ELIANA

Lo studio ELIANA (Determine Efficacy and Safety of CTL019

in Pediatric Patients With Relapsed and Refractory B-cell ALL; NCT02435849) è un trial multicentrico internazionale di fase 2, a singolo braccio, in aperto, nel quale si valutano efficacia e sicurezza di tisagenlecleucel in pazienti pediatrici o giovani adulti con leucemia linfoblastica acuta a cellule B recidivante o refrattaria (r/r). Lo studio è ancora in corso, anche se ha concluso l'arruolamento, e prevede un follow-up dei pazienti per 5 anni dal momento dell'infusione delle CAR T-cells.

Coordinato da Stephan A. Grupp, il professore del Children's Hospital of Philadelphia e della University of Pennsylvania che ha curato Emily Whitehead, la prima bambina al mondo trattata con questa terapia, lo studio ELIANA ha coinvolto 25 centri distribuiti fra Stati Uniti, Canada, Europa, Australia e Giappone, tra cui anche uno italiano, l'Azienda Ospedaliera



San Gerardo (ASST di Monza)/Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma.

I partecipanti sono bambini e ragazzi dai 3 ai 24 anni (età mediana al momento dell'arruolamento: 11 anni) che non hanno risposto fin dall'inizio alla chemioterapia o hanno avuto una recidiva dopo la terapia di prima linea o seconda linea e non possono più essere sottoposti al trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. Sono stati sottoposti in precedenza a una mediana di tre terapie (range: 1-8) e il 61% ha fatto in precedenza un trapianto di cellule staminali.

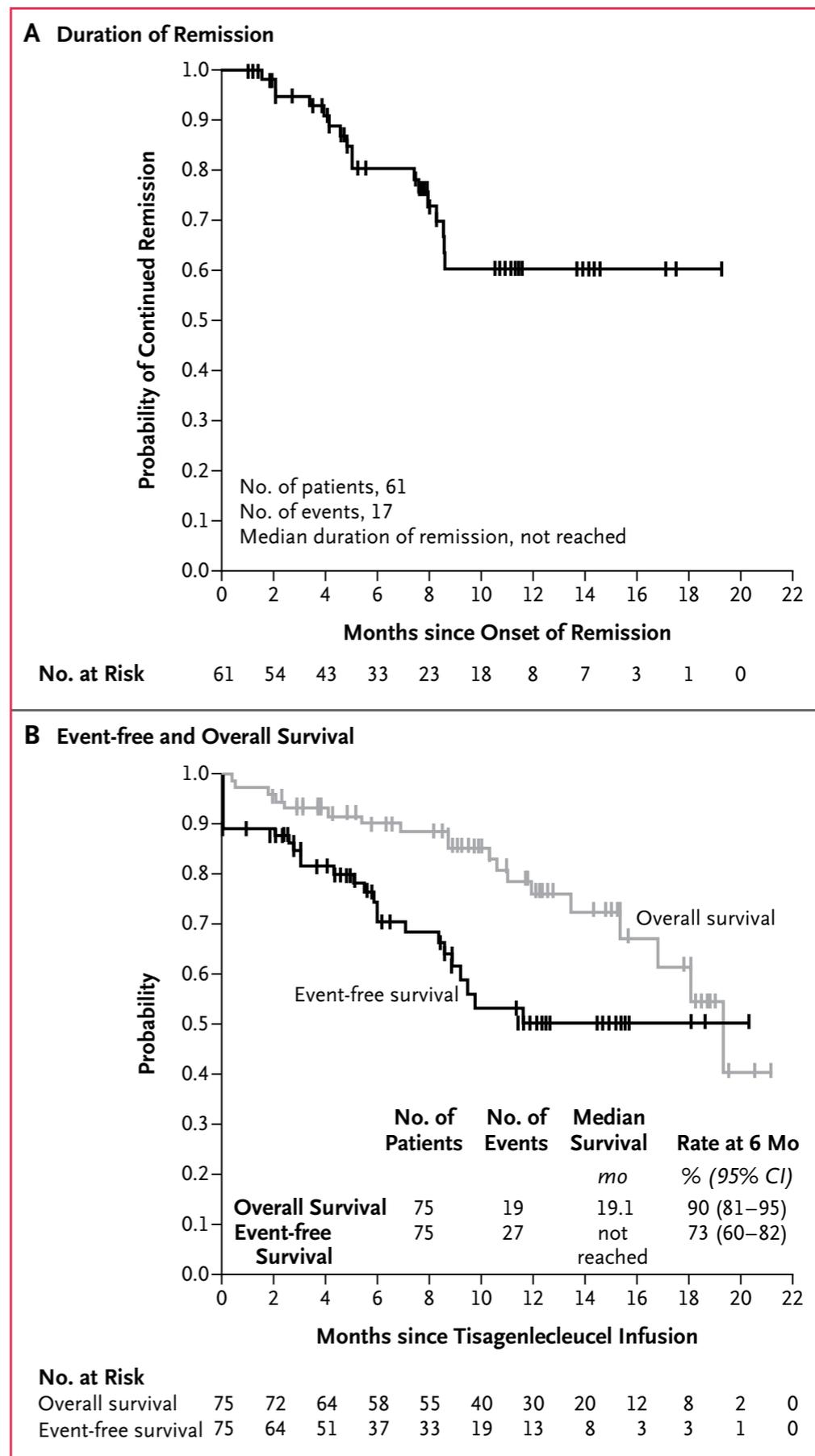
L'endpoint primario dello studio è il tasso di remissione complessiva (ORR, remissione completa più remissione completa con recupero ematologico incompleto) entro 3 mesi dall'infusione delle CAR T-cells e mantenuta per almeno 28 giorni, valutata in modo centralizzato da un comitato di revisori indipendenti. Fra gli endpoint secondari figurano la durata della remissione (DOR), la sopravvivenza libera da recidive (RFS), la sopravvivenza globale (OS), la sicurezza e la cinetica cellulare.

Dopo essere stati sottoposti a una linfo-deplezione mediante chemioterapia (con fludarabina e ciclofosfamide in tutti i casi, tranne uno) i pazienti sono stati sottoposti a una singola infusione di tisagenlecleucel, a una dose mediana pari a 3×10^6 cellule T CAR-positive vitali/kg.

I dati riportati nell'articolo pubblicato nel febbraio 2018 sul *Nejm* si riferiscono a 75 pazienti per i quali erano disponibili almeno 3 mesi di follow-up, seguiti per una mediana di 13,1 mesi (dati a un anno).

I risultati principali di quest'analisi, per quanto riguarda l'efficacia del trattamento (**figura 3**) sono i seguenti:

Figura 3. Durata della remissione, sopravvivenza libera da eventi e sopravvivenza globale dei pazienti trattati con tisagenlecleucel nello studio ELIANA. Dati a un anno pubblicati sul *New England Journal of Medicine*.



- l'ORR è risultato dell'81%; lo studio ha quindi raggiunto il suo endpoint primario;
- la RFS a 6 mesi è risultata del 73% e quella a 12 mesi del 66%;
- l'OS a 6 mesi è risultata del 90% e quella a 12 mesi del 76%;
- la mediana della DOR non è stata raggiunta;
- si è osservata una persistenza di tisagenlecleucel nel sangue dei pazienti per un periodo lungo fino a 20 mesi.

I risultati principali inerenti alla **sicurezza** sono, invece, i seguenti:

- il 73% dei pazienti ha manifestato effetti avversi di grado 3 o 4 sospettati di essere correlati al trattamento con tisagenlecleucel;
- il 77% ha sviluppato una CRS, trattata nel 48% dei casi con tocilizumab;
- il 40% ha presentato effetti neurologici, tutti trattati efficacemente con terapie di supporto;
- non si sono registrati casi di edema cerebrale né neurotossicità di grado 4.

Nel dicembre 2018, al 60° congresso dell'ASH, a San Diego, è stato presentato un importante aggiornamento di questo studio, con i dati a 2 anni (i più recenti ad oggi disponibili), relativi a un maggior numero di pazienti (79) e con ulteriori 11 mesi di follow-up mediano rispetto a quelli pubblicati sul *Nejm*.

La nuova analisi conferma il beneficio di una singola infusione di tisagenlecleucel nei pazienti con leucemia linfoblastica acuta r/r ed evidenzia che il trattamento mantiene la sua efficacia anche a lungo termine, mostrando risultati sostanzialmente simili a quelli osservati nell'analisi precedente, con un ORR addirittura superiore e una DOR mediana ancora non raggiunta.

Per quanto riguarda l'**efficacia**, i risultati principali dell'analisi presentata a San Diego sono i seguenti (**figura 4**):

- l'ORR è risultato dell'82% (con un 62% di remissioni complete);
- tra i pazienti che hanno raggiunto la remissione, tutti tranne

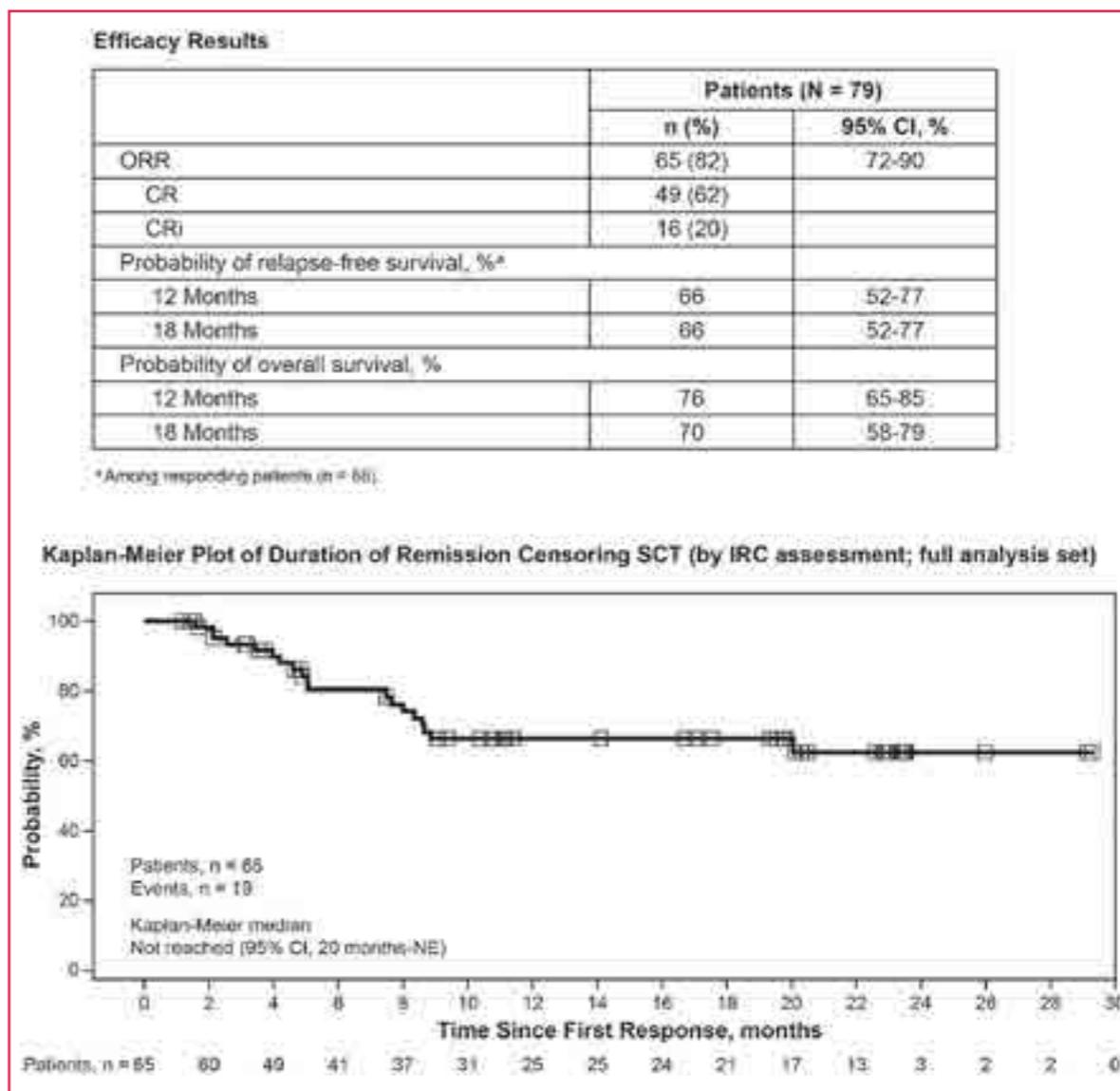


Figura 4. Risultati di efficacia del trattamento con tisagenlecleucel nello studio ELIANA presentati al congresso ASH 2018; dati a 2 anni.

uno (il 98%) hanno raggiunto la non rilevabilità della MRD nel midollo osseo;

- la RFS a 18 mesi è risultata del 66% (invariata rispetto al dato a 12 mesi) e quella a 24 mesi del 62%;
- l'OS a 18 mesi è risultata del 70% e quella a 24 mesi del 66%;
- la mediana della DOR non è ancora stata raggiunta, così come la mediana dell'OS;
- in alcuni dei pazienti che hanno risposto si è osservata una persistenza di tisagenlecleucel nel sangue per almeno 2,5 anni (accompagnata da un'aplasia delle cellule B).

Sul fronte della **sicurezza**, la nuova analisi conferma che la maggior parte degli eventi avversi si è verificata entro le prime 8 settimane di trattamento e non si sono osservate tossicità nuove. Inoltre:

- la CRS ha mostrato di nuovo un'incidenza del 77% (di grado 3/4 del 48%) e in tutti i casi si è dimostrata reversibile;
- l'incidenza degli eventi neurologici di qualsiasi grado è risultata del 39% (di grado 3 del 13%);
- non si sono registrati casi di edema cerebrale né eventi neurologici di grado 4;
- l'incidenza delle infezioni è risultata bassa.

Linfoma diffuso a grandi cellule B: lo studio JULIET

Lo studio JULIET (Study of Efficacy and Safety of CTL019 in Adult DLBCL Patients; NCT02445248) è un trial multicentrico internazionale, a singolo braccio, in aperto, nel quale si valutano efficacia e sicurezza di tisagenlecleucel in pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B r/r. Lo studio è ancora in corso, anche se ha concluso l'arruolamento, e prevede un follow-up dei pazienti per 5 anni dal momento dell'infusione delle CAR T-cells.

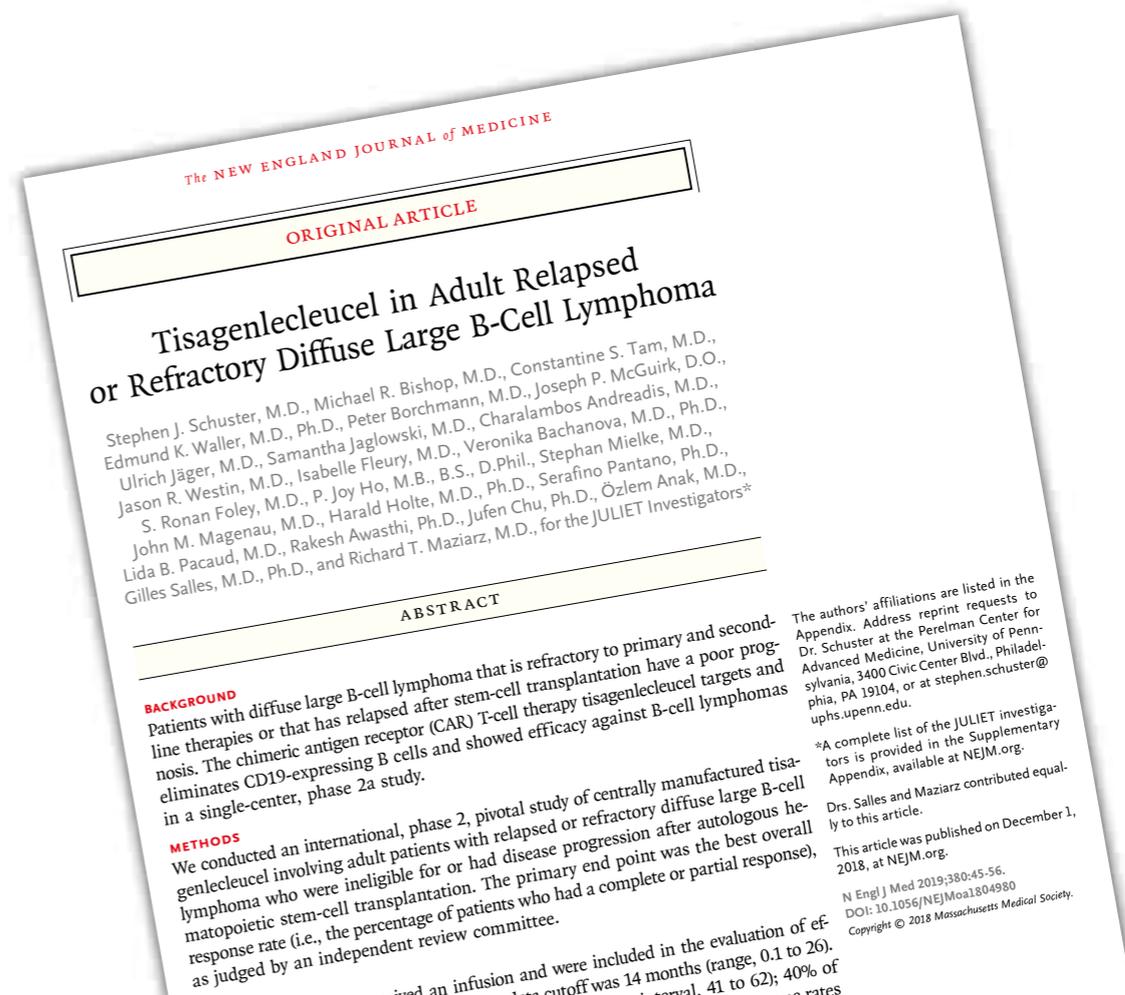
Si tratta del primo studio registrativo di Novartis su tisagenlecleucel per il linfoma diffuso a grandi cellule B e del secondo studio registrativo su tisagenlecleucel dopo lo studio ELIANA. È coordinato dal professor Stephen J. Schuster, dell'Abramson Cancer Center della University of Pennsylvania, e ha coinvolto in tutto 28 centri di 10 Paesi, distribuiti fra Stati Uniti, Canada, Europa, Australia e Giappone, tra cui anche un centro italiano, la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano.

I partecipanti sono soggetti di almeno 18 anni (età mediana; 56 anni; il 23% con almeno 65 anni) già trattati con almeno due linee di trattamento (comprendente rituximab e un'antracicli-

na), non candidabili al trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche o sottoposti al trapianto, ma senza successo.

L'endpoint primario dello studio è il tasso di risposta complessiva (ORR, risposta completa più risposta parziale), valutata in modo centralizzato da un comitato di revisori indipendenti. Fra gli endpoint secondari figurano la durata della risposta (DOR), la sopravvivenza libera da recidive (RFS), la sopravvivenza libera da progressione (PFS), la sopravvivenza globale (OS), la sicurezza e la cinetica cellulare.

Dopo essere stati sottoposti, se necessario, a linfodeplezione con fludarabina e ciclofosfamida o bendamustina e a una chemioterapia ponte (se necessario), i pazienti sono stati trattati con una singola infusione di tisagenlecleucel, a una dose mediana pari a 3×10^8 cellule T vitali e CAR-positive.



I dati più recenti disponibili dello studio JULIET sono quelli presentati nel dicembre 2018 al 60° congresso dell'ASH, a San Diego, e pubblicati contestualmente sul *Nejm*. Al meeting americano gli autori hanno presentato un'analisi aggiornata dello studio con un follow-up mediano di 19 mesi, 5 mesi in più rispetto alla comunicazione precedente (avvenuta al congresso della European Society of Hematology, EHA, a Stoccolma).

Al 21 maggio 2018 (momento dell'ultimo cut off dei dati), c'erano 167 pazienti arruolati nello studio, di cui 115 sottoposti a una singola infusione di tisagenlecleucel (99 nella coorte principale, trattata con le cellule prodotte negli Stati Uniti, e 16 nella coorte A, trattata con le cellule prodotte in Germania).

I dati dimostrano che nei soggetti studiati, tutti altamente pretrattati, il trattamento con tisagenlecleucel ha permesso di ottenere percentuali di risposta elevate e risposte durature, con risultati coerenti in tutti i sottogruppi definiti dal protocollo, compreso quello dei pazienti più anziani, e indipendenti dal tipo di chemioterapia linfodepletante ricevuta.

I risultati principali dell'analisi per quanto riguarda l'**efficacia** del trattamento (figura 5) sono i seguenti:

- l'ORR è risultato dell'54%, sostanzialmente stabile rispetto a quello registrato un anno prima (53,1%) e presentato all'edizione 2017 del congresso ASH;
- il tasso di risposta completa è risultato del 40% e quello di risposta parziale del 13% (da notare che il 54% di coloro che inizialmente avevano risposto parzialmente hanno poi risposto in modo completo al trattamento, a suggerire che le CAR T-cells infuse restano vitali e attive nel tempo)
- la mediana della DOR non è ancora stata raggiunta; ma la DOR è apparsa simile nei pazienti con più di 65 anni e in quelli più giovani, nonché nei pazienti refrattari rispetto a quelli ricaduti;

- l'RFS, che era del 66% a 6 mesi dall'infusione, è rimasta sostanzialmente stabile a 12 mesi e a 18 mesi: 64%; dopo 11 mesi dall'infusione non si sono osservate più ricadute;
- l'OS mediana in tutti i pazienti infusi è risultata di 11,1 mesi, ma non è ancora stata raggiunta per coloro che hanno ottenuto una risposta completa al trattamento;
- l'OS a 12 mesi è risultata del 48% e quella a 18 mesi del 43%;
- Le analisi dei dati di ORR, DOR e OS hanno evidenziato risultati coerenti in tutti i sottogruppi di pazienti, a prescindere dallo stato recidivante/refrattario, dall'età e dalla presenza o meno di un profilo citogenetico associato a un alto rischio.

I risultati principali inerenti alla **sicurezza** sono, invece, i seguenti:

- il profilo di sicurezza e tollerabilità mostrato da quest'ultima analisi è risultato coerente con quello emerso nelle analisi precedenti;
- il 57% dei pazienti ha sviluppato una CRS di qualsiasi grado (trattata nel 16% dei casi con tocilizumab), il 14% una CRS di grado 3 e il 9% una CRS di grado 4;
- l'incidenza degli eventi neurologici di qualsiasi grado è stata del 20% (di grado 3 o 4 dell'11%), con un caso di edema cerebrale di grado 2;
- altri eventi avversi di grado 3 o 4 di particolare interesse comparsi entro 8 settimane dall'infusione sono stati le citopenie protrattesi per più di 28 giorni (34%), le infezioni (19%), la neutropenia febbrile (15%) e la sindrome da lisi tumorale (2%);
- tutte le complicanze si sono risolte da sole o con trattamenti;
- tre pazienti sono deceduti entro 30 giorni dall'infusione (tutti a causa della progressione della malattia), ma non sono stati segnalati nuovi decessi né decessi correlati al trattamento.

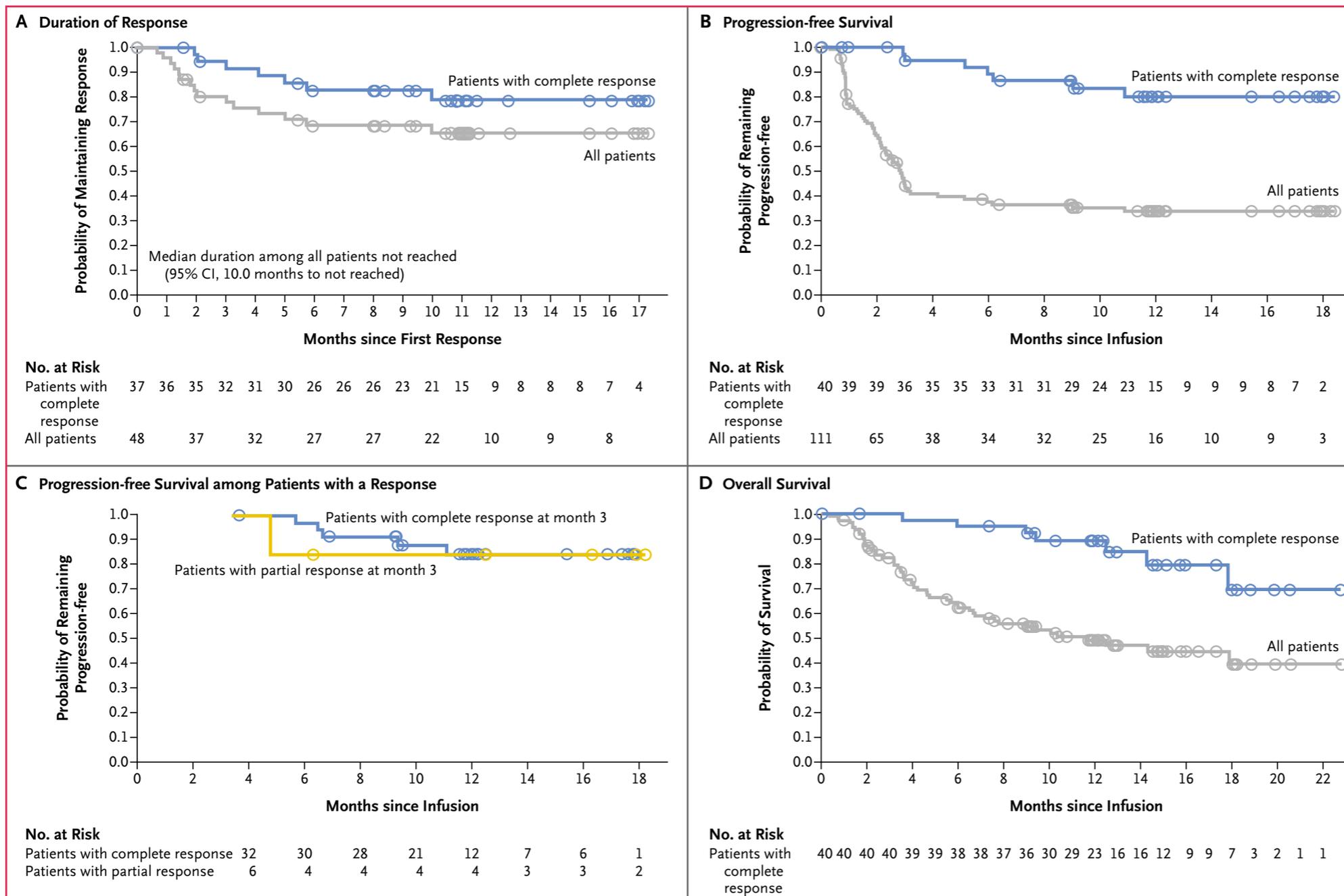


Figura 5. Durata della risposta, sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale dei pazienti trattati con tisagenlecleucel nello studio JULIET. Dati pubblicati sul New England Journal of Medicine.

Per esempio, è attualmente attivo uno studio multicentrico di fase 2 su pazienti pediatrici e giovani con leucemia linfoblastica acuta a cellule B r/r, di cui è in corso l'arruolamento; il trial è sponsorizzato da Novartis e coinvolge diversi centri di Canada ed Europa [NCT03123939]. Presso il CHOP di Philadelphia è attivo uno studio di fase 1 nel quale si sta utilizzando una versione umanizzata del prodotto [huCTL019] in pazienti pediatrici e giovani adulti con leucemia linfoblastica acuta o linfoma diffuso a grandi cellule B CD19-positivi [NCT02374333].

Ulteriori sviluppi

Lo sviluppo di tisagenlecleucel, naturalmente, non si ferma con gli studi ELIANA e JULIET. Sono in corso, infatti, svariati altri trial nei quali si sta testando quest'immunoterapia cellulare sia nelle neoplasie per le quali è già approvata sia in altre neoplasie, da sola o anche in combinazione con altri trattamenti.

Inoltre, uno studio di fase 2 sta arruolando pazienti con leucemia linfoblastica acuta MRD-positiva che saranno trattati con le CAR-T-cells come terapia iniziale [NCT02935543].

Sono in corso anche studi nei quali si sta valutando tisagenlecleucel in pazienti con leucemia linfatica cronica,

mieloma multiplo, linfoma follicolare e altri tipi di linfoma non-Hodgkin.

In tutti i trial sopra menzionati, le CAR T-cells vengono utilizzate come unica modalità di trattamento. Al congresso ASH 2018, invece, è stato presentato uno studio preliminare, ma molto interessante, nel quale si è aggiunta a tisagenlecleucel un'immunoterapia non cellulare, cioè un inibitore del checkpoint immunitario PD-1 (pembrolizumab o nivolumab), in pazienti con leucemia linfoblastica acuta ricaduti. In particolare, i ricercatori hanno trattato con l'anti-PD-1 pazienti che avevano mostrato una ripetuta e precoce perdita delle CAR T-cells oppure non avevano risposto o avevano risposto in modo parziale a questo trattamento, somministrando l'inibitore dei checkpoint non prima di 14 giorni dall'infusione delle cellule e dopo la risoluzione dei sintomi dell'eventuale CRS. I primi dati sono incoraggianti, in quanto lasciano intravedere la possibilità di associare le due forme di immunoterapia come strategia per aumentare la funzione e la persistenza delle CAR T-cells, e quindi migliorare gli outcome dei pazienti con leucemia linfoblastica acuta.

Ad alcuni di questi studi parteciperanno anche 10 centri ospedalieri italiani situati a Torino, Monza, Milano, Bologna e Roma.

Attualmente il centro di Monza (l'Azienda Ospedaliera San Gerardo di Monza/Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma) sta partecipando a uno studio multicentrico di fase 3b (CCTL019B2001X; NCT03123939) su pazienti pediatri-

ci/giovani adulti con leucemia linfoblastica acuta in recidiva/refrattaria trattati con tisagenlecleucel e ha arruolato ad oggi 9 pazienti.

Inoltre, l'Ospedale San Raffaele è coinvolto in uno studio multicentrico su pazienti con linfoma follicolare recidivato/refrattario (ELARA; CCTLO19E2202; NCT03568461) e ha annunciato nell'ottobre scorso di avere trattato il primo paziente.

Bibliografia

- [1] S. Vairy, et al. CTL019 (tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Drug Design, Development and Therapy* 2018;12:3885-98.
- [2] Kymriah – Riassunto delle caratteristiche del prodotto. https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_it.pdf (ultimo accesso: 11-2019)
- [3] S.L. Maude, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-48.
- [4] S.A. Grupp, et al. Updated Analysis of the Efficacy and Safety of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients with Relapsed/Refractory (r/r) Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* (2018) 132 (Supplement 1): 895. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-112599>
- [5] S.J. Schuster, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2019;380:45-56.
- [6] A.M. Li, et al. Checkpoint inhibitors augment CD19-directed chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy in relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (2018) 132 (Supplement 1): 556. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-112572>

Intervista a Gianluca Fincato

Direttore medico di Novartis Oncology Italia

Come sta procedendo lo sviluppo clinico di tisagenlecleucel in Europa e in Italia?

Ad oggi i centri italiani che hanno partecipato a sperimentazioni cliniche con tisagenlecleucel sono la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, l'Azienda Ospedaliera San Gerardo di Monza/Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma (MB) e l'Ospedale San Raffaele di Milano. Nell'ultimo mese è iniziato il coinvolgimento nella sperimentazione clinica anche dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma e dell'Ospedale Regina Margherita di Torino (Azienda Ospedaliero-Universitaria-Città della Salute e della Scienza). Sono pianificati ulteriori studi clinici, sia in ambito pediatrico sia per i pazienti adulti affetti da linfoma, che coinvolgeranno 10 centri ospedalieri italiani nelle seguenti città: Torino, Monza, Milano, Bologna, Roma. Novartis è impegnata a proseguire il programma di sperimentazioni cliniche internazionali con studi di fase 1, fase 2 e fase 3 in pazienti pediatrici, giovani e adulti, affetti da leucemia linfoblastica acuta e linfoma diffuso a grandi cellule B, ma anche da leucemia linfatica cronica, mieloma multiplo, linfoma follicolare e altri tipi di linfoma non-Hodgkin.

Qual è la tecnologia utilizzata per produrre tisagenlecleucel e quali sono le sue caratteristiche e i suoi vantaggi?

Tisagenlecleucel è un'immunoterapia cellulare, che si basa sulla tecnologia CAR-T, una tecnologia complessa che permette di riprogrammare i linfociti T del paziente stesso in modo



che possano combattere il tumore. Le terapie basate su CAR-T-cells sono diverse dalle tipiche terapie con farmaci biologici o piccole molecole, perché vengono prodotte per ogni singolo paziente utilizzando le sue stesse cellule. Le cellule T vengono prelevate dal sangue del paziente e riprogrammate in laboratorio, al fine di creare cellule T geneticamente modificate allo scopo di riconoscere e combattere le cellule tumorali e altre cellule B che esprimono uno specifico antigene. Tisagenlecleucel è la prima immunoterapia cellulare con CAR T-cells ad aver ricevuto l'approvazione per due distinte indicazioni sia negli Stati Uniti sia in Europa, oltre che in Canada e Australia: pazienti pediatrici e giovani adulti con leucemia linfoblastica

acuta e pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B. Tisagenlecleucel è anche l'unica terapia a base di CAR T-cells nel cui processo di produzione, nel corso degli studi clinici, si è utilizzata la crioconservazione sia al momento della leucaferesi – quando il sangue di un paziente viene prelevato per estrarne le cellule T – sia una volta pronte le CAR T-cells, per conservarle: questo fornisce ai medici e ai centri la flessibilità di decidere quando effettuare la leucaferesi e quando infondere tisagenlecleucel in base alle condizioni individuali del paziente, contribuendo a soddisfare differenti esigenze geografiche e permettendo così una fornitura a livello globale.

Quali sono le prime reazioni all'impiego del farmaco da parte della comunità scientifica?

La comunità scientifica sta dimostrando molto interesse per le terapie a base di CAR T-cells, sia per la loro innovatività sia, soprattutto, perché rappresentano una risposta a forti bisogni clinici insoddisfatti, per alcune categorie di pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta e linfoma diffuso a grandi cellule B, quelli ricaduti nonostante svariati trattamenti precedenti o risultati refrattari a tali trattamenti; pazienti che non avevano più altre opzioni a disposizione.

Come si è conclusa la negoziazione sul prezzo e sulle condizioni di rimborso con l'Aifa?

Il 7 agosto scorso Novartis e l'Aifa hanno raggiunto un accordo per dare il via all'accesso a tisagenlecleucel su tutto il territorio italiano. Tisagenlecleucel è stato il primo prodotto a base di CAR T-cells ad essere approvato dall'Aifa e quindi accessibile ai pazienti italiani secondo le indicazioni approvate. Si tratta di un traguardo importante per Novartis nella propria missione di reinterpretare in modo nuovo la medicina. L'accordo siglato raccoglie infatti la sfida posta dall'avvento delle terapie avanzate nel contesto terapeutico italiano e prevede il ricorso a un innovativo sistema di rimborso basato sui risultati terapeutici

della terapia nel tempo. Questa modalità potrà garantire l'accesso ai pazienti candidabili alla terapia preservando l'obiettivo comune della sostenibilità del sistema.

Avete qui in Italia un'unità dedicata alle CAR T-cells? Se sì, come è organizzata?

Novartis si è strutturata con un'unità dedicata che conta diverse professionalità, tutte con alta specializzazione, per lavorare in collaborazione con i centri affinché questi siano in grado di gestire una terapia così innovativa. Con questo intendo: supporto di tipo medico-scientifico, tecnico per l'aferesi e logistico/amministrativo. L'unità ha l'obiettivo operare con i centri ospedalieri per garantire la sicurezza ed efficacia della terapia.

Dove verranno prodotte le CAR T-cells destinate ai pazienti italiani?

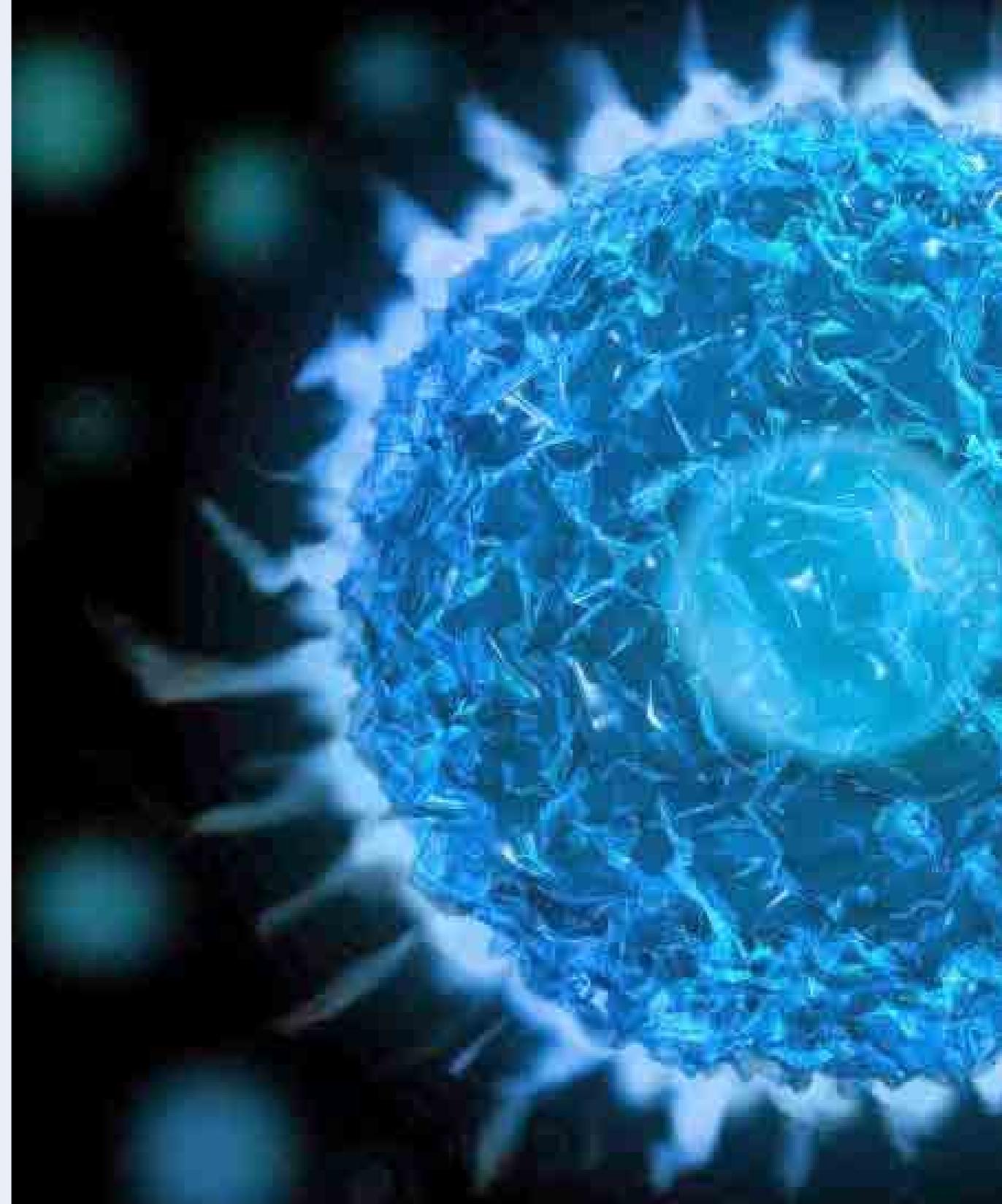
Novartis ha acquistato un sito di produzione per le terapie cellulari a Morris Plains, nel New Jersey, che è stato il primo sito a ricevere l'autorizzazione dell'FDA per la produzione di questa immunoterapia cellulare negli Stati Uniti. A Morris Plains sono state finora prodotte le cellule necessarie per tutti i pazienti che hanno partecipato ai trial di Novartis in tutto il mondo e per i pazienti trattati negli USA e nei Paesi europei nei quali il trattamento è stato già approvato. Inoltre Novartis ha perseguito diverse opzioni per espandere la sua capacità produttiva oltre a quella della struttura di Morris Plains. Queste comprendono il nostro accordo con CELLforCURE, con sede in Francia, una delle prime e più importanti CDMO che producono terapie cellulari e geniche in Europa e la partnership allargata con il Fraunhofer Institute, che attualmente supporta la produzione di tisagenlecleucel per le sperimentazioni cliniche globali e per la produzione post-approvazione. Infine, la produzione commerciale delle nostre CAR T-cells presso lo stabilimento di Stein, in Svizzera, dovrebbe iniziare nel 2020, in seguito alle diverse fasi necessarie per rendere operativo un nuovo impianto di produzione.

Ci sono spazi di miglioramento della tecnologia produttiva?

A differenza delle piccole molecole o dei prodotti biologici, le terapie con CAR T-cells autologhe richiedono un cambiamento di paradigma anche dal punto di vista della produzione e della logistica, per poter assicurare la consegna delle terapie ai pazienti nei tempi opportuni. Novartis è impegnata nel garantire standard elevati di qualità di produzione e nell'efficienza della logistica. La tecnologia con cui si producono queste cellule, tuttavia, è in evoluzione: Novartis si sta impegnando fortemente per migliorare il processo produttivo, soprattutto abbreviandone ancora di più la durata, al fine di raggiungere più velocemente i pazienti.

Quali sono le possibili evoluzioni future di questa terapia?

Novartis è impegnata a proseguire il programma di sperimentazioni cliniche internazionali con studi di fase 1, 2 e 3 in pazienti pediatrici, giovani e adulti, affetti da leucemia linfoblastica acuta e linfoma diffuso a grandi cellule B, leucemia linfatica cronica, mieloma multiplo, linfoma follicolare e altri tipi di linfoma non-Hodgkin. Al momento non vi sono sperimentazioni in corso sui tumori solidi, tuttavia non escludiamo in un futuro prossimo di poter allargare il nostro campo di indagine anche a queste neoplasie.



Axicabtagene ciloleucel (axi-cel), le CAR T-cells anti-CD19 di Gilead

Axicabtagene ciloleucel (axi-cel, noto inizialmente con la sigla KTE-C19) è l'altra immunoterapia cellulare a base di CAR T-cells (insieme con tisagenlecleucel) attualmente approvata dalle agenzie regolatorie statunitense ed europea, Fda ed Ema.

La prima versione del prodotto è stata messa a punto inizialmente da James Kochenderfer e Steven A. Rosenberg presso il Surgery Branch del National Cancer Institute (NCI) di Bethesda, dove sono stati fatti gli studi preclinici e i primi test clinici. Successivamente, nell'ottobre 2012, l'NCI ha siglato un accordo di collaborazione con Kite Pharma, per migliorare e sviluppare ulteriormente queste CAR T-cells. Nell'agosto 2017 Kite è stata poi acquisita da Gilead, che attualmente commercializza il prodotto con il marchio Yescarta.

Che cos'è axi-cel

Axi-cel è un'immunoterapia cellulare a base di CAR T-cells di seconda generazione aventi come bersaglio l'antigene CD19 e attualmente approvata per i pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B e linfoma primitivo del mediastino a cellule B recidivati o refrattari.

Così come tisagenlecleucel, il prodotto è costituito da cellule T autologhe prelevate dal paziente, modificate geneticamente in laboratorio in modo da renderle capaci di esprimere un CAR in grado di riconoscere l'antigene CD19, legarsi alle cellule che lo esprimono sulla loro superficie, e, di conseguenza, attivarsi ed eliminarle.

Il CAR di axi-cel

Il CAR espresso dalle cellule T modificate contenute in axi-cel è costituito da una proteina chimerica di circa 54 kDa formata da una parte extracellulare e una parte intracellulare. La parte extracellulare è costituita da un frammento variabile di un anticorpo murino a catena singola (scFv) in grado di legarsi specificamente all'antigene CD19 (FMC63), collegato a una regione cerniera e a una regione transmembrana, a sua volta collegata a una porzione intracellulare formata dal dominio co-stimolatorio CD28 e dal dominio di segnalazione CD3 zeta (**figura 1**).

Come si produce axi-cel

L'iter di produzione di axi-cel (**figura 2**) inizia con la raccolta delle cellule T del paziente presso il centro dove è in cura mediante leucaferesi con una strumentazione standard, processo che richiede circa 3-4 ore. Il materiale raccolto viene poi inviato a un impianto produttivo cen-

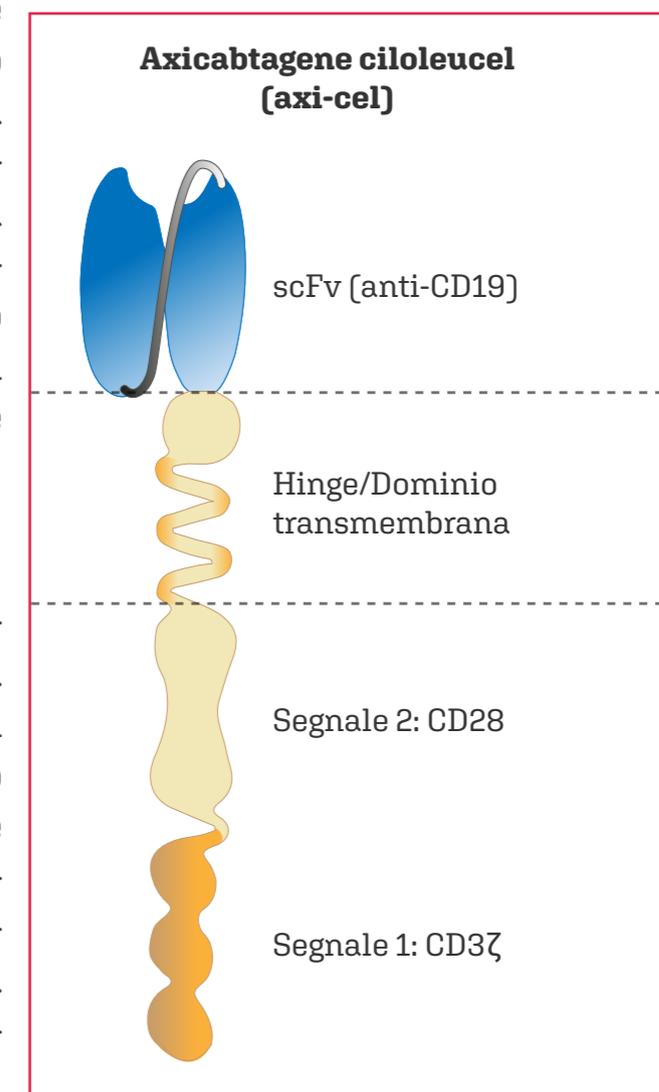


Figura 1. Struttura del CAR di axi-cel.

tralizzato attualmente situato in California, dove viene processato in modo da essere arricchito di cellule T in un sistema chiuso mediante separazione su gradiente di Ficoll. Le cellule T vengono quindi attivate usando un anticorpo monoclonale anti-CD3 e fatte crescere in un mezzo di coltura privo di siero (per minimizzare il rischio di contaminazione virale) contenente 300 IU/ml di IL-2, senza utilizzare biglie magnetiche per la selezione e l'attivazione. Una volta espanso e attivato, le cellule vengono trasportate utilizzando come vettore un retrovirus che veicola il gene contenente il CAR anti-CD19 e ulteriormente espanso per 4-6 giorni. Una volta raggiunta la dose target de-

siderata di CAR T-cells, il prodotto viene lavato, criopreservato e sottoposto a rigorosi controlli di qualità, per garantire che sia funzionale, sterile e privo di contaminanti. terminate queste verifiche, i lotti di prodotto vengono preparati e inviati nuovamente al centro dove saranno infusi nel paziente.

Attualmente, axi-cel viene preparato per tutto il mondo unicamente presso l'impianto produttivo di El Segundo, vicino a Los Angeles. Nel primo trimestre 2020, tuttavia, aprirà un nuovo sito in Olanda, ad Amsterdam, che garantirà la fornitura del prodotto per i Paesi europei. L'attuale iter produttivo ottimizzato

permette di ottenere CAR T-cells su larga scala mediante un processo chiuso e rapido della durata di 6-8 giorni, ma il tempo complessivo dall'aferesi alla consegna del prodotto nello studio registrativo ZUMA-1 è stato di 17 giorni.

Questo processo permette di raggiungere un'alta percentuale di successo nella produzione delle CAR T-cells, nonostante la variabilità interpaziente nella composizione del materiale ottenuto mediante l'aferesi e nelle conte linfocitarie di base, e perfino in presenza di linfopenia severa. Nello studio ZUMA-1 è stata riportata una percentuale di successo nella produzione delle CAR T-cells del 99%, con un prodotto finale contenente una popolazione di CAR T-cells formata in prevalenza (mediana 96%) da cellule T CD3+, con cellule T CD8+ (mediana 57%) e cellule T CD4+ (mediana 43%), e per la maggior

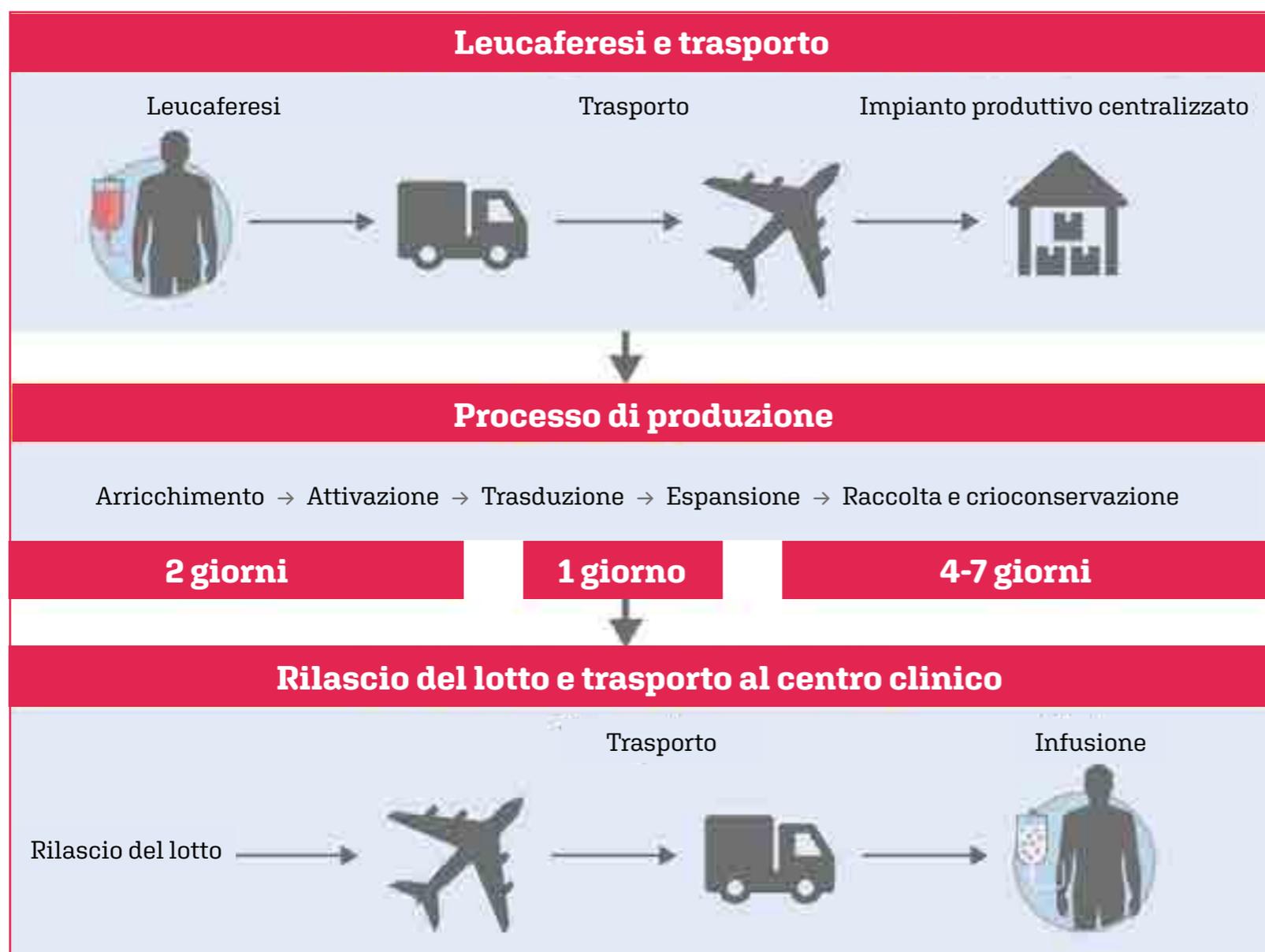


Figura 2. Schema del processo di produzione di axi-cel.

parte da cellule T della memoria effettrici (mediana 42%) e cellule T della memoria centrale (mediana 34%).

Una singola infusione di axi-cel contiene una sospensione di 2×10^6 cellule T vitali CAR-positivo/kg di peso corporeo (massimo 2×10^8 cellule T vitali CAR-positivo) in circa 68 ml. Una volta infuse nel paziente, le CAR T-cells di axi-cel vanno incontro a una rapida espansione, che raggiunge un picco entro 7-14 giorni dalla somministrazione. Nello studio registrativo ZUMA-1, le CAR T-cells erano ancora rilevabili dopo 180 giorni nella maggior parte dei pazienti.

L'area sotto la curva (AUC) mediana delle CAR T-cells, definita come il livello cumulativo di cellule T CAR-positivo/ μ l di sangue nei primi 28 giorni successivi alla somministrazione di axi-cel è risultata pari a 462,3 cellule/ μ l (range: 5,1-14,329,3). L'espansione delle CAR T-cells e il picco di concentrazione cellulare entro 28 giorni dall'infusione hanno mostrato una correlazione positiva con la risposta clinica obiettiva. Infatti, nello studio ZUMA-1 l'AUC delle CAR T-cells è risultata 5,4 volte più alta nei pazienti che hanno ottenuto una risposta obiettiva rispetto ai pazienti che non hanno risposto al trattamento e anche tra coloro che hanno mostrato un'AUC delle CAR T-cells superiore all'AUC mediana, l'ORR è risultato del 96%. Questi risultati sottolineano ulteriormente l'importanza dell'espansione post-infusione delle CAR T-cells, già osservata in studi precedenti. Il picco di espansione è risultato associato anche con eventi neurologici di grado 3 o superiore, ma non correlato con la CRS.

Inoltre, i dati a 2 anni dello studio ZUMA-1 e di un altro studio su axi-cel condotto dal gruppo di Kochenderfer presso l'NCI hanno evidenziato in genere una persistenza a lungo termine delle CAR T-cells nei pazienti che hanno risposto al trattamento.

Indicazioni attualmente approvate

Axi-cel è attualmente approvato sia negli Stati Uniti sia nell'Unione europea per il trattamento del linfoma diffuso a grandi cellule B e del linfoma primitivo del mediastino (negli Usa anche per altri tipi di linfoma non-Hodgkin) ricaduti/refrattari ed è stata la prima terapia a base di CAR T-cells in assoluto ad avere il via libera per questo tumore del sangue.

Nell'ottobre 2017, l'FDA lo ha approvato per il trattamento dei pazienti adulti con linfoma a grandi cellule B (tra cui linfoma diffuso a grandi cellule B non altrimenti specificato, linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B, linfoma a cellule B di alto grado e linfoma diffuso a grandi cellule B derivante da un linfoma follicolare) refrattario o recidivato dopo due o più linee di terapia sistemica.

A fine agosto del 2018 è arrivata anche l'autorizzazione dell'EMA (ottenuta attraverso l'iter di revisione prioritaria PRIME) per il trattamento di pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B o linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B, refrattario o recidivato dopo due o più linee di terapia sistemica. In Italia il prodotto è stato disponibile prima dell'approvazione dell'AIFA attraverso un programma di uso compassionevole, al quale hanno potuto accedere alcuni centri in possesso delle necessarie qualifiche. Nel novembre 2019, l'agenzia italiana ha dato il suo via libera alla rimborsabilità di axi-cel nel nostro Paese secondo le indicazioni autorizzate dall'EMA e questa terapia è quindi ormai formalmente disponibile anche per i pazienti italiani.

L'approvazione concessa ad axi-cel dalle agenzie regolatorie si deve ai risultati dello studio multicentrico di fase 1/2 ZUMA-1.

I dati clinici

I primi studi

Il caso del primo paziente ad aver ottenuto una risposta clinica trattato con cellule T riprogrammate in modo da produrre il CAR anti-CD19 poi utilizzato in axi-cel è stato pubblicato nel

2010 dal gruppo di James Kochenderfer. Si trattava di un soggetto con linfoma follicolare avanzato e progressivo, che coinvolgeva tutte le principali sedi linfonodali, ampiamente pretrattato; in seguito all'infusione delle CAR T-cells il paziente ha mostrato una notevole regressione del tumore, durata per 32 settimane.

Successivamente, sono stati effettuati altri tre piccoli studi monocentrici (uno su sette pazienti, fra cui il primo trattato, uno su 13 pazienti e l'altro su 22 pazienti) coordinati dall'NCI nei quali si sono via via affinati il processo di produzione delle CAR T-cells, il regime linfodepletante e, al fine di ridurre la tossicità, anche il dosaggio delle cellule infuse. In questi trial si è osservato un ORR compreso fra il 73 e il 92%, con un tasso di risposta completa compreso fra il 14 e il 62%.

Lo studio ZUMA-1

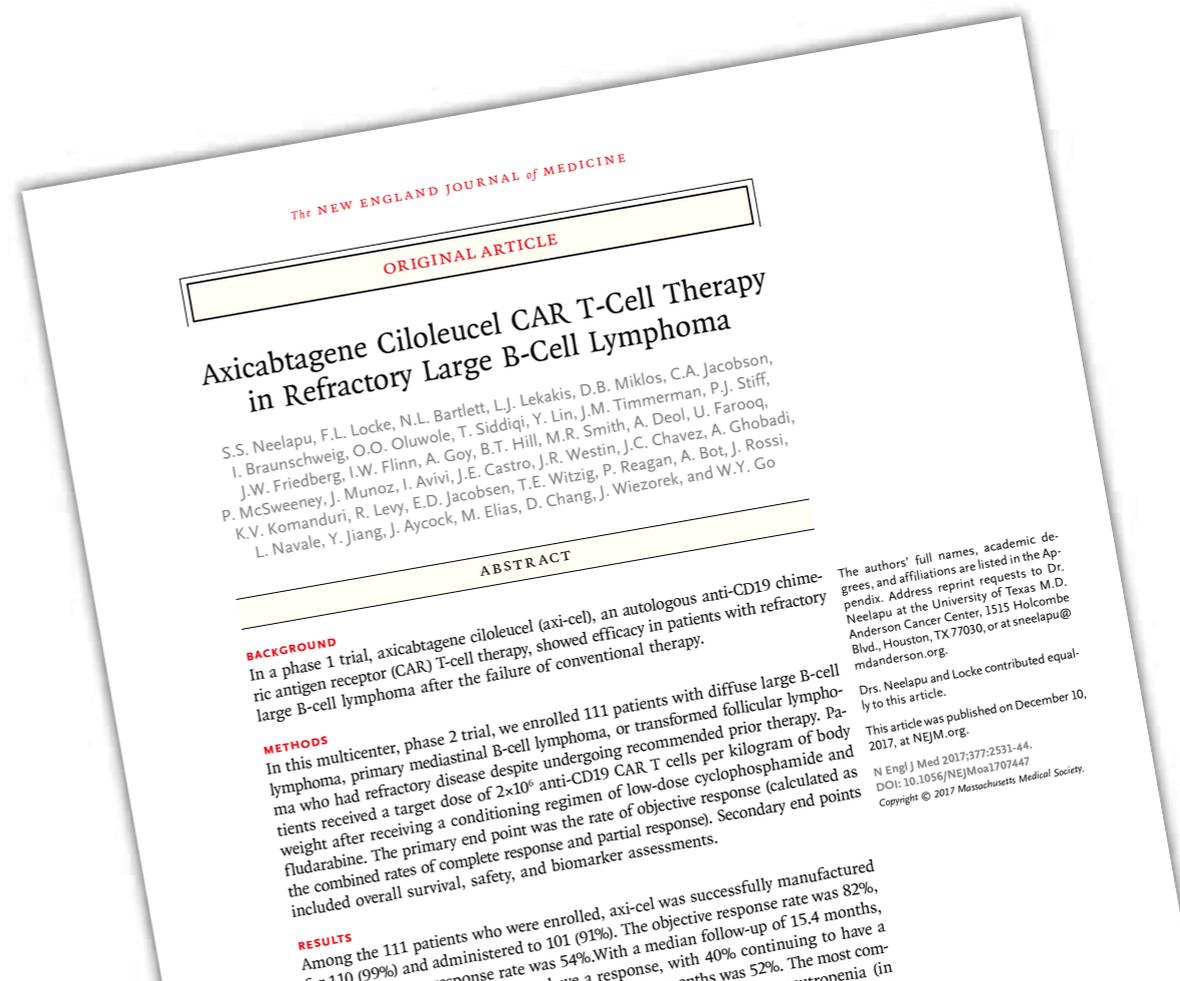
Axi-cel è stato testato per la prima volta in un trial multicentrico al di fuori dell'NCI nello studio registrativo **ZUMA-1** (Safety and Efficacy of KTE-C19 in Adults With Refractory Aggressive Non-Hodgkin Lymphoma; NCT02348216), che è anche il primo studio multicentrico mai eseguito su una terapia con CAR T-cells in pazienti con linfoma non-Hodgkin aggressivo.

Lo studio ZUMA-1 è un trial multicentrico internazionale di fase 1/2, a singolo braccio, in aperto, suddiviso in tre parti distinte: lo studio di fase 1, volto a valutare in primis la sicurezza di axi-cel; lo studio registrativo di fase 2 (coorti 1 e 2), volto a valutare l'efficacia di axi-cel; lo studio di fase 2 di gestione della sicurezza (coorti 3, 4 e 5), nel quale si valuterà l'impatto di regimi di profilassi o interventi precoci e debulking tumorale sull'incidenza e la gravità della CRS e della tossicità neurologica. Lo studio è ancora in corso e l'obiettivo è di arruolare 250 pazienti.

Coordinata da Sattva S. Neelapu, dello University of Texas MD Anderson Cancer Center di Houston, e Frederick L Locke, dell'H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute di Tampa, la parte registrativa dello studio ZUMA-1 ha coinvolto 22 centri situati negli Stati Uniti e in Israele.

I partecipanti sono adulti di età non inferiore a 18 anni con linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma primitivo del mediastino a cellule B o linfoma follicolare trasformato, con malattia refrattaria o ricaduta dopo un trapianto autologo di cellule staminali, già trattati in precedenza con un anticorpo anti-CD20 e con una chemioterapia contenente un'antraciclina.

Dopo essere stati sottoposti a linfodeplezione con ciclofosfamide 500 mg/m² e fludarabina 30 mg/m² per 3 giorni, i pazienti sono stati trattati con una singola infusione di axi-cel, con una dose target pari a 2 × 10⁶ CAR T-cells/kg.



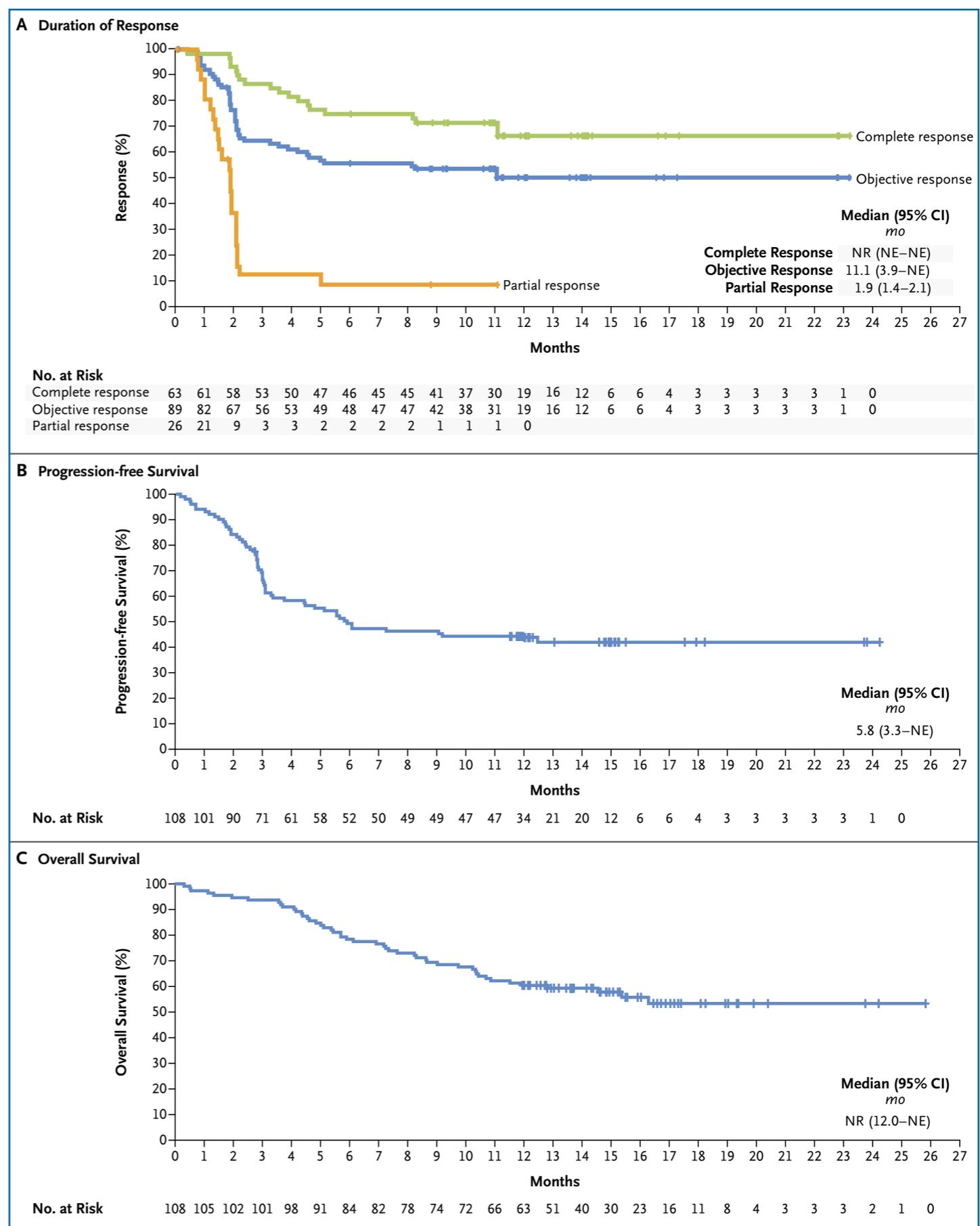
La porzione di fase 1 dello studio ha coinvolto 7 pazienti (tutti con linfoma diffuso a grandi cellule B) e ha mostrato il raggiungimento di risposte rapide e durature in seguito al trattamento con axi-cel. In questa fase dello studio, che ha dimostrato la sicurezza del trattamento, l'ORR è risultato del 71% e il 57% dei pazienti ha ottenuto una risposta completa, dati coerenti con quelli dei primi studi condotti presso l'NCI. Tutti coloro che hanno risposto lo hanno fatto entro un mese dall'infusione e in questo gruppo tre pazienti su quattro, al momento della pubblicazione dei dati, mostravano una risposta completa che durava da più di 12 mesi.

Questi risultati incoraggianti hanno portato alla realizzazione dello studio registrativo di fase 2, che ha coinvolto 101 pazienti, di cui 77 con linfoma diffuso a grandi cellule B e 24 con linfoma primitivo del mediastino a cellule B o linfoma follicolare trasformato. I partecipanti non avevano risposto all'ultimo trattamento o avevano avuto una ricaduta entro 12 mesi dal trapianto autologo, erano già stati trattati in precedenza con un anticorpo anti-CD20 e un'antraciclina, e avevano un performance status ECOG pari a 0 o 1.

L'endpoint primario dello studio era l'ORR nei pazienti con almeno 6 mesi di follow-up dopo l'infusione di axi-cel, mentre gli endpoint secondari erano la DOR, la sicurezza e i livelli delle CAR T-cells e delle citochine.

I risultati a un anno, pubblicati nel dicembre 2017 sul New England Journal of Medicine, sono apparsi coerenti con quelli ottenuti nella fase 1 dello studio [figura 3].

Figura 3. Dati di efficacia a un anno di axi-cel nello studio ZUMA-1. Stime di Kaplan-Meier della durata della risposta, della PFS e dell'OS.



Nei 101 pazienti arruolati nella fase 2 dello studio e seguiti per una mediana di 27,2 mesi, l'ORR è risultato dell'83%, il 58% dei pazienti ha ottenuto una risposta completa e il 39% ha mantenuto la risposta, tra cui il 37% dei pazienti con risposta completa.

Il 93% dei pazienti che stavano rispondendo al trattamento dopo 12 mesi dall'infusione ha mantenuto tale risposta anche dopo 24 mesi. La DOR mediana è risultata di 11,1 mesi, mentre la durata mediana della risposta completa non è stata raggiunta.

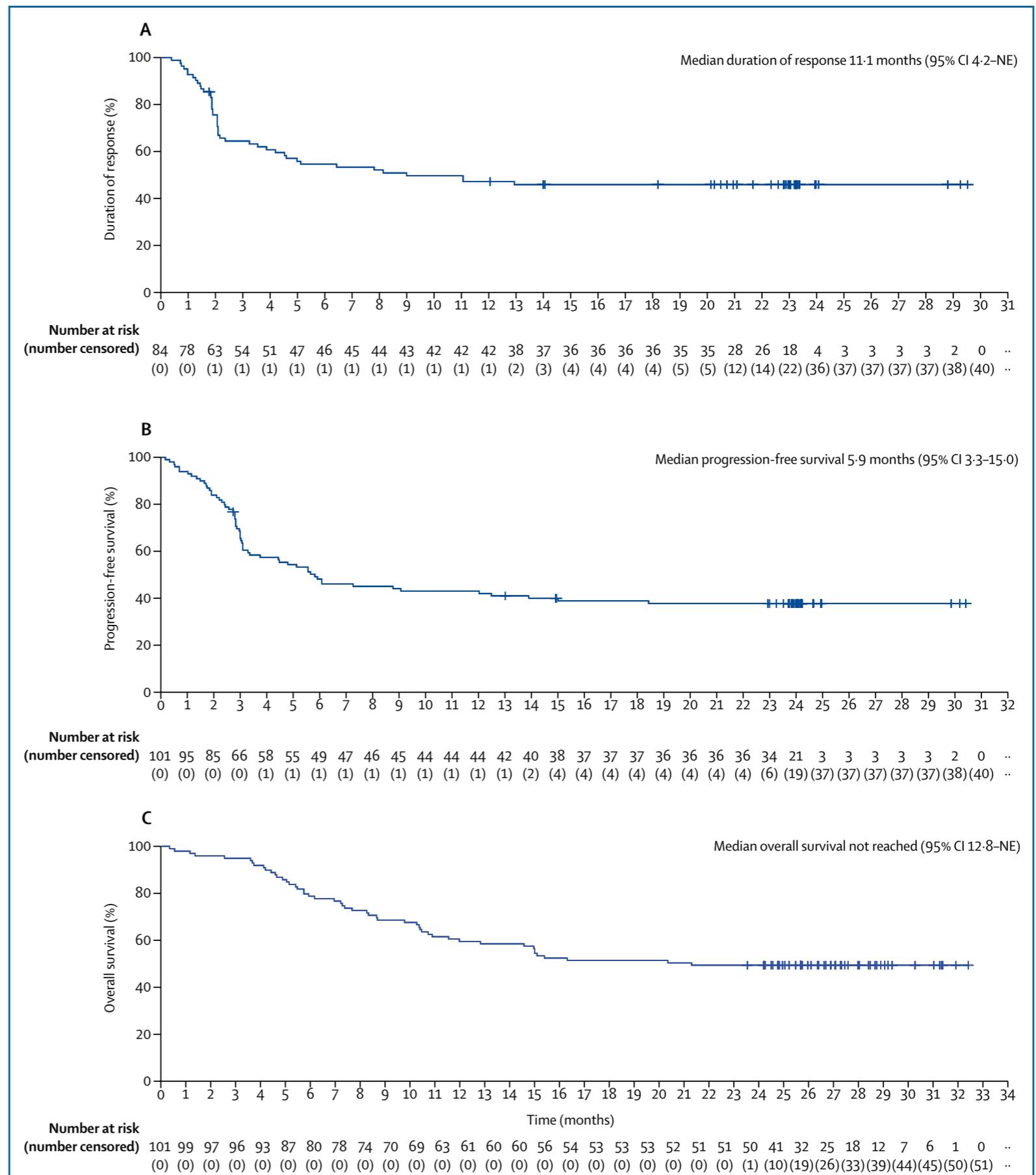
L'OS mediana non è ancora stata raggiunta e la PFS mediana è risultata di 5,9 mesi [figura 4].

Inoltre, nei pazienti che avevano biomarker valutabili si è osservata una persistenza delle CAR T-cells a 24 mesi dall'infusione nel 66% dei casi.

L'analisi del profilo di sicurezza 2 anni dopo l'infusione (relativa a 108 pazienti) non ha riservato sorprese e ha dato risultati sostanzialmente simili a quelli osservati dopo un anno.

La CRS e gli effetti neurologici di grado 3 o superiore sono stati osservati rispettivamente nell'11% e nel 32% dei pazienti, e tali effetti sono stati tutti gestibili e in gran parte reversibili.

Figura 4. Dati di efficacia a 2 anni di axi-cel nello studio ZUMA-1. Stime di Kaplan-Meier della DOR, della PFS e dell'OS nei 101 pazienti arruolati nella fase 2.



Altre reazioni avverse comuni di grado 3 o superiore sono state encefalopatia, infezione da patogeno non specificato, infezione batterica, afasia, infezione virale, delirio, ipotensione e ipertensione.

Sono stati registrati cinque nuovi eventi avversi gravi rispetto all'analisi dei dati a un anno, ma nessuno di essi è risultato correlato ad axi-cel. Inoltre, durante il secondo anno di follow-up non si è verificato alcun nuovo caso di CRS né alcun evento neurologico o decesso correlato ad axi-cel.

Dati di 'real life' consolidano i risultati dello studio registrativo

Al congresso ASH 2018 sono stati presentati anche dati di 'real life' relativi a 274 pazienti trattati con axi-cel nella pratica clinica dopo l'approvazione del prodotto negli Stati Uniti. I risultati di quest'analisi retrospettiva e indipendente sono importanti, in quanto confermano sostanzialmente quelli dello studio registrativo ZUMA-1.

Il lavoro, coordinato dall'MD Anderson Cancer Center della University of Texas, ha coinvolto 17 centri e l'analisi dei dati ha evidenziato a 90 giorni dall'infusione di axi-cel un ORR dell'81% e un tasso di risposta completa del 57%.

Anche se il follow-up è relativamente breve, i dati di risposta a 90 giorni nel mondo reale sono paragonabili alle migliori risposte osservate nello studio ZUMA-1, confermando il beneficio di questa terapia anche al di fuori dei trial clinici. Inoltre, fatto importante, anche il profilo di sicurezza sembra paragonabile a quello emerso nello studio registrativo, nonostante quasi la metà dei pazienti fossero soggetti più 'difficili', che non avrebbero potuto partecipare allo studio ZUMA-1 in quanto non ne soddisfacevano i criteri di inclusione.

Nuovi dati su axi-cel dal congresso ASCO 2019

Nel giugno scorso, al congresso dell'ASCO, a Chicago, sono stati presentati nuovi risultati interessanti dello studio ZUMA-1: una sottoanalisi dei dati a 2 anni dello studio registrativo che conferma l'efficacia e la sicurezza di axi-cel anche nei pazienti anziani (65 anni e oltre), con alte percentuali di risposta e di OS, e dati preliminari della coorte 4 sulla gestione della sicurezza, che dimostrano come l'uso precoce di steroidi possa aiutare a gestire le forme più gravi di CRS e neurotossicità, senza impattare negativamente sui tassi di risposta.

Nella sottoanalisi dello studio registrativo sono stati valutati 24 pazienti di età ≥ 65 anni e 77 pazienti di età inferiore. A un follow-up mediano di 27,1 mesi, l'ORR valutato dallo sperimentatore è risultato del 92% nel gruppo degli over 65 e 81% nel gruppo più giovane, con un tasso di risposta completa rispettivamente del 75% e 53% e un tasso di pazienti che mantenevano la risposta a 2 anni rispettivamente del 42% e 38%. Inoltre, l'OS a 24 mesi è risultata rispettivamente del 54% e del 49%.

Sul fronte della sicurezza, in tutti i pazienti esaminati (27 di età ≥ 65 anni e 81 sotto i 65), gli eventi neurologici di grado ≥ 3 hanno mostrato un'incidenza superiore nei pazienti più anziani (44% contro 28%), ma, di contro, la CRS di grado ≥ 3 è risultata meno frequente (7% contro 12%).

Questa analisi è importante perché dimostra che nell'anziano, una popolazione sulla quale vi erano finora pochi dati, non vi sono differenze sostanziali di efficacia né un aumento significativo delle tossicità rispetto al paziente più giovane.

Nella coorte 4 dello studio ZUMA-1, i pazienti trattati con axi-cel sono stati trattati precocemente con steroidi, avviando la terapia già in presenza di CRS e neurotossicità di grado 1 (mentre la scheda tecnica del prodotto prevede questo intervento

in presenza di eventi almeno di grado 2 per la CRS e di grado 3 per la neurotossicità) dopo che non era stato osservato alcun miglioramento con 3 giorni di cure di supporto.

Al momento del cut-off dei dati dell'abstract, 21 dei 40 pazienti previsti erano stati trattati con axi-cel, con un follow-up mediano di 7,7 mesi; il 76% aveva ricevuto corticosteroidi e l'86% tocilizumab. Si sono osservate CRS e neurotossicità di grado 1/2 rispettivamente nel 100% e 48% dei pazienti, ma nessuno ha sviluppato una CRS di grado ≥ 3 e solo il 10% ha manifestato neurotossicità di grado ≥ 3 (entrambi i valori sono numericamente inferiori rispetto a quelli osservati nelle coorti registrative di ZUMA-1); inoltre, non vi sono stati decessi causati, da eventi avversi. Riguardo all'efficacia, l'ORR valutato dallo sperimentatore è risultato pari all'81% e la risposta completa del 62%, mentre la DOR mediana non è stata ancora raggiunta.

Anche se dovranno essere confermati da un follow-up più prolungato e su un numero maggiore di pazienti, i dati di sicurezza ed efficacia emersi da quest'analisi suggeriscono come un trattamento precoce con steroidi degli eventi avversi possa migliorare il profilo rischio/beneficio di axi-cel.

Un altro prodotto in sviluppo, oltre ad axi-cel: KTE-X19

Oltre ad axi-cel, Gilead ha altre terapie a base di CAR T-cells nella sua *pipeline* oncologica. Il prodotto in fase più avanzata di sviluppo è KTE-X19, che può essere considerato una derivazione di axi-cel. Il suo CAR, infatti, è lo stesso di axi-cel, ma l'iter produttivo differisce rispetto quest'ultimo ed è stato modificato in modo da permettere una rimozione delle cellule maligne circolanti che potrebbero essere presenti nel sangue di pazienti con leucemia linfatica cronica, leucemia linfoblastica acuta e linfoma mantellare, indicazioni per le quali si sta

sviluppando questa terapia. Tale modifica rende KTE-X19 un prodotto formalmente diverso da axi-cel, e che seguirà un iter regolatorio separato.

Lo studio ZUMA-3

All'ultimo congresso dell'ASCO, sono stati presentati i risultati finali della fase 1 dello studio registrativo di fase 1/2 **ZUMA-3** (A Study Evaluating KTE-X19 in Adult Subjects With Relapsed/Refractory B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia; NCT02614066), un trial multicentrico, a singolo braccio, nel quale si stanno valutando efficacia e sicurezza di KTE-X19 in pazienti adulti con leucemia linfoblastica acuta recidivante o refrattaria. Questi risultati hanno fornito indicazioni sul dosaggio e sulla gestione della sicurezza del trattamento con KTE-X19, di cui beneficerà la parte di fase 2 dello studio, attualmente in corso, nonché primi dati incoraggianti di efficacia, mostrando alte percentuali di risposta.

La fase 1 ha coinvolto 45 pazienti refrattari primari o recidivanti/refrattari dopo almeno due precedenti linee di terapia, di cui sei trattati con 2×10^6 cellule/kg, 23 con 1×10^6 cellule/kg e 16 con $0,5 \times 10^6$ cellule/kg.

Dei 41 pazienti nei quali si è potuta valutare l'efficacia dopo almeno 2 mesi di follow-up (il follow-up mediano è di 16 mesi), il 68% ha raggiunto una risposta completa o una risposta completa con recupero incompleto dell'emocromo e il 100% ha mostrato una MRD non rilevabile.

Dei 23 pazienti trattati con il dosaggio scelto per lo studio di fase 2 attualmente in corso (1×10^6 cellule/kg), 19 sono stati valutabili per l'efficacia e al momento del cut off dei dati l'84% aveva ottenuto una risposta completa o una risposta completa con recupero incompleto dell'emocromo, mentre il 75% manteneva la risposta.

Sul fronte della sicurezza, non sono state identificate tossicità dose-limitanti.

La CRS di ha avuto un'incidenza del 29% e la neurotossicità di grado ≥ 3 un'incidenza del 38%. Durante lo studio, due pazienti hanno sviluppato eventi avversi di grado 5 correlati a KTE-X19: un ictus nell'ambito della CRS e di eventi neurologici e un'insufficienza multiorgano secondaria alla CRS. Nel gruppo trattato con il dosaggio che si utilizzerà nella fase 2, la CRS e la neurotossicità di grado ≥ 3 hanno mostrato un'incidenza rispettivamente del 26% e 43%.

Da segnalare che durante lo studio è stato utilizzato un nuovo protocollo di gestione degli eventi avversi in 9 pazienti trattati con 1×10^6 cellule/kg di KTE-X19. In base a questo protocollo, il trattamento con corticosteroidi è stato avviato all'esordio degli eventi neurologici di grado ≥ 2 (invece che all'esordio degli eventi di grado 3, come effettuato in precedenza) e tocilizumab è stato somministrato solo per la gestione delle tossicità nel contesto della CRS. In questo sottogruppo, due pazienti (il 22%) hanno sviluppato una CRS di grado 3 e uno (l'11%) eventi neurologici di grado 3, ma non vi sono stati eventi di grado 4 o 5.

Ulteriori sviluppi delle CAR T-cells di Gilead

Lo sviluppo di axi-cel prosegue al di là dello studio ZUMA-1. Infatti, sono attualmente in corso o pianificati vari trial nei quali si stanno sperimentando queste CAR T-cells in diversi setting, da sole o in associazione con altri trattamenti.

Anche KTE-X19 è attualmente in fase di sperimentazione, oltre che nello studio ZUMA-3 sui pazienti adulti con leucemia linfoblastica acuta, in altri trial, per altre indicazioni (linfoma mantellare, leucemia linfoblastica acuta in pazienti pediatrici e adolescenti e leucemia linfatica cronica).

Per quanto riguarda axi-cel, per esempio, è già partito lo studio multicentrico di fase 1/2 **ZUMA-12** (NCT03761056), nel quale axi-cel viene impiegato in pazienti con linfoma a grandi cellule B ad alto rischio come terapia di prima linea, e non dopo che sono risultati refrattari o sono ricaduti; i partecipanti dovrebbero essere circa 40 e i primi dati dovrebbero arrivare nel giugno 2020.

Inoltre, lo studio **ZUMA-7** (NCT03391466) sta arruolando pazienti, un trial randomizzato di fase 3 nel quale axi-cel viene confrontato con lo *standard of care* come terapia di seconda linea in soggetti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B recidivato/refrattario. L'obiettivo degli sperimentatori è reclutare circa 350 partecipanti e l'analisi primaria dovrebbe essere disponibile nel 2022.

Così come per tisagenlecleucel, si sta poi sperimentando axi-cel anche in associazione con altri trattamenti. Per esempio, il prodotto è attualmente oggetto di indagine nello studio di fase 1/2 **ZUMA-6** (NCT02926833) in pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B refrattario trattati con queste CAR T-cells e, a seguire, con un ciclo di durata limitata dell'inibitore del checkpoint immunitario PD-L1 atezolizumab; il trial ha arruolato circa 40 pazienti e i primi risultati dovrebbero essere disponibili quest'anno.

Nello studio **ZUMA-11** (NCT03704298), un trial multicentrico di fase 1/2 su circa 50 pazienti con linfoma a grandi cellule B refrattario, axi-cel viene, invece, valutato in combinazione con utomilumab, un anticorpo monoclonale in grado di legarsi in modo specifico al recettore 4-1BB presente nelle cellule T, potenziando l'effetto anti-tumorale del sistema immunitario; i dati dell'analisi primaria dovrebbero arrivare all'inizio del 2021.

Per quanto riguarda KTE-X19, invece, lo si sta testando nello studio multicentrico di fase 2 **ZUMA-2** (NCT02601313) su pazienti adulti con linfoma mantellare ricaduto/refrattario; il trial dovrebbe coinvolgere circa 130 pazienti e i risultati dell'analisi primaria dovrebbero essere disponibili entro la fine 2019.

Inoltre, è in corso lo studio di fase 1/2 **ZUMA-4** (NCT02625480) su pazienti pediatrici e adolescenti con leucemia linfoblastica acuta ricaduta/refrattaria; l'obiettivo dell'arruolamento è di circa 100 pazienti e i risultati dell'analisi primaria saranno disponibili non prima del 2020.

È partito nell'autunno scorso anche lo studio multicentrico di fase 1/2 **ZUMA-8** (NCT03624036), nel quale i pazienti arruolati (circa 100, secondo i programmi) sono soggetti adulti con leucemia linfatica cronica recidivata/refrattaria; per l'analisi primaria si dovrà aspettare la primavera 2021.

Bibliografia

- [1] J.N. Kochenderfer, et al. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother.* 2009;32:689-702.
- [2] J. R. Zachary, et al. Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL. *Leukemia & Lymphoma.* 2018;59:(8):1785-96; doi: 10.1080/10428194.2017.1387905.
- [3] N. Bouchkouj, et al. FDA Approval Summary: Axicabtagene Ciloleucel for Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2018; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2743.
- [4] Yescarta - Riassunto delle caratteristiche del prodotto. https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/yescarta-epar-product-information_it.pdf [ultimo accesso: 11-2019]
- [5] S.S. Neelapu, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2531-44; doi: 10.1056/NEJMoa1707447.
- [6] F.L. Locke, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.* 2018; doi: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30864-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30864-7).
- [7] L.J. Nastoupil, et al. Axicabtagene Ciloleucel (Axi-cel) CD19 Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy for Relapsed/Refractory Large B-Cell Lymphoma: Real World Experience. *Blood*, 132(Suppl 1), 91. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-114152>.
- [8] S.S. Neelapu, et al. Outcomes of Patients \geq 65 Years of Age in ZUMA-1, a Pivotal Phase 1/2 Study of Axicabtagene Ciloleucel in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 37, 2019 [suppl; abstr 7555].
- [9] M.S. Topp, et al. Preliminary Results of Earlier Steroid Use with Axicabtagene Ciloleucel in Patients with Relapsed/Refractory Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 37, 2019 [suppl; abstr 7558].
- [10] B.D. Shah, et al. End of Phase 1 Results of ZUMA-3, a Phase 1/2 Study of KTE-X19, Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy, in Adult Patients with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* 37, 2019 [suppl; abstr 7006].

Intervista a Cristina Le Grazie

Direttore medico di Gilead Italia

Come sta procedendo lo sviluppo clinico di axi-cel e delle altre CAR T-cells nella pipeline di Gilead nel mondo?

Lo sviluppo clinico dei nostri prodotti a base di CAR T-cells sta procedendo attraverso diversi studi condotti a livello mondiale, che coinvolgono anche centri in Europa e in Italia, nell'ambito delle neoplasie ematologiche a cellule B.

Qual è la tecnologia utilizzata per produrre le vostre CAR T-cells e quali sono le sue caratteristiche e i suoi vantaggi?

Per preparare axi-cel i linfociti T del paziente vengono modificati geneticamente per fare in modo che esprimano un recettore chimerico per l'antigene, cioè un CAR, diretto contro l'antigene CD-19. I linfociti T così modificati vengono successivamente stimolati all'espansione per poi essere reinfusi nel paziente, dove riconoscono ed eliminano le cellule tumorali che esprimono l'antigene CD-19. Il prodotto è indicato per il trattamento di pazienti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B e linfoma primitivo del mediastino che hanno già fatto almeno due linee di terapia; si somministra con una singola infusione e ha la potenzialità di indurre remissioni complete in una buona percentuale di pazienti, rispetto alle terapie standard. Il follow-up a 27 mesi dello studio registrativo ZUMA-1 mostra una sopravvivenza globale mediana non ancora raggiunta (più della metà dei pazienti è ancora vivo), a fronte di una sopravvivenza mediana con le terapie standard di circa 6 mesi.



Quali sono le prime reazioni all'impiego del farmaco da parte della comunità scientifica?

La comunità scientifica riconosce il valore di questa importante innovazione terapeutica per il trattamento di pazienti che altrimenti avrebbero un'aspettativa di vita molto ridotta. Allo stesso tempo, c'è la consapevolezza che non potrà essere un'opzione terapeutica per tutti i pazienti affetti dalle patologie sopra menzionate. Sarà quindi molto importante per gli oncematologi definire dei criteri che consentano di selezionare al meglio i pazienti che potranno trarre un reale beneficio dalla terapia con axi-cel e nei quali la tossicità del trattamento sarà opportunamente gestibile.

Come verrà gestito l'accesso al prodotto, ora che è approvato, nel nostro Paese?

Axi-cel potrà essere somministrato solo in centri opportunamente qualificati per questo tipo di trattamento. Gilead è disponibile per fornire le necessarie qualifiche ai centri opportunamente identificati a livello regionale sulla base dei criteri stabiliti dall'Aifa.

Quali sono gli ostacoli principali che vede per l'accesso ad axi-cel nella realtà italiana e come pensate di superarli?

La capacità del sistema, intesa come numero di centri qualificati, risorse degli stessi e numero di pazienti trattabili per centro, ad oggi non è ancora dimensionata per riuscire a trattare tutti coloro che potrebbero potenzialmente beneficiare del trattamento con le CAR T-cells. Serve, dunque, una stretta collaborazione tra istituzioni, comunità scientifica e azienda per realizzare un sistema funzionale ad accogliere questa importante innovazione terapeutica.

Avete qui in Italia un'unità dedicata alle CAR T-cells? Se sì, come è organizzata?

Sì, l'affiliata italiana ha un dipartimento di Medical Affairs e una Business Unit interamente dedicate alla terapia cellulare. Entrambi i dipartimenti hanno figure di sede e di territorio.

Quali attività prevedete di attuare per informare la comunità medico-scientifica sui risultati che si possono ottenere con questa terapia e sulla disponibilità del prodotto?

Il supporto reattivo e tempestivo alle richieste educazionali sui risultati clinici di axi-cel provenienti dalla comunità scientifica è la principale responsabilità del dipartimento di

Medical Affairs. Inoltre, nei centri che verranno qualificati per l'erogazione di axi-cel, la direzione medica effettuerà formazione specifica sulla gestione delle tossicità del trattamento, come concordato con le autorità regolatorie europee e italiane.

Dove verranno prodotte le CAR T-cells di Gilead destinate ai pazienti italiani?

Fino alla fine del 2019 axi-cel verrà prodotto negli Stati Uniti. Nel 2020 è prevista la piena operatività di un sito produttivo europeo nei Paesi Bassi, in prossimità dell'aeroporto di Amsterdam.

Ci sono spazi di miglioramento della tecnologia produttiva?

La tecnologia produttiva delle nostre CAR T-cells autologhe, come axi-cel, vanta un'elevata percentuale di successo produttivo (99% nello studio clinico registrativo). Con l'evolversi di nuove tecnologie, per esempio le CAR T-cells allogeniche, ci si aspetta un contestuale avanzamento della tecnologia produttiva.

Quali sono le possibili evoluzioni future di questa terapia?

Le potenziali evoluzioni di questa terapia sono numerose e potrebbero essere esportabili anche ad altre aree terapeutiche. In ambito oncoematologico, una delle sfide più importanti sarà quella di espandere lo spettro delle patologie trattabili con questo tipo di tecnologia attraverso l'identificazione di nuovi target antigenici e lo sviluppo di CAR T-cells specifiche.

Lisocabtagene maraleucel (liso-cel) e idecabtagene vicleucel (ide-cel), le CAR T-cells di Celgene

Celgene è attualmente impegnata nello sviluppo di diverse immunoterapie cellulari a base di CAR T-cells. I prodotti più avanti nello sviluppo sono lisocabtagene maraleucel (liso-cel, identificato in precedenza con la sigla JCAR017) e idecabtagene vicleucel (ide-cel, identificato in precedenza con la sigla bb2121).

Liso-cel è un prodotto a base di CAR T-cells anti-CD19 sviluppato inizialmente dal Fred Hutchinson Cancer Research Center di Seattle e dalla *biotech* Juno Therapeutics, acquisita nel gennaio 2018 da Celgene; è in fase avanzata di sviluppo (già iniziata la fase 3) per il trattamento dei linfomi non-Hodgkin e della leucemia linfatica cronica, ma non è ancora stato approvato dalle agenzie regolatorie in nessun Paese.

Ide-cel è una terapia a base di CAR T-cells dirette contro l'antigene di maturazione delle cellule B (BCMA) in fase di sperimentazione per il trattamento di pazienti affetti da mieloma multiplo recidivato/refrattario e sviluppata da Celgene in collaborazione con BlueBird Bio. Il prodotto non è al momento approvato dalle agenzie regolatorie in nessun Paese.

Liso-cel

Liso-cel è un'immunoterapia cellulare a base di CAR T-cells di seconda generazione aventi come bersaglio l'antigene CD19 e attualmente allo studio per il trattamento dei pazienti con

linfoma non-Hodgkin aggressivo recidivato/refrattario, tra cui pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma follicolare di grado 3B, linfoma primitivo del mediastino a cellule B, linfoma mantellare, e altri ancora.

Così come le due CAR T-cells già approvate dalle agenzie regolatorie, Aifa compresa, (tisagenlecleucel e axi-cel), il prodotto è costituito da cellule T autologhe prelevate dal paziente, modificate geneticamente in laboratorio in modo da renderle capaci di esprimere un CAR in grado di riconoscere l'antigene CD19, legarsi alle cellule che lo esprimono sulla loro superficie, e, di conseguenza, attivarsi ed eliminarle.

Una caratteristica distintiva di liso cel è quella di essere costituito da una miscela di composizione definita (rapporto 1:1) di linfociti T CD4+ e CD8+ trasdotti con il CAR. Secondo gli sperimentatori di questa terapia cellulare, tale caratteristica consente la somministrazione di una dose precisa e fissa di CAR T-cells CD4+ e CD8+ in parti uguali, il che si tradurrebbe in una bassa variabilità della composizione del prodotto e della funzionalità delle cellule. Tuttavia, il significato clinico di questa composizione definita è ancora oggetto di studio.

Come si produce liso-cel

Nello studio registrativo TRANSCEND-NHL-001, secondo quanto riferito dagli autori, il tempo 'da vena a vena' è stato inferio-

re a 3 settimane e la produzione di liso-cel ha avuto una percentuale di successo del 99% (132 pazienti su 134). Non sono attualmente disponibili informazioni e dati relativi al processo di produzione di liso-cel.

Il CAR di liso-cel

Il transgene codificante per il CAR di liso-cel viene veicolato nelle cellule T da un vettore lentivirale. Il CAR è costituito da una porzione extracellulare, formata da un frammento variabile di un anticorpo murino a catena singola (scFv) in grado di

legarsi specificamente all'antigene CD19, collegato tramite una porzione spaziatrice e una regione transmembrana alla porzione intracellulare, formata dal dominio co-stimolatorio 4-1BB (lo stesso di tisagenlecleucel), collegato a sua volta al dominio di segnalazione CD3 zeta e a una forma troncata del recettore del fattore di crescita epidermico umano (EGFRt) (figura 1). L'EGFRt espresso, privo sia dei domini di legame del ligando sia dell'attività tirosin chinasi, può facilitare la rilevazione *in vivo* delle CAR T-cells somministrate e, in caso di tossicità, potrebbe teoricamente favorire l'eliminazione di tali cellule attraverso una risposta citotossica cellulare anticorpo-dipendente somministrando cetuximab, possibilità che, tuttavia, non è ancora stata sperimentata in uno studio clinico.

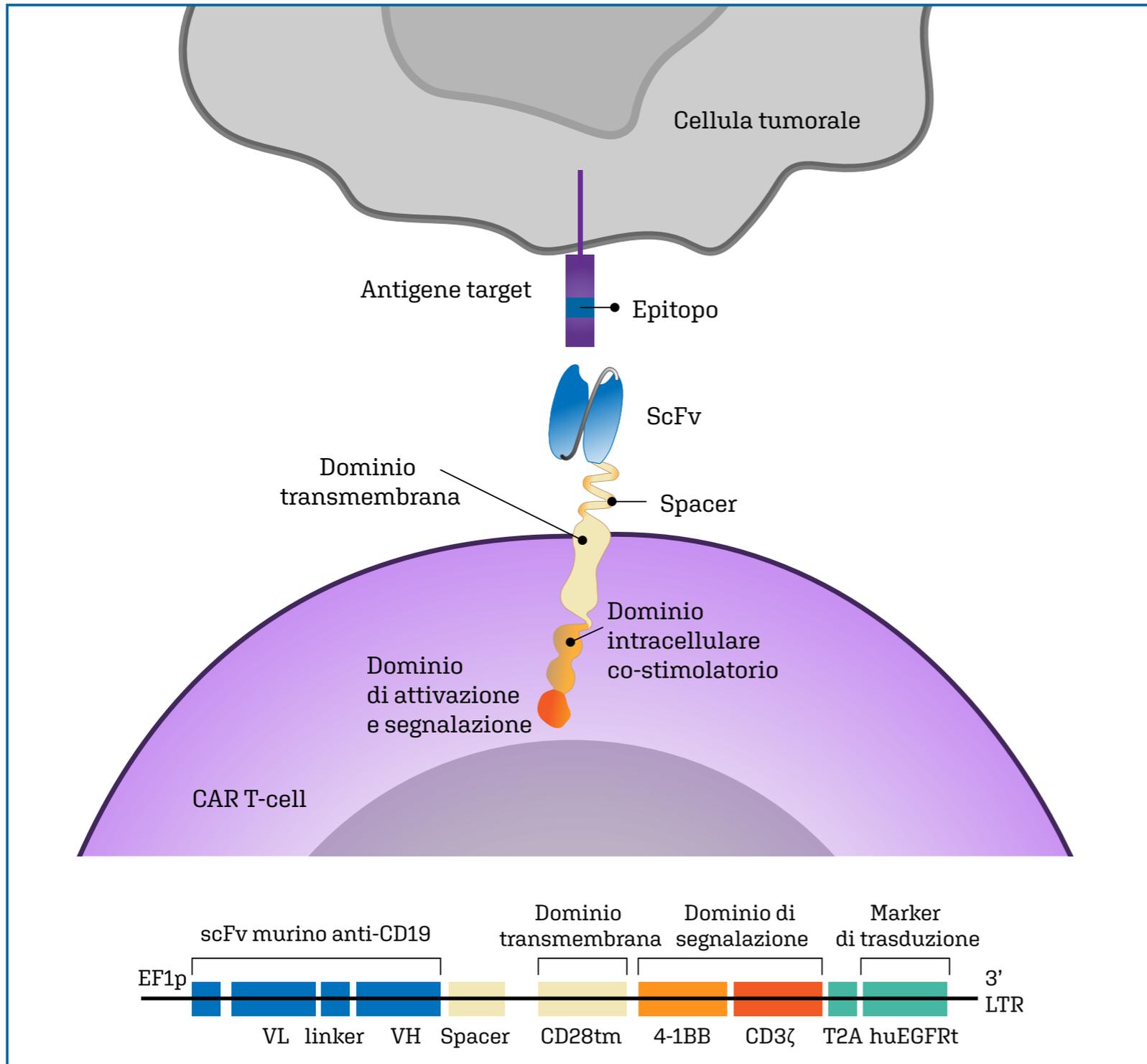


Figura 1. Struttura del CAR di liso-cel.

Status regolatorio di liso-cel

Liso-cel non è ancora stato approvato da alcuna agenzia regolatoria. Tuttavia, Celgene intende sottoporre all'FDA la domanda di registrazione del prodotto per il trattamento dei pazienti con linfoma non-Hodgkin aggressivo recidivato/refrattario nella seconda metà del 2019, sulla base dei risultati dello studio regi-



strativo di fase 1 **TRANSCEND-NHL-001** (NCT02631044). Non è ancora stata resa nota la data in cui sarà inoltrata la domanda di registrazione anche all'Ema.

I dati clinici su liso-cel

Lo studio TRANSCEND-NHL-001

I dati finora disponibili su efficacia e sicurezza di liso-cel nel trattamento dei pazienti con linfoma non-Hodgkin provengono sostanzialmente dallo studio registrativo TRANSCEND-NHL-001, un trial multicentrico di fase 1 ancora in corso, condotto in 14 centri statunitensi.

In questo studio, il trattamento con liso-cel ha finora dimostrato di avere una tossicità acuta limitata e gestibile e di portare a risposte durature nella popolazione studiata, formata da pazienti ad alto rischio, fortemente pretrattati.

I partecipanti sono pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B ad alto grado di malignità (*de novo* o trasformato da un linfoma follicolare), linfoma follicolare di grado 3B, linfoma primitivo del mediastino a cellule B o linfoma mantellare, recidivato/refrattario. Per l'arruolamento non è richiesto un valore minimo della conta assoluta dei linfociti e possono essere arruolati pazienti sottoposti in precedenza senza successo al trapianto allogenico, con coinvolgimento secondario del sistema nervoso centrale (SNC) e con performance status ECOG pari a 2.

Prima dell'infusione di liso-cel, i pazienti vengono sottoposti a una linfo-deplezione con fludarabina (30 mg/m²) e ciclofosfamide (300 mg/m²) al giorno, per 3 giorni. Dopo la parte iniziale di *dose-finding*, gli sperimentatori hanno scelto due livelli di dosaggio per le coorti di espansione: 50 milioni di cellule (somministrati con una singola o una doppia infusione) e 100 milioni di cellule (somministrati con una singola infusione).

La coorte dei pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B è stata suddivisa in una coorte CORE e una coorte FULL. La coorte CORE comprende i pazienti con linfoma a cellule B di alto grado (*double hit* o *triple hit*) e quelli con linfoma diffuso a grandi cellule B *de novo* o trasformato da un linfoma follicolare, mentre la coorte FULL comprende i pazienti della coorte CORE più pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B trasformato da una leucemia linfatica cronica, linfoma della zona marginale, linfoma primitivo del mediastino a cellule B o linfoma follicolare di grado 3B.

I primi dati dello studio sono stati presentati nel 2017 al congresso dell'ASH.

Per quanto riguarda l'**efficacia** (figura 2), nei 91 pazienti della coorte FULL:

- il migliore ORR è risultato del 74% e la migliore risposta completa del 52%; queste percentuali corrispondono anche all'ORR e alla risposta completa misurate a 3 mesi;
- la DOR mediana è risultata di 5 mesi;
- l'OS mediana non era ancora stata raggiunta.

Nei 67 pazienti della coorte CORE:

- l'ORR a 3 mesi e la risposta completa a 3 mesi sono risultati rispettivamente del 65% e 54%;
- la DOR mediana è risultata di 9,2 mesi
- l'OS mediana non era ancora stata raggiunta.

Per quanto riguarda la **sicurezza**:

- in entrambe le coorti, l'incidenza della CRS di grado 3 o superiore è risultata molto bassa (1%);
- l'incidenza della neurotossicità di grado 3 o superiore è risultata più alta, ma comunque bassa: 12% nella coorte FULL e 15% nella coorte CORE;

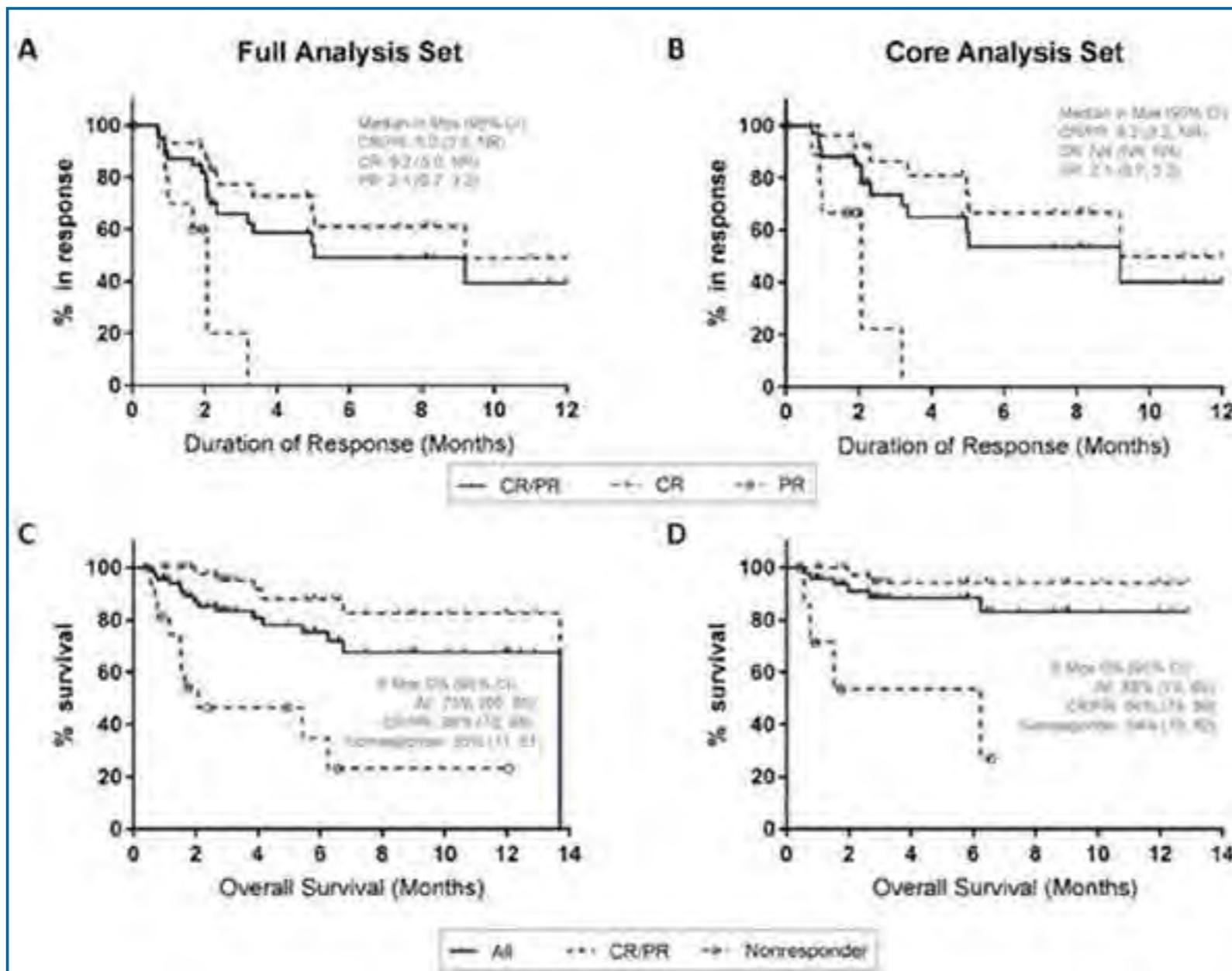


Figura 2. Durata della risposta e OS nella coorte FULL e nella coorte CORE dello studio TRANSCEND-NHL-001.

- il 60% dei pazienti non ha manifestato nessuna di queste due tossicità;
- non si sono registrati decessi correlati al trattamento con le CAR T-cells.

Nel giugno 2018, al congresso dell'ASCO, è stato presentato un aggiornamento dello studio, basato su dati analizzati fino al 4 maggio 2018 e comprendente i risultati di 114 pazienti trattati con liso-cel, di cui 102 valutabili e la metà dei quali trattati con la dose pari a 100 milioni di cellule.

Per quanto riguarda l'**efficacia**, i risultati chiave sono stati i seguenti:

- ORR pari al 75%;
- tasso di risposta completa pari al 55%;
- la DOR mediana non risultava ancora raggiunta;
- l'OS a un anno non risultava ancora raggiunta, ma il 90% dei pazienti che ha ottenuto una risposta completa era ancora vivo a 12 mesi dall'infusione.

Per quanto riguarda la **sicurezza**:

- gli eventi avversi più comuni di grado 3 sono risultati le citopenie e l'affaticamento;
- l'incidenza della CRS è risultata del 37% e quella della CRS di grado 3/4 dell'1%;
- l'incidenza della tossicità neurologica è risultata del 27% e quella di grado 3/4 del 13%;
- il ricorso ai farmaci di salvataggio è stato limitato (tocilizumab nel 17% dei pazienti e corticosteroidi nel 21%);

- inoltre, non si sono trovate differenze di incidenza della neurotossicità fra la dose più bassa di liso-cel impiegata (50 milioni di cellule) e quella più alta (100 milioni di cellule), il che ha indotto gli autori a scegliere la seconda come dose da utilizzare nella cosiddetta 'coorte pivotal' dei pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B.

Al congresso, lo sperimentatore principale dello studio, il professor Jeremy S. Abramson, direttore del Lymphoma Program

presso il Massachusetts General Hospital Cancer Center di Boston, ha presentato anche una sottoanalisi dei dati di efficacia e sicurezza della coorte pivotal dei pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B, formata da 37 pazienti. In questo sottogruppo:

- l'ORR è risultato dell'80%;
- il tasso di risposta completa è risultato del 59%;
- dopo 6 mesi dall'infusione, il 49% era ancora in remissione e il 46% continuava ad avere una risposta completa.

Inoltre, quando gli sperimentatori hanno valutato il mantenimento della risposta oltre i 6 mesi nei pazienti trattati con tutti i livelli di dosaggio, hanno visto che il 93% di coloro che erano in remissione completa a 6 mesi era ancora in questa condizione al momento del cut off dei dati.

Un altro aspetto da segnalare è che, sulla base del profilo di sicurezza rassicurante emerso in queste analisi, si sta valutando anche la possibilità di somministrare liso-cel in un setting ambulatoriale nell'ambito dello studio TRANSCEND; nel febbraio 2018, infatti, Abramson ha presentato ai BMT Tandem Meetings di Salt Lake City i risultati relativi a otto pazienti infusi in ambulatorio, che suggeriscono la fattibilità di questo approccio, senza perdere in efficacia e sicurezza.

L'aggiornamento più recente dei dati dello studio TRANSCEND-NHL-001 arriva dall'ultimo congresso dell'ASCO, nel giugno 2019, dove sono state presentate due analisi di sottogruppi: uno di 9 pazienti con linfoma secondario dell'SNC e uno di 17 pazienti con linfoma mantellare.

Nella prima analisi, sette pazienti presentavano linfoma secondario dell'SNC al momento del primo trattamento e due al momento del ritrattamento con liso-cel, e in un solo paziente sono stati osservati eventi neurologici e CRS. Dei sei pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B e coinvolgimen-

to dell'SNC al momento del primo ritrattamento con liso-cel, quattro hanno raggiunto risposte complete, due delle quali mantenute rispettivamente per oltre 8 e 17 mesi. I dati mostrano che liso-cel può essere somministrato in sicurezza anche ai pazienti con linfoma secondario dell'SNC, una popolazione caratterizzata da un elevato bisogno clinico non soddisfatto, nella quale non si è registrato un eccesso di neurotossicità rispetto alla popolazione complessiva studiata.

Nella seconda analisi sono stati riportati i risultati di sicurezza e di efficacia preliminare relativi ai 17 pazienti con linfoma mantellare. L'evento avverso più frequente di grado ≥ 3 è risultato la trombocitopenia (41%), seguita dall'anemia (35%) e dalla neutropenia (35%). Il 6 e il 12% dei pazienti, rispettivamente, hanno sviluppato una CRS ed eventi neurologici di grado ≥ 3 ; inoltre, si è verificata una sindrome da lisi tumorale fatale. Il migliore ORR osservato è stato del 71% e il miglior tasso di risposta completa del 53%. Questi risultati sono coerenti con quelli osservati in tutti i pazienti trattati con liso-cel nello studio TRANSCEND-NHL-001.

Lo studio TRANSCEND-CLL-004

All'ultimo congresso dell'ASH, nel dicembre 2018, sono stati presentati anche i primi risultati dello studio **TRANSCEND-CLL-004** (NCT03331198), un trial di fase 1/2 di *dose-finding* nel quale si è testato liso-cel in pazienti con leucemia linfatica cronica o linfoma linfocitico a piccole cellule ad alto rischio, pesantemente pretrattati, e trattati in precedenza con ibrutinib.

Nello studio, liso-cel ha mostrato un'attività promettente e la qualità della risposta sembra migliorare nel tempo; inoltre, il trattamento è risultato tollerabile.

I dati presentati all'ASH si riferiscono a 16 pazienti con leucemia linfatica cronica recidivati o refrattari, non idonei al

trattamento con un inibitore della BTK, come ibrutinib, o nei quali questo trattamento aveva fallito. Per poter partecipare, i pazienti ad alto rischio (cioè portatori della delezione 17p o di mutazioni di TP53, con IGVH non mutate o con un cariotipo complesso) devono essere già stati trattati senza successo con almeno due linee di terapia precedenti, mentre quelli con malattia a rischio standard con non meno di tre; inoltre, tutti dovevano avere un performance status ECOG non superiore a 1.

Dopo essere stati sottoposti a linfodeplezione con fludarabina 30 mg/m² e ciclofosfamida 300 mg/m², da 2 a 7 giorni dopo i partecipanti sono stati trattati con liso-cel (sei con 50 milioni di cellule e i restanti 10 con 100 milioni di cellule).

Il follow-up durante lo studio è stato di 24 mesi, tuttavia, come richiesto dalle autorità regolatorie, è programmato un follow-up a lungo termine per un massimo di 15 anni dopo l'ultima infusione di liso-cel.

A San Diego, sono stati presentati i dati preliminari di efficacia, sicurezza e farmacocinetica della porzione di fase 1 dello studio (quella di *dose-finding*).

Per quanto riguarda l'**efficacia** (tabella 1):

- nella valutazione della risposta effettuata 30 giorni dopo il trattamento con liso-cel, l'ORR nell'insieme delle due coorti è risultato del 75%, con un tasso di risposta completa del 31,3% e un tasso di risposta parziale del 43,8%;
- nella valutazione della risposta effettuata 3 mesi dopo il trattamento con liso-cel, l'ORR è risultato complessivamente dell'80%, il tasso di risposta completa del 50% e il tasso di risposta parziale del 30%;
- il 73,3% dei pazienti aveva una MRD non rilevabile alla citometria a flusso il giorno 30 e tutti hanno mantenuto l'MRD-negatività fino all'ultimo controllo del follow-up.

Sul fronte della **sicurezza**, sono questi i risultati principali:

- gli eventi avversi più frequenti sono stati le citopenie;
- la CRS ha avuto un'incidenza complessiva del 75% e la CRS di grado 3 un'incidenza del 6,3%;
- gli eventi avversi neurologici hanno avuto un'incidenza complessiva del 37,5% e quelli di grado 3 un'incidenza del 18,8%;
- la sindrome da lisi tumorale di qualsiasi grado e quella di grado 3 hanno mostrato un'incidenza rispettivamente del 12,5% e 12,5%;
- secondo gli autori, le tossicità, comprese la CRS e la neurotossicità, sono state comunque gestibili.

Per quanto riguarda la **farmacocinetica**:

- il tempo mediano di raggiungimento del picco di espansione per tutti i pazienti è risultato di 16 giorni (range: 4-30).

Al congresso ASCO 2109 è stato presentato un aggiornamento dei dati relativo a 23 pazienti, di cui 22 valutabili per la risposta.

Risposta, n (%)	Totale (n=8)
Risposta complessiva	6 (75%)
CR	4 (50%)
PR	2 (25%)
SD	1 (12,5%)
PD	1 (12,5%)
MRD-negatività, n (%)	Totale (n=7)
MRD-negatività complessiva	6 (85,7%)
CR	3 (42,9%)
PR	2 (28,6%)
SD	1 (14,3%)

Tabella 1. Migliore ORR e MRD-negatività nello studio TRANSCEND-CLL-004. CR: risposta completa; PR: risposta parziale; SD: stabilizzazione della malattia; PD: progressione della malattia;

Riguardo all'**efficacia**:

- il migliore ORR è risultato dell'82% e il 46% dei pazienti ha ottenuto la remissione completa con o senza recupero ematologico completo;
- su 20 pazienti valutabili per l'MRD, il 75% ha raggiunto la negatività nel sangue periferico (sensibilità 10^{-4}) e il 65% nel midollo osseo (sensibilità 10^{-6});
- le risposte sono apparse durature e l'83% dei pazienti che erano in remissione completa 6 mesi dopo l'infusione di liso-cel lo era ancora al momento della valutazione.

Per quanto riguarda la **sicurezza**:

- gli eventi avversi più comuni di qualsiasi grado sono stati anemia (83%), CRS (74%), trombocitopenia (74%), neutropenia (57%) e leucopenia (48%);
- due dei 14 pazienti trattati con 100 milioni di cellule T CAR-positive hanno sviluppato una tossicità dose-limitante: ipertensione di grado 4 in un caso ed encefalopatia di grado 3, la debolezza muscolare di grado 3 e la sindrome da lisi tumorale di grado 4 nell'altro paziente;
- su 23 pazienti valutabili per la sicurezza, gli eventi avversi degni di nota sono stati la CRS di grado 3 (sviluppatasi in due pazienti), gli eventi neurologici di grado ≥ 3 (in cinque pazienti) e la sindrome da lisi tumorale di grado ≥ 3 (in quattro pazienti), mentre non si sono osservate CRS o neurotossicità di grado 5.

Ulteriori sviluppi di liso-cel

Lo sviluppo di liso-cel prosegue su vari fronti e sono attualmente in corso o pianificati svariati trial nei quali si sta sperimentando questo trattamento in diversi setting, da solo o in associazione con altri trattamenti.

Per esempio, nel luglio 2018 è partito lo studio di fase 2 **TRANSCEND-NHL-006** (NCT03483103), nel quale si sta valutando

il prodotto in pazienti con linfoma non-Hodgkin come terapia di seconda linea. Il trial dovrebbe arruolare 56 pazienti e i primi dati dovrebbero essere disponibili nel 2021.

Nell'autunno 2018, invece, è iniziato lo studio **TRANSFORM** (NCT03575351), un trial multicentrico internazionale di fase 3 nel quale si confronta liso-cel con lo *standard of care* come terapia di seconda linea in pazienti adulti con linfomi non-Hodgkin a cellule B aggressivi, ad alto rischio e candidabili al trapianto, ricaduti/refrattari. L'obiettivo dell'arruolamento è di circa 180 pazienti e l'analisi primaria dovrebbe essere effettuata nel 2022.

Inoltre, è appena partito uno studio multicentrico europeo di fase 1/2 (NCT03743246) che prevede il trattamento con liso-cel di pazienti pediatrici affetti da linfoma non-Hodgkin a cellule B aggressivo o leucemia linfoblastica acuta a cellule B, ricaduti/refrattari, al quale parteciperanno anche due centri italiani (l'Ospedale S. Gerardo di Monza e l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma).

Celgene ha annunciato che nella prima metà del 2019, negli USA, è partito anche uno studio di fase 2 su pazienti con leucemia linfatica cronica recidivata/refrattaria trattati con liso-cel (la fase 2 dello studio TRANSCEND CLL-004).

E ancora, nello studio di fase 1/2 **PLATFORM** (NCT03310619), partito nell'autunno 2017, si sta valutando liso-cel in combinazione con altri agenti (l'anti PD-L1 durvalumab e CC-122) in soggetti con neoplasie a cellule B refrattarie o ricadute dopo almeno due linee di terapia, comprendenti un anticorpo anti-CD20 e un'antraciclina. I partecipanti dovrebbero essere circa 100 e l'analisi primaria dovrebbe essere eseguita nella primavera del 2022.

Ide-cel e bb21217

Ide-cel è una terapia a base di CAR T-cells di seconda generazione aventi come bersaglio l'antigene BCMA, espresso sulla superficie delle plasmacellule normali e tumorali.

Il prodotto viene preparato a partire da cellule mononucleate del sangue periferico del paziente, attivate con anticorpi anti-CD3 e CD28, trasdotte con un vettore lentivirale codificante per il CAR specifico di ide-cel e quindi espanse per un periodo di 10 giorni. Il CAR in questione è costituito da un dominio di riconoscimento formato da un frammento a singola catena (scFv) di un anticorpo capace di riconoscere in modo specifico BCMA, collegato alla porzione cerniera CD8 alfa e al dominio transmembrana, legato a sua volta al dominio co-stimolatorio 4-1BB e al dominio di segnalazione e attivazione delle cellule T CD3-zeta [figura 3].

Si suppone che le CAR T-cells ide-cel riconoscano il BCMA presente sulla superficie delle cellule mielomatose e si leghino ad esse, determinandone l'apoptosi.

Al congresso ASH 2018 sono stati presentati i risultati iniziali ottenuti con un prodotto simile, chiamato **bb21217**: CAR T-cells anti-BCMA di nuova generazione ottenute con la stessa piattaforma di ide-cel, ma apportando una variazione del

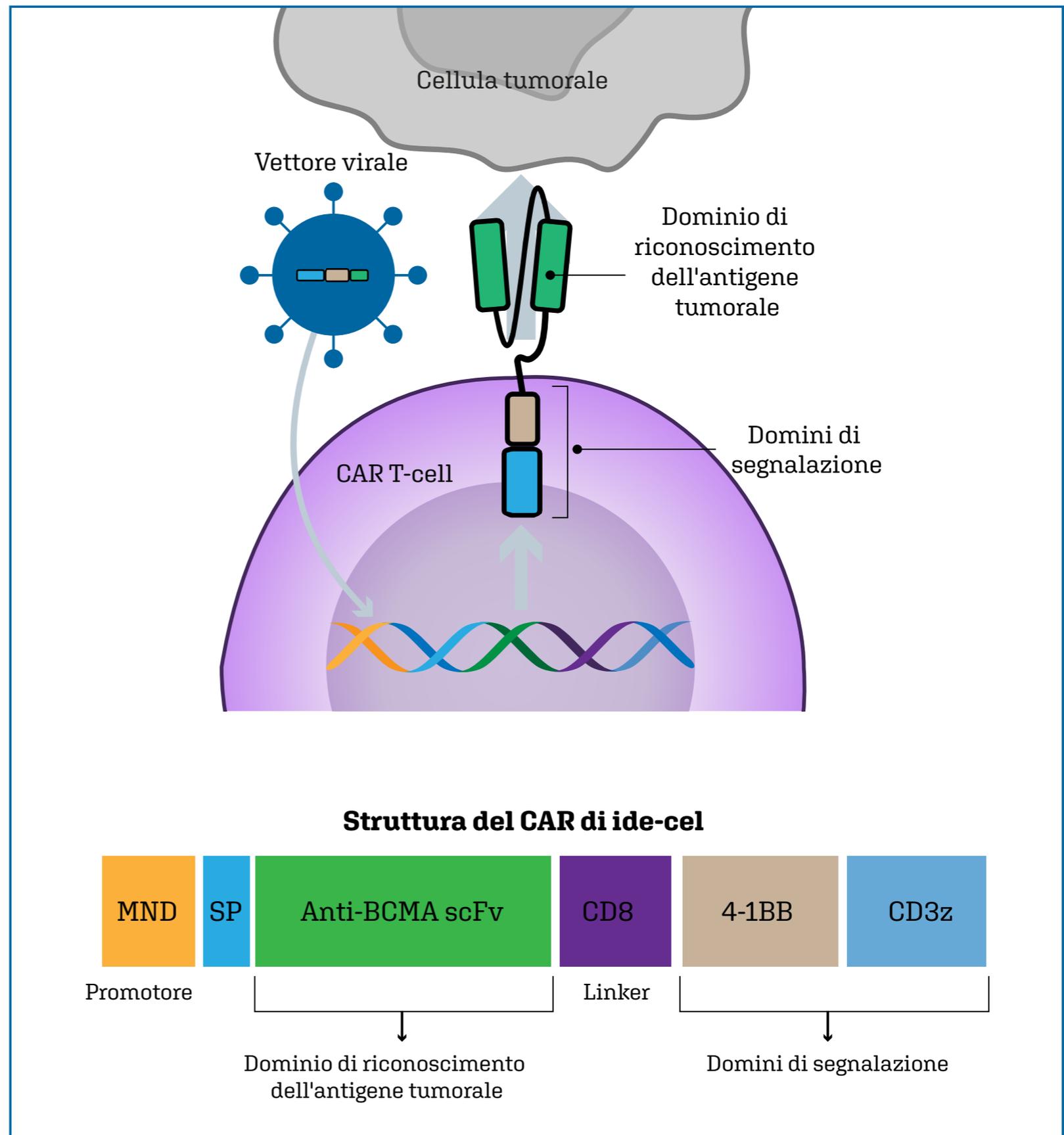


Figura 3. Struttura del CAR di ide-cel (bb2121).

processo di produzione finalizzata a migliorare la persistenza delle cellule e consistente nell'aggiunta di un inibitore dell'enzima PI3K, che si pensa favorisca la trasformazione delle cellule T verso un fenotipo 'memory-like'. Le evidenze suggeriscono, infatti, che cellule con questo fenotipo persistano e funzionino più a lungo delle altre CAR T-cells, garantendo una maggior durata dell'effetto antitumorale.

Status regolatorio di ide-cel

Nel novembre 2017, l'FDA ha concesso a ide-cel la designazione di terapia fortemente innovativa (*breakthrough therapy*) sulla base dei risultati della parte di *dose-escalation* dello studio CRB-401. L'agenzia dovrebbe esprimersi in merito alla possibile approvazione di ide-cel nella seconda metà del 2020.

I dati clinici su ide-cel e bb21217

Ide-cel

I dati più maturi attualmente disponibili su ide-cel sono quelli dello studio **CRB-401** (NCT02658929), un trial di fase 1 in aperto e in due parti, tuttora in corso, il cui obiettivo è valutare la sicurezza e l'efficacia preliminari di ide-cel in pazienti con mieloma multiplo ricaduto/refrattario già trattati con almeno tre linee di terapia, comprendenti un inibitore del proteasoma, un agente immunomodulante e un anticorpo monoclonale. La prima parte dello studio è una fase di *dose-escalation* nella quale i partecipanti sono stati trattati con dosi crescenti di ide-cel (50, 150, 450 e 800 milioni di CAR T-cells) per determinare la dose massima tollerata; la seconda parte è una fase di *dose-expansion* nella quale i pazienti sono stati trattati con ide-cel per valutare ulteriormente la sicurezza, la tollerabilità e l'attività clinica alle dosi raccomandate per la fase 2.

I primi dati dello studio erano stati presentati nel 2017 al congresso dell'ASCO e poi al congresso dell'ASH, dove avevano destato enorme interesse. Inizialmente, gli sperimentatori han-

no riportato un ORR del 94% nelle coorti trattate con le dosi attive di ide-cel e un'incidenza della CRS del 71%. I dati sono poi maturati ulteriormente e sono stati presentati nel giugno 2018 al congresso dell'ASCO, confermando le forti potenzialità di ide-cel nella popolazione studiata.

Presentando i risultati al meeting, la prima autrice dello studio, Noopur Raje, a capo del Center for Multiple Myeloma del Massachusetts General Hospital Cancer Center di Boston, ha detto che il trattamento con dosi attive di ide-cel (almeno 150 milioni di cellule) ha indotto risposte profonde e durature in pazienti con mieloma multiplo pesantemente pretrattati, che hanno risposto indipendentemente dal livello di espressione di BMCA.

Nella prima parte dello studio, di *dose-escalation*, gli sperimentatori hanno trattato 21 pazienti con ide-cel a dosi comprese fra 50 e 800 milioni di CAR T-cells. Nella fase successiva, di espansione della dose, altri 22 pazienti sono stati infusi con ide-cel a dosaggi compresi fra 150 e 450 milioni di CAR T-cells (le dosi attive). Prima dell'infusione, i partecipanti sono stati sottoposti a una linfodeplezione con fludarabina (30 mg/m²) e ciclofosfamide (300 mg/m²).

Per quanto riguarda i risultati di **efficacia**, nei pazienti trattati con una dose attiva di ide-cel:

- l'ORR è risultato del 95,5%, il tasso di risposta completa o risposta completa stringente del 50% e il tasso di risposta parziale molto buona del 36,4%;
- nei pazienti trattati con una dose pari a 450 milioni di CAR T-cells le risposte a ide-cel sono state osservate indipendentemente dai livelli di espressione di BCMA;
- per tutte le dosi attive si è osservata una relazione dose-risposta;
- la PFS mediana (riportata per la prima volta al congresso ASCO 2018) è risultata di 11,8 mesi;
- nei pazienti *responder* valutabili (16), tutti risultati MRD-ne-

gativi, la PFS mediana è risultata di 17,7 mesi;

- la DOR mediana è stata di 10,8 mesi.

I risultati di **sicurezza** sono apparsi rassicuranti e il trattamento è risultato gestibile e ben tollerato:

- l'incidenza della CRS è stata del 63%, ma solo in due casi (5%) è stata di grado 3 o superiore e comunque è risultata gestibile;
- la neurotossicità di grado ≥ 3 ha mostrato un'incidenza del 2% e nell'unico paziente che l'ha avuta di grado 4 si è risolta completamente;
- gli altri eventi avversi di grado ≥ 3 di interesse sono stati neutropenia (79%), trombocitopenia (51%) e anemia (44%);
- la maggior parte degli effetti avversi è risultata curabile e risolvibile in tempi rapidi;
- non si sono registrati casi di CRS di grado 4, né decessi dovuti a CRS o neurotossicità.

Il 2 maggio 2019 sono stati pubblicati sul New England Journal of Medicine i risultati chiave di efficacia e sicurezza delle coorti di *dose-escalation* e *dose-expansion* dello studio CRB-401 relativi ai primi 33 pazienti consecutivi trattati con ide-cel (di cui 21 trattati nella fase di *dose-escalation* dello studio e 12 nella fase di *dose-expansion*), con un follow-up minimo di almeno 6 mesi.

I partecipanti erano già stati sottoposti a una mediana di sette regimi anti-mieloma (range: 3-23), che comprendevano agenti immunomodulatori, inibitori del proteasoma e daratumumab nella maggioranza dei pazienti. Tutti tranne uno erano anche già stati sottoposti a un trapianto autologo di cellule staminali.

Per quanto riguarda l'**efficacia** (tabella 2 e figura 4), nei primi 33 pazienti trattati:

- l'ORR è risultato dell'85%, con un tasso di risposta completa del 45% e di risposta parziale molto buona del 27%;
- 16 pazienti sono risultati analizzabili per la stima della MRD

e tutti sono risultati MRD-negativi in uno o più momenti di valutazione;

- le risposte al trattamento si sono osservate precocemente, con un tempo mediano di raggiungimento della prima risposta parziale o migliore di 1 mese (range: 0,5-3 mesi);
- le risposte sono apparse durature, con una DOR mediana di 10,9 mesi;
- i pazienti che hanno risposto hanno mostrato un'espansione maggiore delle CAR T-cells;
- inoltre, le risposte si sono ottenute indipendentemente dai livelli di BCMA nel siero o nel tumore;
- la PFS mediana è risultata di 11,8 mesi.



Per quanto riguarda la **sicurezza**:

- viene riportata un'incidenza del 76% della CRS, nel 70% dei casi di grado ≤ 2 e nel 6% di grado 3, sempre risultata reversibile;
- l'incidenza della neurotossicità di qualsiasi grado è risultata del 42%, nel 39% dei casi di grado ≤ 2 e nel restante 3% (un paziente) di grado 4;
- gli eventi avversi più comuni di grado ≥ 3 sono state le tossicità ematologiche, tra cui la neutropenia (85%), la leucopenia (58%), l'anemia (45%) e la trombocitopenia (45%).
- si sono sviluppate infezioni nel 42% dei pazienti, di cui il 6% di grado 3, mentre non sono state registrate di grado 4.

Variable	50×10 ⁶ CAR+ T Cells (N=3)	150×10 ⁶ CAR+ T Cells (N=8)	450×10 ⁶ CAR+ T Cells		800×10 ⁶ CAR+ T Cells (N=3)	150×10 ⁶ – 800×10 ⁶ CAR+ T Cells (N=30)	50×10 ⁶ – 800×10 ⁶ CAR+ T Cells (N=33)
			<50% BCMA (N=8)†	≥50% BCMA (N=11)†			
Objective response‡							
No. of patients with a response	1	6	8	10	3	27	28
Rate — % (95% CI)	33 (1–91)	75 (35–97)	100 (63–100)	91 (59–100)	100 (29–100)	90 (74–98)	85 (68–95)
Best overall response — no. (%)							
Stringent complete response	0	5 (63)	3 (38)	4 (36)	0	12 (40)	12 (36)
Complete response	0	0	0	1 (9)	2 (67)	3 (10)	3 (9)
Very good partial response	0	0	4 (50)	4 (36)	1 (33)	9 (30)	9 (27)
Partial response	1 (33)	1 (12)	1 (12)	1 (9)	0	3 (10)	4 (12)
Stable disease	2 (67)	1 (12)	0	1 (9)	0	2 (7)	4 (12)
Progressive disease	0	1 (12)	0	0	0	1 (3)	1 (3)
Median duration of response (95% CI) — mo	1.9 (NE–NE)	NE	7.7 (5.3–14.8)		12.9 (10.9–12.9)	10.9 (7.2–NE)	10.9 (7.2–NE)
Negativity for MRD§							
No. of patients with a response who could be evaluated for MRD	0	4	11		1	16	16
Rate — %	0	100	100		100	100	100

* All responses were confirmed and assessed according to the International Myeloma Working Group Uniform Response Criteria for Multiple Myeloma (details on the criteria for disease response are provided in the Supplementary Appendix). Percentages may not total 100 because of rounding. MRD denotes minimal residual disease, and NE could not be estimated.

† Data are for BCMA expression on bone marrow plasma cells at screening.

‡ An objective response was defined as a partial response or better.

§ Negativity for MRD was defined by a sensitivity level of at least 10⁻⁴ nucleated cells on the next-generation sequencing assay clonoSEQ (Adaptive Biotechnologies); 15 patients were MRD-negative at 10⁻⁵ (indeterminate, 1 patient), and 3 were MRD-negative at 10⁻⁶ (indeterminate, 10 patients). A total of 12 of the 16 patients who had a response and were MRD-negative had at least two MRD-negative assessments. Reasons that MRD could not be evaluated were an inability to detect the malignant clone in the baseline bone marrow aspirate, which made follow-up evaluation impossible (in 7 patients), failure of the MRD result in quality-control testing (in 2 patients), and nonreceipt of the bone marrow aspirate sample (in 6 patients).

Tabella 2. Risposta del tumore in base alla dose di CAR T-cells CAR-positive nello studio CRB-401.

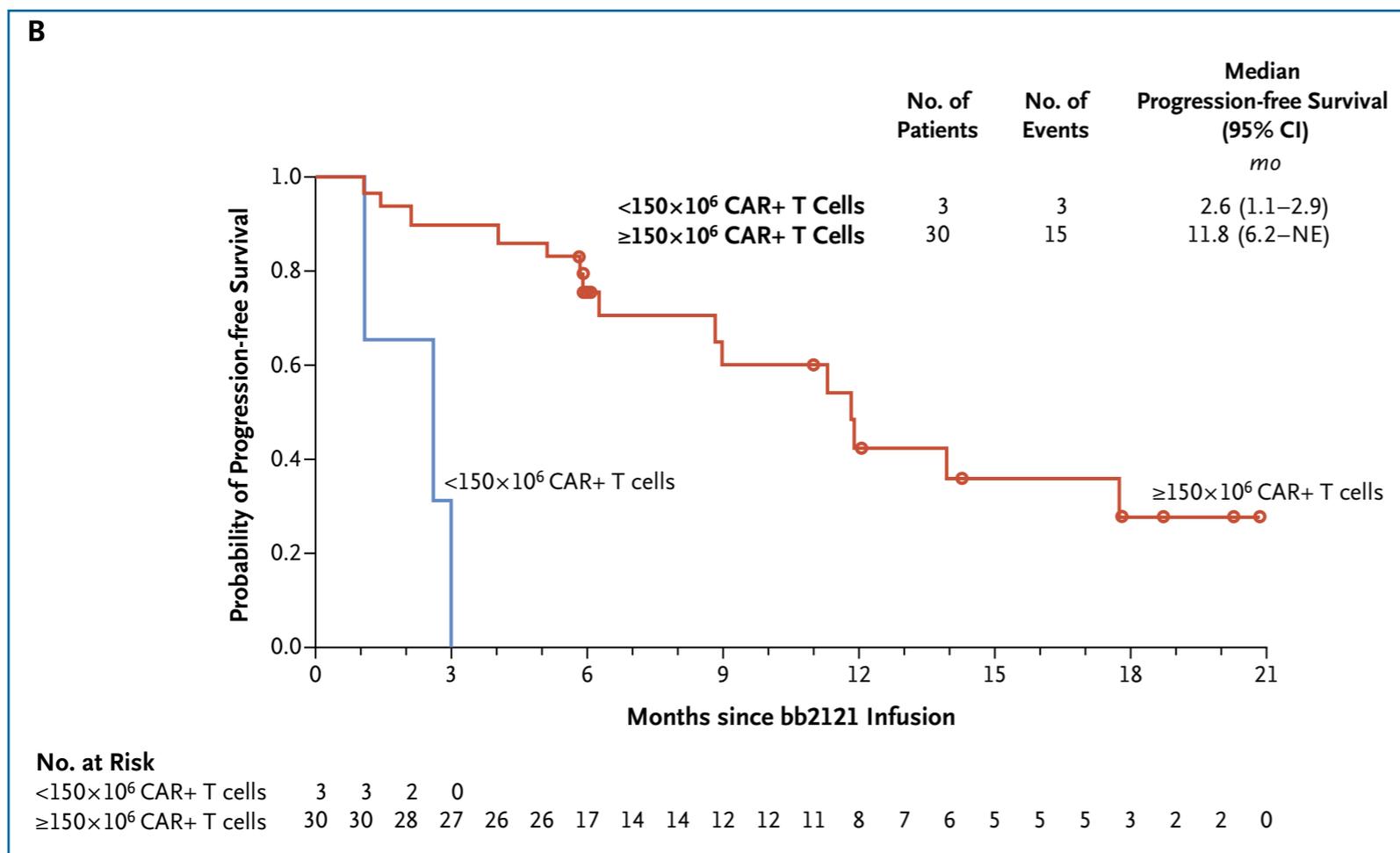


Figura 4. Curve di PFS dei pazienti trattati con ide-cel nello studio CRB-401.

Il picco di espansione delle CAR T-cells è risultato più alto nei pazienti che hanno sviluppato una CRS e le cellule sono rimaste rilevabili 6 mesi dopo l'infusione nel 57% dei pazienti.

bb21217

Al congresso ASH 2018 sono stati presentati i risultati preliminari dello studio multicentrico di fase 1 **CRB-402** (NCT03274219), relativi a 12 pazienti con mieloma multiplo ricaduto/refrattario altamente pretrattati (con una mediana di sette trattamenti precedenti), ai quali sono state somministrate le CAR T-cells anti-BMCA di nuova generazione bb21217, che rappresentano una versione migliorata di ide-cel, in modo da avere un arricchimento di cellule T con un fenotipo 'memory-like', al fine di migliorarne la persistenza, che è ritenuta uno dei fattori determinanti per la durata della risposta.

Questi primi pazienti, dopo la consueta linfo-deplezione con fludarabina e ciclofosfamida, sono stati sottoposti a un'infusione di bb21217, alla dose di 150 milioni di cellule. Il protocollo del trial, tuttora in corso, prevede tuttavia uno schema di aumento del dosaggio 3 + 3, dove 150 milioni di cellule è la dose iniziale e 800 milioni di cellule la dose più alta che sarà utilizzata.

I risultati sono incoraggianti. Presentando i dati al congresso, Nina Shah, dell'Università della California di San Francisco, ha detto che il trattamento con il primo livello di dose testato ha mostrato una promettente e rapida attività clinica, le risposte ottenute si sono approfondite nel tempo e si sono raggiunte remissioni complete fino a 10 mesi dopo l'infusione.

Dopo l'infusione si è osservata una robusta espansione delle cellule T CAR-positivo, risultata indipendente dal carico tumorale, e le cellule T sono rimaste rilevabili per 9 mesi dopo il trattamento.

Per quanto riguarda l'**efficacia**:

- l'ORR è risultato dell'83,3%, il tasso di remissione completa o remissione completa stringente del 25% e il tasso di risposta parziale molto buona o migliore del 75%;
- il tempo di raggiungimento della prima risposta e della migliore risposta è stato in entrambi i casi di un mese;
- tutti i pazienti che hanno risposto, tranne uno, sono ancora in remissione e il primo paziente trattato continua a esserlo, a più di un anno dall'infusione;

- tutti e quattro i pazienti che hanno risposto nei quali si è potuta valutare l'MRD sono risultati MRD-negativi, mentre tutti e due i *non responder* valutabili sono risultati MRD-positivi.

Per quanto riguarda la **sicurezza**, la Shah ha riferito che il profilo di sicurezza di bb21217 osservato finora sembra essere coerente con le tossicità già note delle terapie con CAR T-cells:

- la CRS si è manifestata nel 67% dei pazienti, ma nella maggior parte dei casi è stata di grado 1 o 2 (solo un caso di grado 3 e nessuno di grado 4);
- il 25% dei pazienti ha sviluppato neurotossicità;
- nell'83% dei pazienti si è sviluppata neutropenia (risoltasi in tutti i casi tranne uno entro il giorno 65) nel 50% trombocitopenia (nella maggior parte dei casi risoltasi entro il giorno 32),
- complessivamente, quattro pazienti hanno manifestato uno o più eventi avversi gravi, ma non vi sono stati decessi;
- inoltre, non si è riscontrata alcuna tossicità dose-limitante.

Nina Shah ha spiegato che servono ora un follow-up più lungo e un maggior numero di pazienti arruolati per valutare la DOR alla dose attuale, così come la sicurezza e l'attività di dosi più alte di bb21217.



Ulteriori sviluppi di ide-cel

Al di là dello studio CRB-401, ide-cel è attualmente in sperimentazione in tre studi clinici.

Incoraggiate dai risultati molto promettenti di questo studio, Celgene e Bluebird Bio hanno avviato nel 2017 uno studio interazionale di fase 2, chiamato **KarMMA** (NCT03361748), che sta attualmente arruolando i pazienti e servirà come base per la richiesta di approvazione di ide-cel alle autorità regolatorie. L'obiettivo è di includere 150 pazienti con mieloma multiplo r/r e l'endpoint primario del trial, che dovrebbe concludersi nel novembre 2023, è l'ORR.

È partito poi nell'estate 2018 lo studio **KarMMA 2** (NCT03601078), anch'esso uno studio multicentrico registrativo di fase 2. Il trial, in aperto e multicorte, punta a valutare in modo più approfondito ide-cel in pazienti con mieloma multiplo r/r e pazienti con mieloma multiplo ad alto rischio. Dovrebbero partecipare al trial, il cui completamento è previsto nel 2025, circa 180 pazienti.

Inoltre, è già iniziato lo studio di fase 3 **KarMMA 3** (NCT03651128), un trial nel quale si confrontano efficacia e sicurezza di ide-cel rispetto alle triplette standard in pazienti con mieloma multiplo recidivato/refrattario, ma pretrattati meno pesantemente rispetto a quelli valutati nello studio CRB-401 (almeno due linee di trattamento, ma non più di quattro).

Presentando i dati di CRB-401 all'ASCO, Noopur Raje ha detto che, avendo ottenuto la *proof-of-concept* dell'efficacia di ide-cel in pazienti con malattia estremamente avanzata, sono ora previsti ulteriori trial su pazienti in setting più precoci. In più, i ricercatori stanno cercando di indentificare possibili fattori predittivi di risposta e biomarcatori per predire la tossicità, capire chi siano i pazienti che progrediscono e quali siano i meccanismi alla base di tali progressioni.

Bibliografia

- [1] J.S. Abramson, et al. High Durable CR Rates in Relapsed/Refractory (R/R) Aggressive B-NHL Treated with the CD19-Directed CAR T Cell Product JCAR017 (TRANSCEND NHL 001): Defined Composition Allows for Dose-Finding and Definition of Pivotal Cohort. *Blood* (2017) 130 (Supplement 1): 581. https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.581.581
- [2] J.S. Abramson, et al. Updated safety and long term clinical outcomes in TRANSCEND NHL 001, pivotal trial of lisocabtagene maraleucel (JCAR017) in R/R aggressive NHL. *J Clin Oncol* 36, 2018 (suppl; abstr 7505). http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.7505
- [3] J.S. Abramson, et al. Lisocabtagene maraleucel (liso-cel) treatment of patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) and secondary CNS lymphoma: Initial results from TRANSCEND NHL 001. *J Clin Oncol* 37, 2019 (suppl; abstr 7515). https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.7515
- [4] M. Wang, et al. Safety and preliminary efficacy in patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) mantle cell lymphoma (MCL) receiving lisocabtagene maraleucel (Liso-cel) in TRANSCEND NHL 001. *J Clin Oncol* 37, 2019 (suppl; abstr 7516). https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.7516
- [5] T. Siddiqi, et al. Rapid MRD-negative responses in patients with relapsed/refractory CLL treated with liso-cel, a CD19-directed CAR T-cell product: preliminary results from TRANSCEND CLL 004, a phase 1/2 study including patients with high-risk disease previously treated with ibrutinib. *Blood* (2018) 132 (Supplement 1): 300. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110462>
- [6] T. Siddiqi, et al. TRANSCEND CLL 004: Minimal residual disease (MRD) negative responses after lisocabtagene maraleucel (Liso-Cel; JCAR017), a CD19-directed CAR T cell product, in patients (pts) with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL). *J Clin Oncol* 37, 2019 (suppl; abstr 7501). https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.7501
- [7] K.M. Friedman, et al. Effective Targeting of Multiple B-Cell Maturation Antigen-Expressing Hematological Malignancies by Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Hum Gene Ther*. 2018;29(5):585-601. doi: 10.1089/hum.2018.001.
- [8] N.S. Raje, et al. bb2121 anti-BCMA CAR T-cell therapy in patients with relapsed/refractory multiple myeloma: Updated results from a multicenter phase I study. *J Clin Oncol*. 2018;36 (suppl; abstr 8007). https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.8007
- [9] N.S. Raje, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New Engl J Med*. 2019;380:1726-37; doi:10.1056/NEJMoa1817226.
- [10] N. Shah, et al. Initial Results from a Phase 1 Clinical Study of bb21217, a Next-Generation Anti Bcma CAR T Therapy. *Blood* (2018) 132 (Supplement 1): 488. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-116953>

Intervista a Francesca Russo

Direttore medico di Celgene

Come procede lo sviluppo clinico di liso-cel a livello mondiale?

Celgene sta attualmente lavorando su un ampio portfolio di terapie cellulari e le sue CAR T-cells, oltre a essere in fase di sperimentazione in studi clinici registrativi per il trattamento di diverse patologie, sono al vaglio dei ricercatori anche in un numero crescente di studi clinici in fase iniziale. I due prodotti in fase più avanzata di sviluppo sono liso-cel e ide-cel.

Liso-cel è un prodotto sperimentale a base di CAR T-cells anti-CD19 attualmente valutato in svariati studi clinici, primo fra tutti lo studio registrativo di fase 1 TRANSCEND-NHL-001, nel quale si valuta il prodotto come trattamento per i pazienti con linfoma non-Hodgkin a cellule B recidivante/refrattario.

TRANSCEND NHL-006 è, invece, uno studio multicentrico di fase 2, in aperto, nel quale si testa liso-cel nel trattamento del linfoma non-Hodgkin a cellule B recidivante/refrattario in pazienti non eleggibili al trapianto di cellule staminali ematopoietiche ed è condotto solo negli Stati Uniti.

È inoltre in corso lo studio TRANSCENDWORLD JCAR017 BCM-001, volto a determinare efficacia e sicurezza di liso-cel in soggetti adulti con linfoma non-Hodgkin a cellule B di tipo aggressivo. Il trial è condotto in Austria, Belgio, Finlandia, Francia, Germania, Italia, Giappone, Paesi Bassi, Spagna, Svizzera e Regno Unito.

Il prodotto è già arrivato alla fase 3 con lo studio TRANSFORM, un trial in aperto di confronto tra liso-cel e lo standard di cura per il trattamento del linfoma non-Hodgkin a cellule B recidivante/refrattario. A questa sperimentazione partecipano centri di Stati Uniti, Belgio, Canada, Francia, Germania, Italia,



Giappone, Paesi Bassi, Spagna, Svezia, Svizzera e Regno Unito. Un altro studio in corso è PLATFORM, un trial esplorativo condotto solo negli Stati Uniti, avente come obiettivo la valutazione della sicurezza e dell'efficacia di liso-cel somministrato in combinazione con altre terapie (durvalumab e CC-122) in soggetti con neoplasie a cellule B recidivanti/refrattarie.

Infine, si sta sviluppando liso-cel anche come trattamento per la leucemia linfatica cronica e il linfoma linfocitico a piccole cellule recidivanti/refrattari nello studio multicentrico di fase 1/2 TRANSCEND CLL-004. Il trial comprende pazienti con malattia ad alto rischio in base al profilo citogenetico, precedentemente trattati con ibrutinib, ed è condotto solo negli Stati Uniti.

Come procede lo sviluppo clinico di ide-cel a livello mondiale?

Ide-cel, una terapia sperimentale con CAR T-cells anti-BCMA, nata dalla collaborazione con Bluebird Bio, è attualmente in via di sviluppo in tre studi clinici: KarMMa, KarMMa 2 e KarMMa 3. KarMMa è uno studio multicentrico registrativo di fase 2, in aperto, a braccio singolo, in cui si valutano efficacia e sicurezza di ide-cel in pazienti con mieloma multiplo recidivante o refrattario. Il trial è attualmente condotto in 20 centri, 9 dei quali negli Stati Uniti, 10 nell'Unione europea e uno in Canada. KarMMa 2 è uno studio registrativo di fase 2, in aperto, a braccio singolo, condotto in America del Nord e in Europa. Lo studio è attualmente in fase di reclutamento e mira a valutare ulteriormente ide-cel in pazienti con mieloma multiplo recidivante/refrattario.

Infine, KarMMa3 è uno studio multicentrico di fase 3, randomizzato, in aperto, che confronta l'efficacia e la sicurezza di ide-cel rispetto alle triplette standard in pazienti con mieloma multiplo recidivante/refrattario.

Qual è la tecnologia utilizzata per produrre liso-cel e ide-cel?

Liso-cel è una terapia cellulare sperimentale che utilizza linfociti T ingegnerizzati in laboratorio e armati con CAR diretti contro l'antigene CD19, una glicoproteina di superficie espressa durante lo sviluppo delle cellule B normali, che viene mantenuta anche dopo la loro trasformazione maligna. Le CAR-T-cells liso-cel mirano la propria azione contro le cellule del linfoma non-Hodgkin per eliminarle, grazie all'espressione di un CAR costituito principalmente da un dominio extracellulare che riconosce in modo specifico CD19, il dominio co-stimolatorio 4-1BB, ritenuto in grado di aumentare la proliferazione e la persistenza dei linfociti T, e il dominio di attivazione delle cellule T CD3-zeta.

Ide-cel, invece, utilizza linfociti T ingegnerizzati in modo da esprimere l'antigene BCMA, espresso sulla superficie delle plasmacellule normali e tumorali. Il CAR di ide-cel è costituito da un dominio di riconoscimento del BCMA, il dominio co-stimolatorio 4-1BB e il dominio di attivazione delle cellule T CD3zeta.

Avete una struttura CAR T dedicata in Italia? Se sì, come è organizzata?

Celgene Italia sta creando un team per le CAR T-cells con l'obiettivo di mettere a disposizione dei pazienti queste terapie innovative. La necessità di avere nuove competenze e un approccio che si differenzi da quello tradizionale, richiede la progettazione di nuovi ruoli per la gestione di quest'area. Il team continuerà a crescere per supportare la commercializzazione delle future terapie a base di CAR T-cells.

Dove saranno prodotte le CAR T-cells di Celgene destinate ai pazienti italiani?

Celgene sta stanziando ingenti risorse per garantire processi produttivi di elevata qualità e idonei sistemi di controllo della qualità della terapia cellulare con CAR T-cells in tutti i suoi moderni impianti produttivi, con l'obiettivo di ridurre i tempi necessari per la consegna della terapia ai pazienti. Inoltre, sta ampliando la capacità produttiva di queste terapie sperimentali altamente innovative. Allo stato attuale, sono operativi due siti produttivi negli Stati Uniti, uno nello stato di Washington e l'altro nel New Jersey, ma l'azienda sta valutando la possibilità di aumentare la capacità produttiva al di fuori degli Usa. In Italia, Celgene sta investendo ingenti somme nelle terapie a base di CAR T-cells, promuovendo collaborazioni locali e studi clinici per tutti i pazienti idonei a questo trattamento.

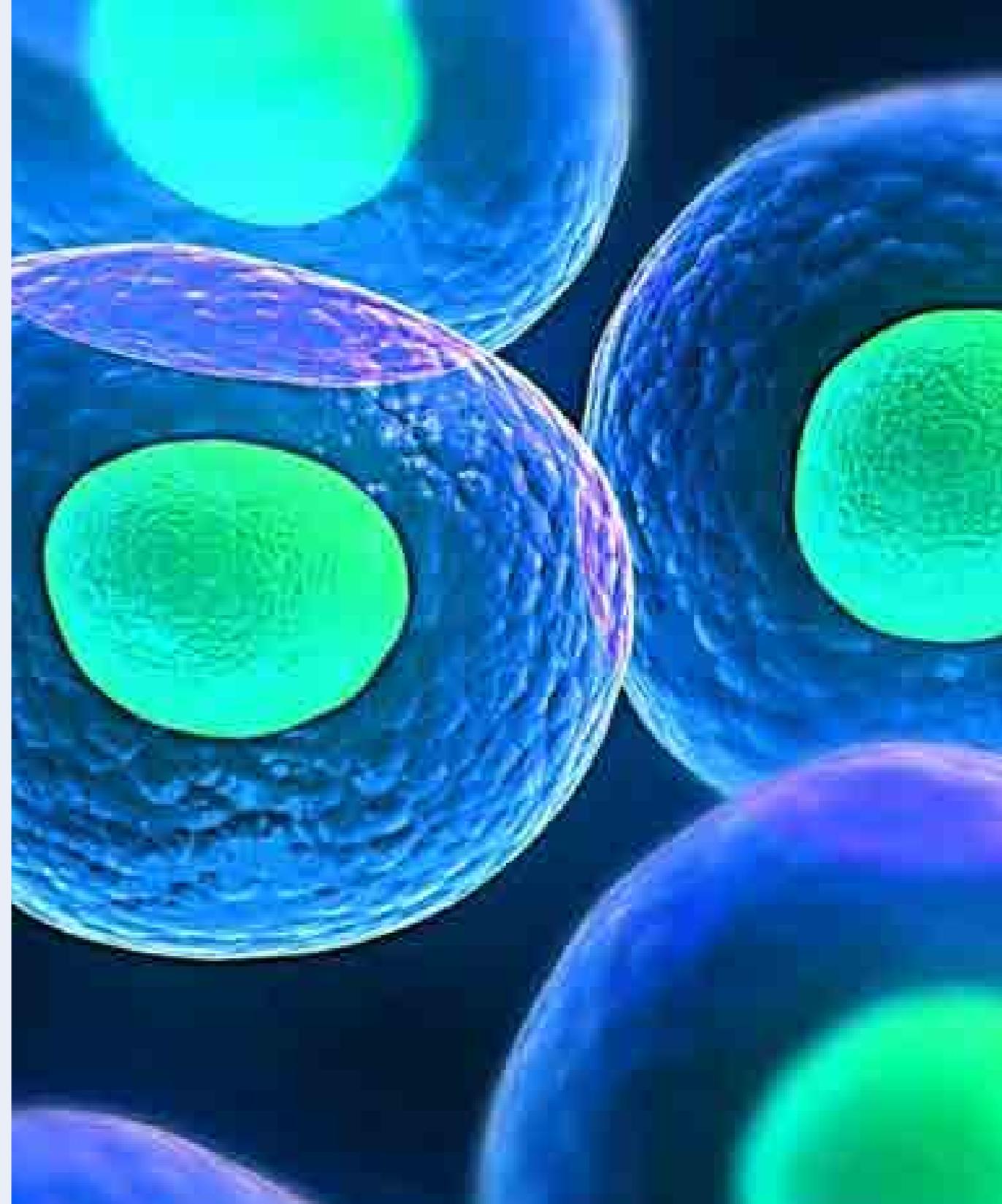
Oltre a liso-cel e ide-cel, avete nella vostra pipeline altre terapie con CAR T-cells? Se sì, in cosa differiscono dalle terapie precedenti?

Oltre ai programmi principali, Celgene sta valutando altri candidati farmaci che si trovano attualmente nella fase iniziale di sviluppo, tra cui bb21217 e JCARH125, entrambi per il trattamento del mieloma multiplo.

bb21217 è attualmente in fase di sperimentazione nello studio di fase 1 CRB-402, un trial in aperto condotto da Bluebird Bio in alcuni centri situati negli Stati Uniti. bb21217 è un prodotto a base di CAR T-cells anti-BCMA di ultima generazione, in fase di valutazione in pazienti con mieloma multiplo recidivante/refrattario sottoposti ad almeno tre precedenti terapie, comprendenti un inibitore del proteasoma e un immunomodulatore, o con mieloma multiplo doppio refrattario.

JCARH125 è un prodotto sviluppato inizialmente da Juno e costituito da CAR T-cells anti-BMCA prodotte attraverso un processo sviluppato in modo da ottimizzare vari aspetti, tra cui un arricchimento della percentuale di cellule T della memoria. Il trattamento è attualmente in fase di sperimentazione nello studio di fase 1/2 EVOLVE.

Inoltre, sono in fase di studio ulteriori terapie cellulari per far fronte a esigenze mediche non ancora soddisfatte nei tumori solidi, tra cui il carcinoma mammario, il carcinoma ovarico e il tumore cerebrale.



JnJ-4528, le CAR T-cells di Janssen

Anche Janssen (che fa parte del gruppo Johnson & Johnson) è entrata ormai a pieno titolo nel settore delle CAR T-cells. Nel dicembre 2017, infatti, l'azienda ha siglato un accordo con la cinese Legend Biotech per collaborare a livello mondiale allo sviluppo e alla commercializzazione (in caso di approvazione) di un prodotto a base di CAR T-cells anti-BCMA, sviluppate in origine da Legend e note con la sigla LCAR-B38M o JnJ-4528, per il trattamento del mieloma multiplo recidivato o refrattario.

Che cos'è JnJ-4528

Le CAR T-cells JnJ-4528 vengono prodotte trasducendo con un vettore lentivirale le cellule T del paziente, in modo da inserirvi il gene del CAR distintivo di questa terapia, che è diretto contro l'antigene BCMA. Il dominio co-stimolatorio è 4-1BB e il dominio di attivazione è CD3 zeta, ma la caratteristica peculiare di questo CAR è rappresentata dalla porzione extracellulare, che contiene non uno solo, bensì due domini di riconoscimento diretti contro altrettanti epitopi specifici del BCMA (**figura 1**). Il CAR di JnJ-4528 è, quindi, un CAR in grado di legarsi a due diversi epitopi della molecola target BCMA, proprietà che gli conferisce un'alta affinità di legame con l'antigene bersaglio. Inoltre, si pensa che questa prerogativa (da non confondere con il cosiddetto 'dual targeting', cioè la capacità di legarsi a due antigeni diversi contemporaneamente) potrebbe offrire un vantaggio nell'evitare lo sviluppo di una resistenza al trattamento legata alla cosiddetta 'fuga antigenica': dato che i siti di attacco del CAR al BCMA sono due, infatti, nel caso uno dei due andasse incontro a mutazione le CAR T-cells potrebbero legarsi comunque all'antigene riconoscendo il sito (epitopo) non mutato; quest'ipotesi, tuttavia, necessita ancora di una dimostrazione conclusiva.

Status regolatorio

Il 3 aprile 2019 Janssen ha annunciato che l'Ema ha concesso al prodotto la designazione PRIME, che prevede un iter regolatorio accelerato. La decisione si basa sui risultati dello studio di fase 1/2 LEGEND-2 (NCT03090659, sponsorizzato da Legend Biotech) e dello studio di fase 1b/2 CARTITUDE-1 (NCT03548207, sponsorizzato da Janssen e attualmente condotto in collaborazione con Legend Biotech USA negli Stati Uniti e in Europa). I risultati dello studio LEGEND-2 sono stati presentati una prima volta al congresso dell'ASCO nel 2017 e poi al congresso dell'ASH nel 2018, mentre quelli dello studio CARTITUDE-1 non sono mai stati comunicati fino ad ora.

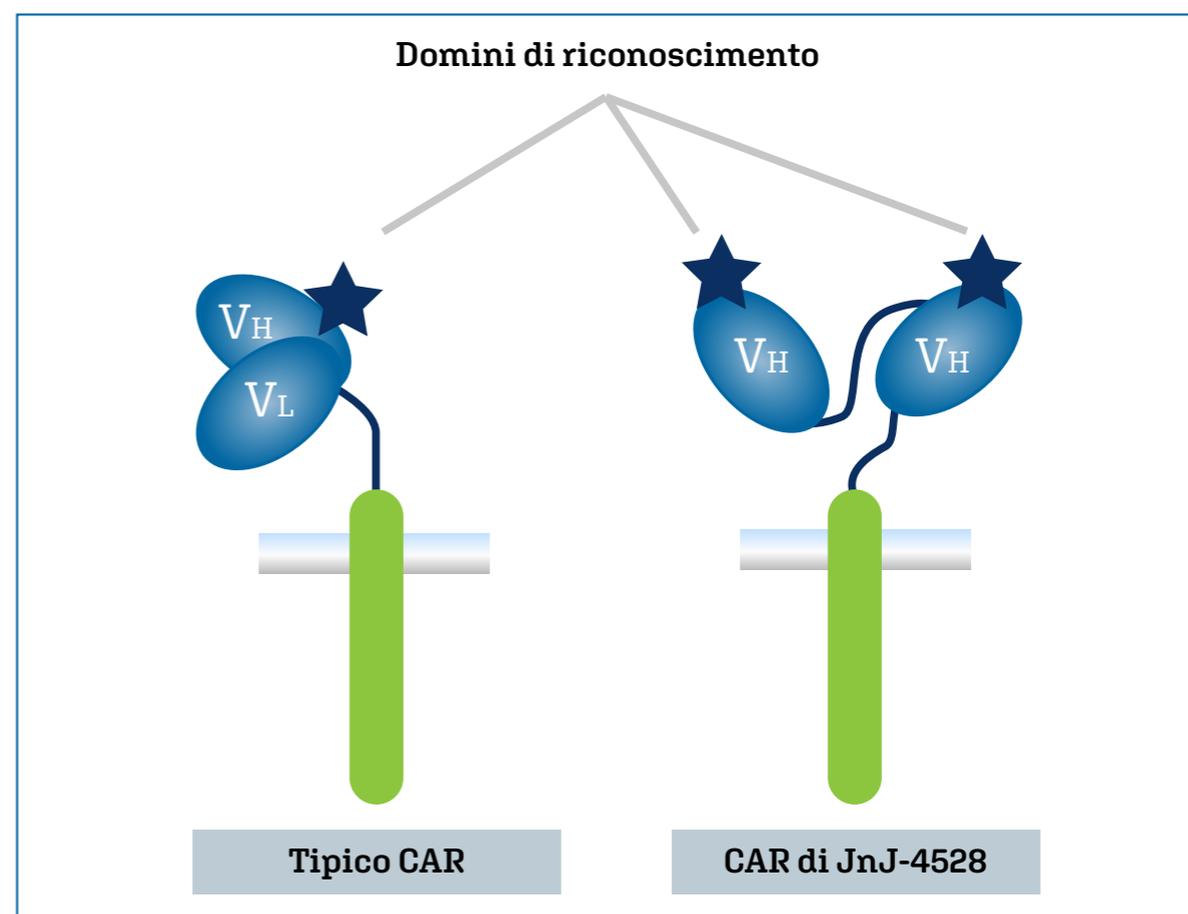


Figura 1. Il CAR di JnJ-4528.

I dati clinici

I dati finora disponibili, dunque, sono quelli dello studio **LEGEND-2**, un trial multicentrico di fase 1/2 in aperto e a singolo braccio, il primo sull'uomo, tuttora in corso, al quale stanno partecipando quattro centri cinesi. I primi risultati presentati al congresso dell'ASCO e a quello dell'EHA nel 2017 hanno destato grande interesse; all'ASH 2018 è stato portato un aggiornamento relativo a 57 pazienti sottoposti all'infusione presso uno dei quattro centri e seguiti per una mediana di 12 mesi.

I dati hanno fornito la prova di concetto che le CAR T-cells LCAR-B38M/JnJ-4528 possono rappresentare un trattamento efficace per il mieloma multiplo recidivato/refrattario. La terapia ha indotto nei pazienti risposte profonde e durature e ha mostrato un profilo di sicurezza gestibile, in linea con il suo meccanismo d'azione.

I partecipanti avevano un'età mediana di 54 anni (range: 18-80) ed erano ricaduti dopo una mediana di tre precedenti terapie (range: 1-9), comprendenti sia un inibitore del proteasoma sia un immunomodulatore.

Dopo essere stati sottoposti a un trattamento di linfodeplezione con tre dosi di ciclofosfamide 300 mg/m² nei giorni -5, -4 e -3, i pazienti sono stati trattati con le CAR T-cells LCAR-B38M/JnJ-4528, somministrate a una dose mediana pari a 0,5 x 10⁶ cellule/kg, suddivisa in tre infusioni (20, 30 e 50% della dose totale).

Per quanto riguarda i risultati di **efficacia**:

- l'ORR è risultato dell'88%, con un tasso di risposta completa/risposta completa stringente del 74%, un tasso di risposta parziale molto buona del 3% e un tasso di risposta parziale dell'11% (**figura 2**);
- il 68% dei pazienti (39 dei 42 in risposta completa) ha raggiunto la negativizzazione dell'MRD nel midollo osseo.
- non è emersa una chiara relazione tra dose e risposta e l'e-

spressione di BMCA non è risultata correlata con la risposta clinica;

- la durata mediana della risposta è risultata di 16 mesi;
- la PFS mediana è risultata di 15 mesi nell'intera popolazione studiata e di 24 mesi nel gruppo che ha raggiunto l'MRD-negatività (**figura 3**);
- l'OS mediana non è ancora stata raggiunta e il 75% dei pazienti era vivo a 12 mesi dall'infusione;

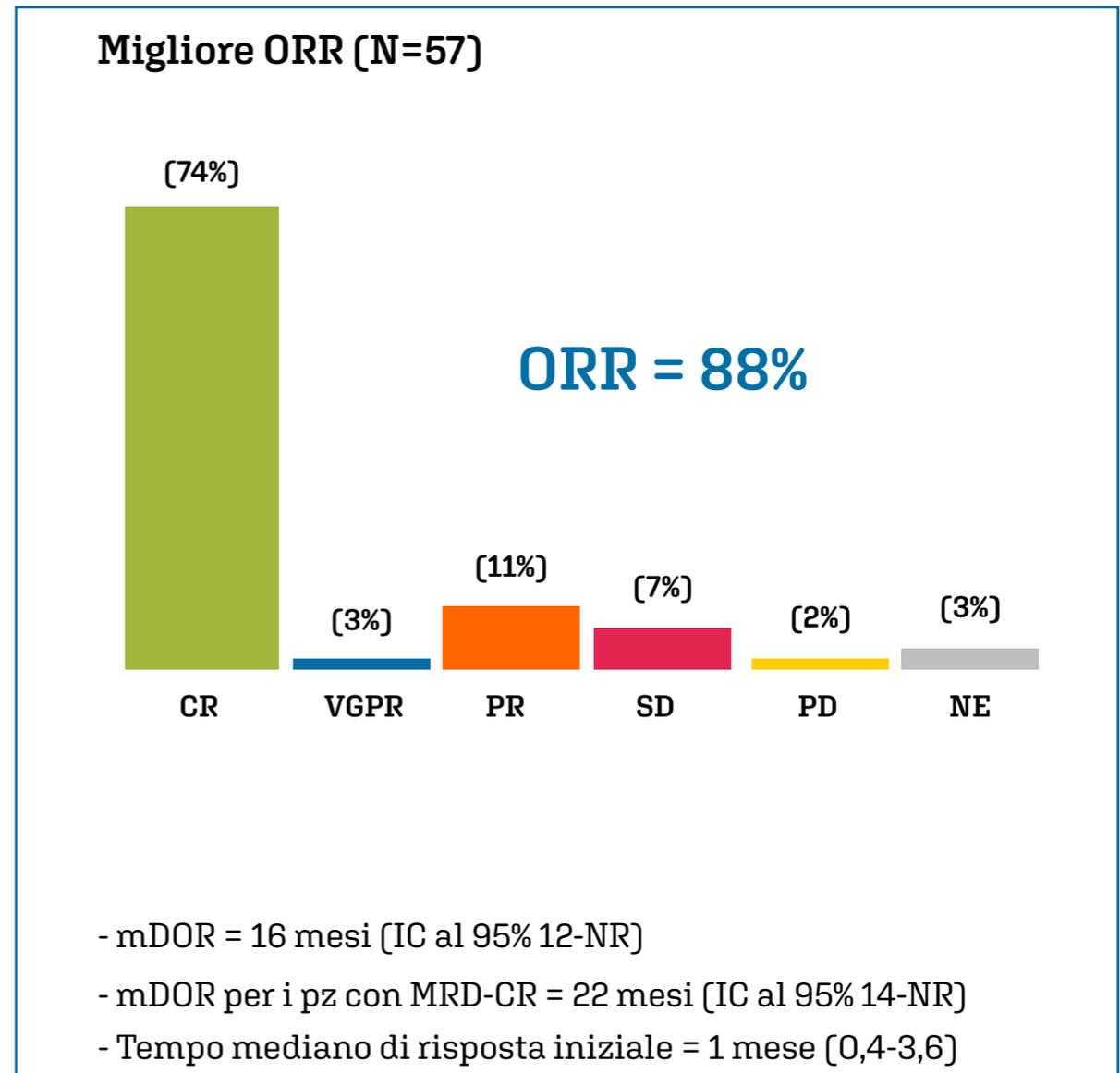


Figura 2. Risultati di ORR dello studio LEGEND-2 presentati al congresso ASH 2018. ORR: tasso di risposta complessiva; VGPR: risposta parziale molto buona; PR: risposta parziale; SD: stabilizzazione della malattia; PD: progressione della malattia; NE: non valutabili; mDOR: durata della risposta mediana; MRD-CR: risposta completa con MRD negativa

- il gruppo che non ha raggiunto l'MRD-negatività ha ottenuto risultati decisamente meno favorevoli: una PFS mediana pari a soli 6 mesi e un'OS mediana di 8 mesi.

Sul fronte della **sicurezza**:

- il 90% dei pazienti ha sviluppato una CRS, ma solo nel 7% dei casi è stata di grado 3 e non ci sono stati casi di grado 4; il tempo mediano di esordio della sindrome è risultato di 9 giorni e tutti i casi, tranne uno, si sono risolti, nel giro di una mediana di 9 giorni;
- un solo paziente ha sviluppato neurotossicità, di grado 1;
- al di là della CRS, gli eventi avversi più comuni sono stati piressia (91%), trombocitopenia (49%) e leucopenia (47%);
- gli eventi avversi più comuni di grado ≥ 3 (65%) sono stati leucopenia (30%), trombocitopenia (23%) e aumento dell'aspartato aminotransferasi (21%).

Nella maggior parte dei pazienti con campioni ematici analizzabili, gli sperimentatori hanno osservato livelli di picco di LCAR-B38M/JnJ-4528 ($\geq 1 \times 10^4$ copie/ μg di DNA genomico). Inoltre, nel 71% dei pazienti le CAR T-cells non erano più rilevabili nel sangue 4 mesi dopo l'infusione, mentre in cinque casi hanno mostrato di persistere fino a 10 mesi.

Ulteriori sviluppi

Oltre che nello studio LEGEND-2, le CAR T-cells JnJ-4528 sono attualmente al vaglio degli sperimentatori nello studio multicentrico di fase 1b/2 **CARTITUDE-1**, un trial in aperto per il quale è già partito l'arruolamento in oltre 30 centri statunitensi ed europei, e che dovrebbe coinvolgere circa 110 pazienti. I partecipanti sono pazienti con mieloma multiplo trattati in precedenza con almeno tre regimi, comprendenti un inibitore

del proteasoma, un immunomodulatore e un anticorpo anti-CD38, e progrediti entro 12 mesi dall'inizio del trattamento più recente, o doppiamente refrattari a un immunomodulatore e un inibitore del proteasoma. L'obiettivo principale della fase 1b è caratterizzare ulteriormente la sicurezza del prodotto, mentre quello della fase 2 è l'ORR, valutato in base ai criteri dell'International Myeloma Working Group. Il trial dovrebbe concludersi nel settembre 2021.

In Cina, inoltre, è in corso ed è già in fase di arruola-

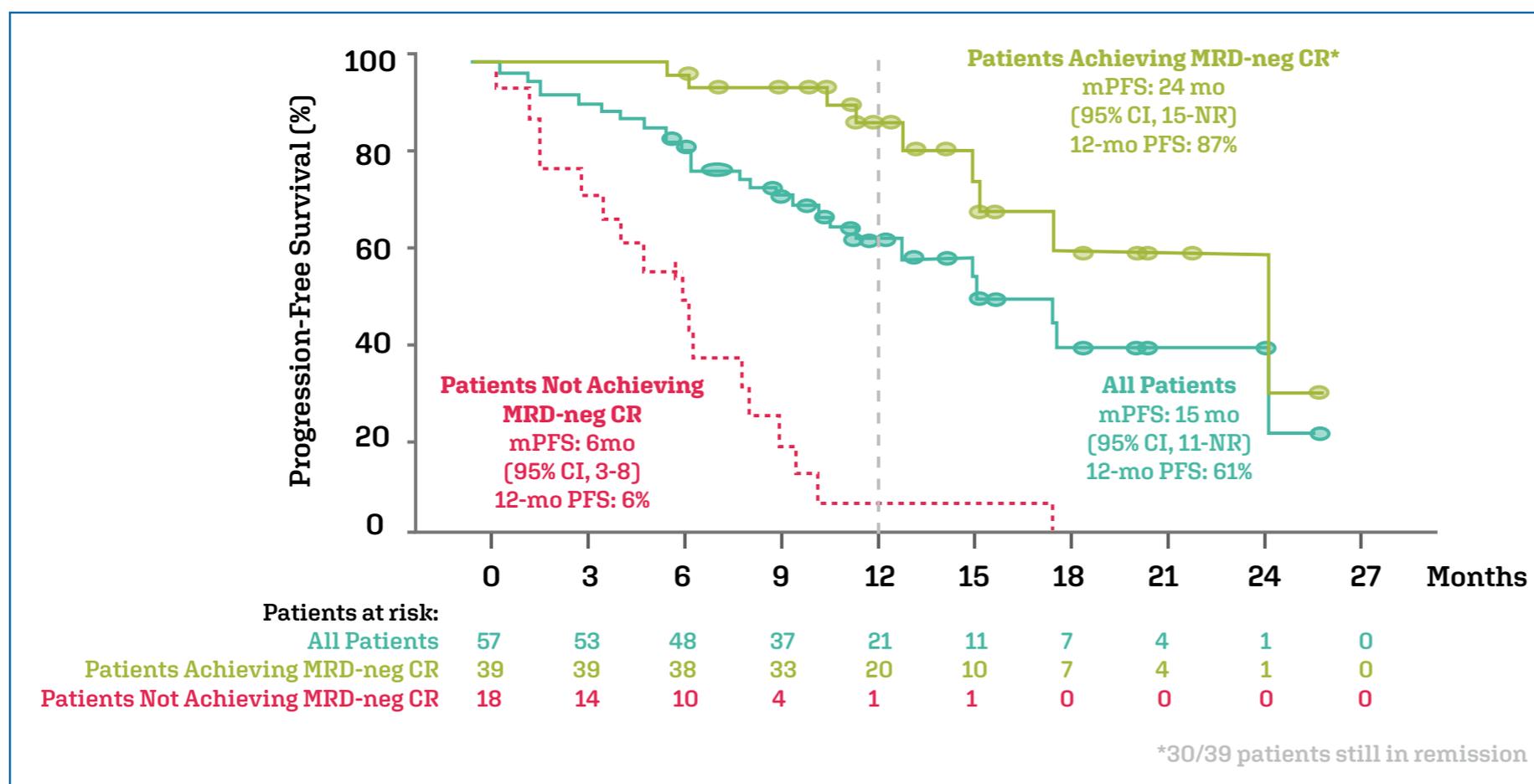


Figura 3. Curve di PFS dello studio LEGEND-2 presentate al congresso ASH 2018.

mento attivo lo studio confermativo di fase 2 **CARTIFAN-1** (NCT03758417), un trial multicentrico in aperto e a singolo braccio, sponsorizzato da Legend Biotech, su 60 pazienti adulti con mieloma multiplo trattati in precedenza con almeno tre regimi, comprendenti un inibitore del proteasoma e un immunomodulatore, e progrediti entro 12 mesi dall'inizio del trattamento più recente. L'endpoint primario è l'ORR, valutato in base ai criteri dell'International Myeloma Working Group, il termine indicato per l'analisi primaria dei dati è il luglio 2020 e lo studio dovrebbe concludersi nella primavera del 2022.



Bibliografia

- [1] W-H. Zhao, et al. Updated Analysis of a Phase 1, Open-Label Study of LCAR-B38M, a Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy Directed Against B-Cell Maturation Antigen, in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. Blood 2018 132:955; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110548>

Intervista a Loredana Bergamini

Direttore medico di Janssen Italia

Come sta procedendo lo sviluppo clinico di JnJ-4528 nel mondo?

Gli studi condotti ad oggi (e ancora in corso) sono studi di fase 2 su un numero ridotto di pazienti, ma sono in attivazione nuovi trial che ampliano la popolazione in cui sarà testato JnJ-4528, allo scopo sia di confermare i risultati già ottenuti negli studi in corso sia di comprendere meglio come migliorare ulteriormente l'efficacia e la tollerabilità del prodotto. Lo studio LEGEND-2, i cui dati sono stati presentati al congresso ASH 2018 a San Diego, sono stati ottenuti in pazienti in recidiva o con malattia refrattaria, pazienti che, avendo già ricevuto tutte le terapie disponibili (inclusi gli anticorpi monoclonali anti-CD38), non avevano più opzioni terapeutiche alle quali attingere. Gli studi più nuovi si indirizzano a pazienti in linee più precoci di trattamento, ma caratterizzati da una malattia particolarmente aggressiva e ad alto rischio di recidiva precoce, per la quale le attuali opzioni terapeutiche sono in grado di fornire un beneficio limitato rispetto ai pazienti cosiddetti "a rischio standard". In questa fase di ricerca saranno coinvolti anche centri ematologici in Italia, nazione in cui esistono realtà di alta eccellenza riconosciute a livello mondiale in tale ambito terapeutico.

Quali sono gli ostacoli principali per il possibile accesso al farmaco nel nostro Paese e come pensate di superarli?

La terapia con CAR T-cells è, di fatto, molto complessa e vede coinvolti diversi attori: nello specifico, oltre all'ematologo spe-



cialista nella cura del mieloma, anche gli ematologi che si dedicano alle terapie cellulari in generale (come il trapianto autologo o allogenico di cellule staminali), gli specialisti di terapia intensiva per il monitoraggio e il trattamento delle eventuali reazioni avverse serie, gli esperti dei laboratori e così via. In generale, si sta definendo la necessità di creare team multidisciplinari di clinici ed esperti che siano dedicati alla gestione dei pazienti e del trattamento con CAR T-cells. Questa è, probabilmente, la via più efficace e razionale per poter gestire questo tipo di terapie così complesse.

Dove verranno prodotte le CAR T-cells destinate ai pazienti italiani, una volta che JnJ-4528 sarà approvato?

Al momento, i siti produttivi sono collocati negli Stati Uniti, tuttavia si sta valutando se localizzare la produzione anche in Europa. Questo consentirebbe una più agevole gestione della preparazione delle cellule modificate, con una riduzione dei tempi necessari per avviare la terapia.

Il tempo 'da vena a vena' è attualmente un fattore critico. Ci sono spazi di miglioramento della tecnologia produttiva?

La ricerca non si ferma mai, basta seguire le sessioni di un qualsiasi congresso per rendersi conto di quanto l'attenzione degli esperti sia sempre volta al futuro e a valutare minuziosamente quanto fatto sino ad oggi per trovare spunti e idee nuove. Si tratta di un cammino volto costantemente al miglioramento continuo, con l'obiettivo ultimo di fornire sempre il meglio ai pazienti: il meglio nei processi produttivi, il meglio nella gestione delle difficoltà, il meglio nel percorso di cura in toto. Confesso che è tutto estremamente coinvolgente e anche sorprendente, l'attenzione verso i bisogni (non solo di cura) dei pazienti è davvero sempre al centro dell'attenzione dell'intera comunità scientifica. Poter collaborare a tutto questo è, di conseguenza, estremamente gratificante per tutti noi.

Quali sono le possibili evoluzioni future di questa terapia?

Al momento si sta ipotizzando un possibile impiego delle terapie basate su CAR T-cells anche nell'ambito dei tumori solidi; tuttavia, occorre identificare target più adeguati e solo gli sviluppi futuri potranno indicare se tale via è percorribile e quali benefici potersi aspettare.

Perché Janssen ha deciso di entrare nel mondo delle CAR T-cells?

In Janssen l'innovazione è una tradizione. Questo non è uno slogan banale, né vuole essere una frase a effetto: la nostra azienda da sempre è impegnata nell'esplorare incessantemente ogni nuova strategia e ogni nuovo percorso di cura, così da poter offrire ai pazienti e ai medici opportunità sempre più solide per contrastare nel modo più efficace possibile malattie per la quali ancora, purtroppo, non vi sono terapie sufficientemente attive. Le CAR T-cells rappresentano in questo momento una delle opportunità più promettenti per diverse patologie; di conseguenza Janssen, che innova per vocazione, non può che essere presente in questo campo.

UCART19, le CAR T-cells allogene di Servier

Anche la multinazionale francese Servier ha deciso di investire nel settore delle CAR T-cells e, in particolare, ha indirizzato i suoi sforzi nello sviluppo di CAR T-cells allogene, preparate, cioè, a partire da cellule T non prelevate da un paziente (come le CAR T-cells autologhe finora approvate dall'FDA e dall'EMA), ma di un donatore sano. Le CAR T-cells allogene, infatti, rappresentano una nuova frontiera in questo campo e presentano potenzialmente svariati vantaggi rispetto a quelle autologhe, tra cui maggiore facilità di preparazione, tempi di produzione minori e, quindi, tempi di attesa ridotti per i pazienti, minor costo, pronta disponibilità della terapia al momento del bisogno e ampliamento del numero di pazienti che possono accedere al trattamento.

Nel novembre 2015, l'azienda ha perfezionato un accordo con la *biotech* Cellectis (pioniera nella messa a punto di CAR T-cells allogene e nella tecnica del '*gene editing*' attraverso una piattaforma brevettata, chiamata TALEN®) per collaborare allo sviluppo delle CAR T-cells allogene **UCART19** (U sta per Universal), messe a punto inizialmente da Cellectis e destinate al trattamento di neoplasie ematologiche che esprimono l'antigene CD19. In base a quest'accordo Servier ha acquisito da Cellectis i diritti esclusivi su UCART19 e assieme alla *biotech* californiana Allogene ha avviato una collaborazione per un programma di sviluppo clinico congiunto di queste CAR T-cells. Allogene avrà quindi i diritti di sviluppo e commercializzazione di UCART19 negli Stati Uniti, mentre Servier manterrà l'esclusiva il resto del mondo.

Il prodotto è già entrato in fase 1 ed è studiato come terapia per la leucemia linfoblastica acuta a cellule B recidivata/refrattaria.

Che cos'è UCART19

UCART19 è un prodotto a base di CAR T-cells allogene geneticamente modificate, preparate a partire da cellule T di donatori sani trasdotte con un vettore lentivirale (prodotto per Servier dalla CDMO francese Yposkesi) per inserirvi il gene di un CAR diretto contro l'antigene CD19 (**figura 1**). Il dominio di riconoscimento è un frammento di anticorpo murino a catena singola (scFv) che riconosce CD19, mentre il dominio co-stimolatorio è 4-1BB e il dominio di attivazione è CD3-zeta.

Una caratteristica distintiva del prodotto è rappresentata dal fatto che nelle cellule T del donatore sono stati inattivati mediante la tecnologia TALEN® brevettata da Cellectis i geni CD52 e TCRα (TRAC), per ridurre il rischio di GvHD e permettere alle CAR T-cells allogene di espandersi e persistere nei pazienti. Inoltre, le cellule UCART19 sono progettate in modo da esprimere una piccola proteina sulla superficie cellulare chiamata RQR8, che consiste in due domini di riconoscimento di rituximab, separati da un dominio di riconoscimento per un anticorpo anti-CD34; ciò consente il riconoscimento e l'eliminazione delle cellule nel caso in cui si desideri silenziare l'attività del CAR, in presenza di tossicità gravi.

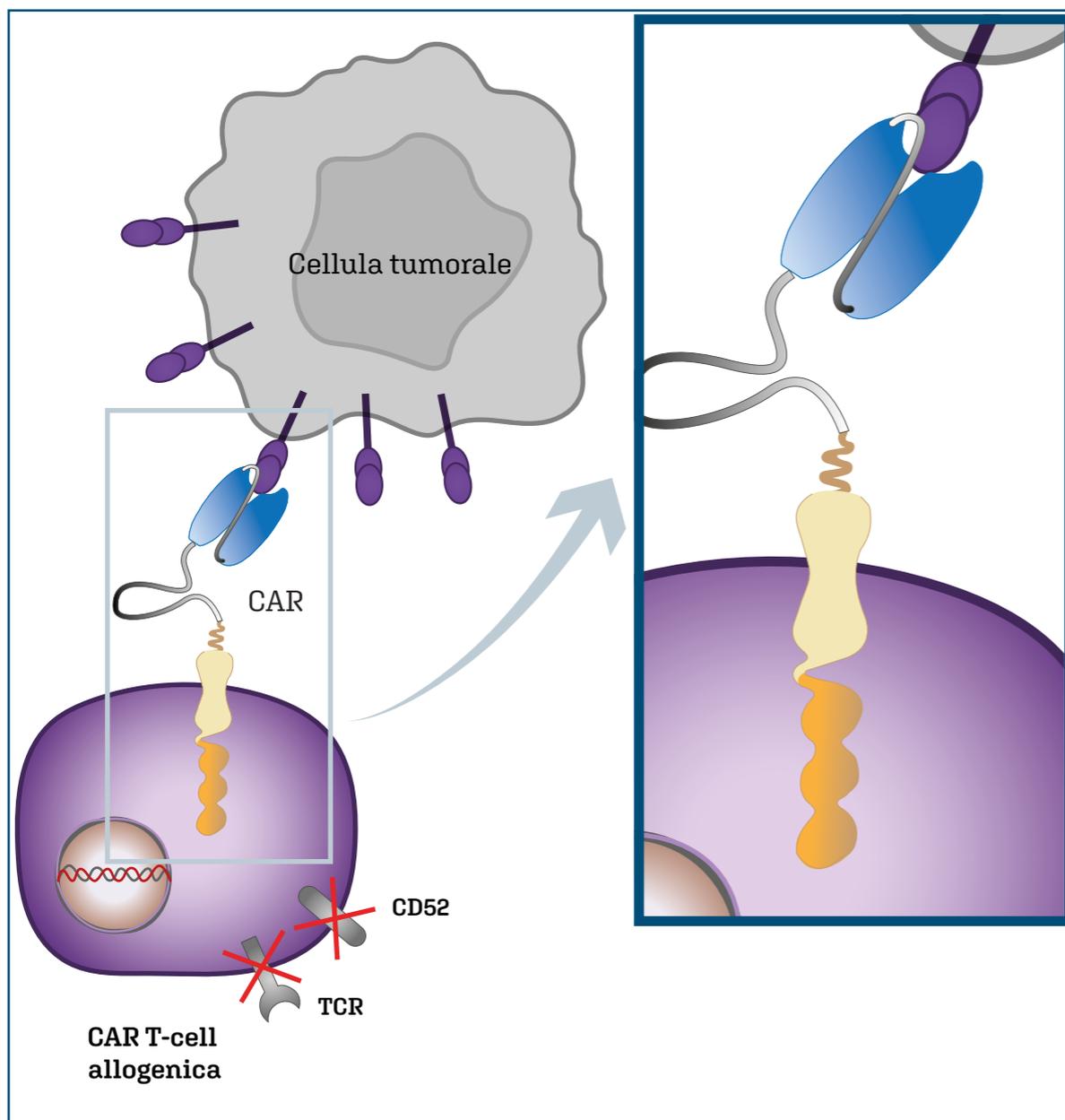


Figura 1. La struttura del CAR di UCART19.

I dati clinici

UCART19 non è ancora stata approvata da alcuna agenzia regolatoria, ma è la prima terapia a base di CAR T-cells allogeniche a essere entrata nello sviluppo clinico.

I dati clinici attualmente disponibili su UCART19 provengono da due trial di fase 1, tuttora in corso, su pazienti con leucemia linfoblastica acuta a cellule B ricaduta/refrattaria: lo studio **PALL** (Study of UCART19 in Pediatric Patients With Relapsed/

Refractory B Acute Lymphoblastic Leukemia; NCT02808442), sulla popolazione pediatrica, e lo studio **CALM** (Dose Escalation Study of UCART19 in Adult Patients With Relapsed/Refractory B-cell Acute Lymphoblastic Leukaemia; NCT02746952) sulla popolazione adulta, iniziati in Europa nel 2016 e negli Stati Uniti nel 2017.

Nel dicembre 2018, il professor Reuben Benjamin, del King's College Hospital di Londra, ha presentato al congresso dell'ASH un'analisi aggiornata dei risultati combinati di questi due studi, relativa a 21 pazienti analizzati fino al 23 ottobre 2018.

In questo gruppo di pazienti UCART19 ha mostrato un profilo di sicurezza accettabile e gestibile e una promettente attività clinica, con una percentuale elevata di remissioni complete in coloro che erano stati sottoposti a linfodeplezione con l'anticorpo anti-CD52 alemtuzumab in aggiunta alla chemioterapia convenzionale con fludarabina e ciclofosfamide (regime FCA).

CALM è uno studio di *dose-escalation* nel quale i pazienti sono stati trattati con tre diversi dosaggi – 1×10^5 cellule/kg, 1×10^6 cellule/kg e 3×10^6 cellule/kg – mentre nello studio PALL si sta testando una dose unica, da $1,1$ a $2,3 \times 10^6$ cellule/kg. Una settimana prima dell'infusione di UCART19 i partecipanti sono stati sottoposti a una linfodeplezione con ciclofosfamide (1500 mg/m^2 in CALM, 120 mg/kg in PALL) e fludarabina (90 mg/m^2 in CALM, 150 mg/m^2 in PALL) senza (regime FC) o con alemtuzumab (regime FCA) (1 mg/kg).

Per quanto riguarda l'**efficacia** (tabella 1):

- l'82% dei pazienti sottoposti alla linfodeplezione con il regime FCA ha ottenuto una remissione completa o una remissione completa con recupero ematologico incompleto;
- nei quattro pazienti trattati solo con FC, senza l'anti-CD52, l'espansione delle cellule UCART19 è stata minima e non si è osservata alcuna risposta.

Studio	Pazienti arruolati/trattati	CR/CRi con FCA	CR/CRi	GvHD G1	CRS G3 o 4	Citopenia prolungata G4	Infezione virale G3 o 4	Neurotossicità G3 o 4
PALL	7	100% [6/6]	86% [6/7]	14% [1/7]	14% [1/7]	43% [3/7]	57% [4/7]	0% [0/7]
CALM	14	73% [8/11]	57% [8/14]	7% [1/14]	14% [2/14]	21% [3/14]	7% [1/14]	0% [0/14]
Dati combinati	21	82% [14/17]	67% [14/21]	10% [2/21]	14% [3/21]	29% [6/21]	24% [5/21]	0% [0/21]

Tabella 1. Risultati dell'analisi dei dati combinati degli studi PALL e CALM presentati al congresso ASH 2018. CR: remissione completa; CRi: remissione completa con recupero ematologico incompleto; FCA: fludarabina, ciclofosfamide e alemtuzumab; GvHD: Graft versus Host Disease; CRS: sindrome da rilascio di citochine.

- nel complesso, il tasso di remissione completa o remissione completa con recupero ematologico incompleto è risultato del 67%.

Questi dati, hanno concluso i ricercatori, suggeriscono che per ottenere l'espansione delle CAR T-cells allogeneiche è importante aggiungere al regime linfodepletante un anticorpo anti-CD52. Pertanto, il protocollo dei due studi è stato emendato in modo da aggiungere sempre un anticorpo anti-CD52 alla chemioterapia linfodepletiva.

Sul fronte della **sicurezza** (tabella 1):

- gli eventi avversi più comuni sono correlati alla CRS e sono risultati generalmente gestibili;
- il 90% dei pazienti ha sviluppato una CRS, che nel 14% dei casi è stata di grado 3/4;
- non sono stati registrati casi di GvHD di grado 2 o superiore, ma solo due (20%) di grado 1;
- non si sono osservati episodi gravi di neurotossicità e il 38% dei pazienti ha manifestato eventi avversi neurologici limitati al grado 1 o 2;
- non si sono registrati nuovi decessi correlati al trattamento.

Ulteriori sviluppi

Gli studi PALL e CALM sono ancora in corso e dovrebbero concludersi nel 2020. Inoltre, è partito uno studio il cui obiettivo primario è valutare la sicurezza a lungo termine (in un arco di tempo di 15 anni) di UCART19 nei pazienti che sono stati e saranno sottoposti a questo trattamento (NCT02735083). Lo studio dovrebbe coinvolgere circa 200 pazienti e concludersi nel 2040.

Oltre a UCART19, Servier sta sviluppando in collaborazione con Cellectis e Allogene anche **ALLO-501**, un prodotto a base di CAR T-cells allogeneiche anti-CD19 destinate al trattamento di pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin ricaduti/refrattari. Nel gennaio scorso, l'FDA ha autorizzato l'avvio dello studio di fase 1 **ALPHA**. Il trial coinvolgerà circa fino a 24 pazienti affetti dai tipi più comuni di linfoma non-Hodgkin (linfoma diffuso a grandi cellule B e linfoma follicolare), che, in aggiunta alla chemioterapia linfodepletiva, saranno pretrattati prima dell'infusione delle CAR T-cells con ALLO-647, un anticorpo sperimentale anti-CD52 (sviluppato da Allogene), allo scopo di prevenire il rigetto di ALLO-501 da parte delle cellule T dell'ospite che esprimono l'antigene CD52.

Nel febbraio scorso, inoltre, i ricercatori di Collectis hanno pubblicato sulla rivista *The Journal of Biological Chemistry* un lavoro molto interessante che lascia intravedere nuove prospettive per aumentare la sicurezza delle CAR T-cells. Il team, in particolare ha trovato un sistema per migliorare la gestione della CRS nel senso di prevenirla, anziché trattarla, come si fa oggi, con tocilizumab e/o gli steroidi. Gli autori, infatti, hanno scoperto che il fattore di crescita GM-CSF secreto dalle CAR T-cells ha un ruolo chiave nel promuovere la sindrome. Hanno quindi sviluppato CAR T-cells nelle quali è stato inattivato con la tecnologia TALEN® il gene del GM-CSF e poi dimostrato che tale inattivazione previene la secrezione di citochine proinfiammatorie, senza compromettere la capacità di proliferazione delle CAR T-cells e la loro attività antitumorale *in vitro*. Ovviamente, questi risultati dovranno ora essere confermati *in vivo* per assicurare che rappresentino una possibilità concreta di prevenzione della CRS.



Bibliografia

- [1] R. Benjamin, et al. Preliminary Data on Safety, Cellular Kinetics and Anti-Leukemic Activity of UCART19, an Allogeneic Anti-CD19 CAR T-Cell Product, in a Pool of Adult and Pediatric Patients with High-Risk CD19+ Relapsed/Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* (2018) 132 (Supplement 1): 896. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111356>
- [2] M. Sachdeva, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inactivation in CAR T-Cells prevents monocyte-dependent release of key cytokine release syndrome mediators. *J Biol Chem*. 2019; doi: 10.1074/jbc.AC119.007558 <http://www.jbc.org/content/early/2019/02/25/jbc.AC119.007558.abstract>

CAR T-CELLS: LA RICERCA ITALIANA

Il 'Progetto Italia CAR T-cells'

La ricerca dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù

Bergamo e Monza insieme nella ricerca sulle CAR T-cells

Le CAR T-cells sviluppate al San Raffaele di Milano

Il ruolo di MolMed nella ricerca italiana sulle CAR T-cells



Iscriviti alla newsletter
di PharmaStar

PHARMASTAR[★]
il Giornale online sui Farmaci



Il 'Progetto Italia CAR T-Cells'

La terapia con CAR T-cells promette di modificare e migliorare radicalmente le possibilità di cura di alcune gravi neoplasie ematologiche, e in futuro potrebbe trovare spazio anche nei tumori solidi, sebbene in questo ambito la ricerca sia in una fase più precoce. Alla luce di queste incoraggianti premesse, nel nostro Paese, da più parti, tra cui l'autorevole voce del professor **Silvio Garattini**, è stata sottolineata l'utilità di identificare processi produttivi che, tra gli altri, dovrebbero avere anche lo scopo di estendere la capacità manifatturiera nazionale e ridurre i costi correlati alla generazione di questi prodotti ad altissima tecnologia.

Questo obiettivo, non esente da rischi e difficoltà di varia natura, potrebbe contribuire a incrementare il numero di pazienti beneficiari di queste terapie e ottimizzarne la sostenibilità economica, fatto quanto mai importante in un sistema assistenziale solidaristico come quello italiano.

Secondo le ultime stime, i pazienti italiani che inizialmente potranno beneficiare delle CAR T-cells industriali già autorizzate dall'Aifa e rimborsate dal Sistema Sanitario Nazionale sarebbero circa 800, anche se, ampliando i target terapeutici (si stima vi siano più di 1000 studi clinici in corso su Terapie Avanzate, di cui più del 50% in area oncologica), il numero potenziale potrebbe essere di gran lunga superiore; ciò porrebbe problemi di accesso che, alle attuali condizioni di mercato, risulterebbero difficilmente sostenibili.

Con un'iniziativa del precedente Governo, denominata '**Progetto Italia CAR T-Cells**', sono stati messi a bilancio 10 milioni di euro di finanziamento, spalmati su 2 anni, per creare una mas-



sa critica tra istituti di ricerca a carattere scientifico, gli IRC-
CS, che hanno dichiarato di essere coinvolti sulle CAR T-cells a vario titolo, altre strutture in prima linea sulle immunoterapie e la *biotech* italiana MolMed, al fine di sviluppare percorsi preclinici che potranno poi sfociare in trial clinici. Il Progetto punta a istituire una rete di eccellenze italiane ed è aperto ad altri soggetti con le competenze e l'interesse necessari per partecipare a questo sforzo.

Sei gruppi di lavoro stanno attualmente lavorando su altrettanti sotto-progetti: identificazione di nuovi target tumorali sia nell'ambito d'elezione dei tumori ematologici sia sul fronte delle neoplasie solide; validazione dei medesimi su modelli animali; ricerca su efficacia e sicurezza e quindi sui profili

di tossicità; ottimizzazione dei processi produttivi; coordinamento sul tema della proprietà intellettuale e della copertura brevettuale. Questo, in sintesi, il programma di lavoro del 'Progetto Italia CAR T-Cells'.

La creazione di un network nazionale (aperto alla partecipazione di ulteriori partner biotecnologici e farmaceutici industriali, attraverso manifestazioni di interesse) sotto l'egida di Alleanza contro il Cancro, dedicato in modo specifico allo sviluppo della tecnologia con CAR T-cells, ha lo scopo, in ultima analisi, di abbattere i costi di queste terapie e, al tempo stesso, incrementare le capacità produttive attraverso l'armonizzazione e l'automazione dei processi. Inoltre, il progetto prevede lo sviluppo di progettualità di ricerca condivise, volte a identificare e validare innovative piattaforme di CAR T-cells che consentano di somministrare in sicurezza prodotti allogenici.

Le CAR T-cells allogeniche, prodotte a partire da cellule di donatori sani, utilizzabili universalmente e *'off the shelf'*, cioè già pronte per l'uso al momento del bisogno, rappresentano, infatti, una possibilità concreta per la riduzione dei costi di queste terapie, dal momento che armonizzazione e automazione dei processi non sembrano, ad oggi, in grado di produrre risparmi significativi finché si resta in ambito autologo. Queste CAR T-cells sono ancora in fase di studio e, sulla carta, assicurerebbero la possibilità di un più ampio impiego di questa tecnologia. Innanzitutto, però, occorrerà verificare che efficacia e sicurezza siano paragonabili a quelle delle CAR T-cells autologhe già registrate, dopodiché le terapie con CAR T-cells allogeniche andranno approvate secondo le normali procedure. Una simile innovazione consentirebbe la generazione di banche da donatori *third-party* in grado di garantire la disponibilità, al bisogno e in tempi rapidi, delle cellule geneticamente modificate, determinando un abbattimento dei tempi di attesa e dei costi produttivi.

Gli obiettivi del 'Progetto Italia CAR T-Cells'

- Definizione di processi produttivi in grado di contenere i costi correlati alla generazione di cellule CAR T
- Identificazione di nuovi target selettivamente espressi su cellule neoplastiche e compatibili con l'impiego clinico delle cellule CAR T
- Sviluppo preclinico di cellule CAR T contro nuovi bersagli tumorali su tumori solidi o neoplasie ematologiche diverse da quelle della linea differenziativa B
- Identificazione e validazione di nuove strategie per aumentare attivazione, espansione, sopravvivenza, penetrazione nei tessuti e azione citotossica delle cellule CAR T
- Strategie per migliorare il profilo di sicurezza delle cellule CAR T

Uno degli obiettivi principali del 'Progetto Italia CAR T-Cells' è anche quello di ampliare le patologie e il numero di pazienti potenzialmente trattabili con le CAR T-cells attraverso lo sviluppo di un sistema di screening delle molecole espresse sulla superficie delle cellule tumorali, volto a identificare nuovi bersagli per queste cellule, e il successivo sviluppo di CAR capaci di colpire tali bersagli.

Il progetto è stato di recente rilanciato dal Governo in carica, che annunciato uno stanziamento di 60 milioni di euro suddivisi su sei centri ancora da identificare, dotati di officine farmaceutiche in grado di effettuare la complessa procedura di

sviluppo e produzione delle CAR T-cells. Tale investimento è stato presentato di recente dal Ministro della Salute **Roberto Speranza** nel suo intervento davanti alle commissioni riunite Igiene e Sanità del Senato e Affari sociali della Camera volto a illustrare le linee programmatiche del suo Ministero. Le sei officine farmaceutiche, che dovranno essere distribuite sul territorio nazionale, verranno individuate con un decreto ministeriale e con la Conferenza Stato-Regioni.

Considerando l'interesse per il settore delle CAR T-cells a livello globale e l'esiguità dei fondi messi ad oggi a disposizione, le risorse stanziare potranno realisticamente bastare per fare una mappatura di ciò che effettivamente esiste, dalla ricerca di base fino alle capacità di sviluppo e produzione a livello italiano, e, forse, per definire un processo di trasferimento tecno-

logico. Sono, invece, ancora inadeguate se le si paragona con quelle che hanno già messo in campo tanto i fondi d'investimento quanto le grandi aziende bio-farmaceutiche che si sono lanciate nel settore delle terapie avanzate, e delle CAR T-cells in particolare.

Se si vorrà passare allo sviluppo di terapie, alla produzione GMP e alla conduzione di trial, occorreranno stanziamenti ben maggiori, come ha sottolineato in un'intervista al Sole 24 Ore il professor **Franco Locatelli**, presidente del Consiglio Superiore di Sanità e coordinatore del 'Progetto Italia CAR T-Cells': «I 10 milioni oggi a disposizione possono bastare per la parte preclinica. È chiaro che se si passerà alla conduzione di studi clinici, bisognerà fare conti diversi. Intanto, mettere a punto questo modello che mira in prima battuta a identificare nuo-

IRCCS responsabili di <i>working package</i>	Altri partecipanti
1. IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma	1. IRCCS Istituto Europeo di Oncologia, Milano
2. IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano	2. IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milano
3. IRCCS Policlinico Gemelli, Roma	3. IRCCS Istituto Regina Elena, Roma
4. IRCCS Istituto Oncologico del Veneto, Padova	4. IRCCS Istituto Humanitas, Milano
5. IRCCS Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori, Meldola (FC)	5. Ospedale San Gerardo, Monza
6. IRCCS Istituto di Candiolo - Fondazione del Piemonte per l'Oncologia, Candiolo (TO)	6. IRCCS Centro Regionale Oncologico, Aviano (PN)
	7. Molmed, SpA, Milano
	8. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, Napoli
	9. Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)
	10. Rete Amore [IRCCS Istituto Tumori Giovanni Paolo II, Bari; IRCCS Istituto Pascale, Napoli; IRCCS CROB, Rionero in Vulture (PZ)]

Tabella. I partecipanti al 'Progetto Italia CAR T-Cells'

vi target terapeutici, anche per le neoplasie solide, e a definire meccanismi che sottendono alle potenziali tossicità delle CAR T, è già un obiettivo straordinariamente importante».

Il progetto è molto stimolante e potrebbe essere foriero di numerose ricadute cliniche, assistenziali ed economiche. Tuttavia, ha rimarcato in un recente articolo **Francesca Pasinelli**, direttore generale della Fondazione Telethon, non vanno sottovalutate le difficoltà da affrontare e la soluzione non dovrebbe essere ricercata nella contrapposizione tra ricerca accademica e industria.

Come sottolineato in un altro articolo, sempre sul Sole 24 Ore, dal presidente di Assobiotec, **Riccardo Palmisano**, e ribadito nel corso di un recente Forum SIF dal professor **Luca Pani**, ex direttore generale dell'Aifa, bisognerà tener conto anche degli aspetti regolatori, indispensabili per garantire ai pazienti l'accesso a prodotti efficaci e sicuri, e quelli relativi alla proprietà intellettuale sui quali, tra l'altro, si basano gli ingenti investimenti già effettuati da alcuni attori.

La strada da seguire può essere quella di una collaborazione tra ricerca accademica e mondo industriale, anche quello italiano ovviamente, per far sì che le acquisizioni relative a nuovi bersagli, nuove modalità di costruzione dei CAR e nuove patologie, possano poi tradursi in vantaggi concreti per il sistema e, soprattutto, per i pazienti.

L'interesse che può essere suscitato da un progetto quale il 'Progetto Italia CAR T-Cells' potrebbe condurre a una virtuosa collaborazione con realtà industriali operanti in ambito farmaceutico, arricchendo ulteriormente il panorama delle potenziali opportunità legate allo sviluppo su base nazionale della terapia con cellule CAR-T.

Si creerebbe, infatti, un potenziale sinergismo virtuoso fra istituzioni accademiche e industrie bio-farmaceutiche con l'interesse a riprodurre anche in Italia il modello di collaborazione *win-win* che ha avuto certamente un ruolo importante nello sviluppo delle cellule CAR T negli Stati Uniti.

La ricerca dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù

L'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS di Roma è all'avanguardia in Italia nella ricerca sulle cellule CAR T. In quest'intervista, il professor **Franco Locatelli**, Direttore del Dipartimento di Onco-Ematologia e Terapia Cellulare e Genica presso l'IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma e Professore Ordinario di Pediatria presso l'Università "La Sapienza" di Roma, e la professoressa **Concetta Quintarelli**, Responsabile dell'Unità di Terapia Cellulare e Genica dei Tumori Pediatrici dell'IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù e ricercatrice di Biochimica all'Università degli Studi di Napoli "Federico II", tracciano un quadro degli studi clinici attualmente in corso e dei nuovi progetti di ricerca già avviati presso il loro centro.

Quali sono gli studi clinici già avviati presso l'Ospedale Bambino Gesù nei quali si utilizzano le cellule CAR T?

Stiamo attualmente conducendo due trial clinici accademici che prevedono l'impiego di queste cellule geneticamente modificate in modo da riconoscere ed eliminare le cellule tumorali. Il primo (codice identificativo NCT03373071) è uno studio di fase 1/2a condotto su pazienti pediatrici e giovani adulti fino a 25 anni affetti da leucemia linfoblastica acuta o linfomi non-Hodgkin a cellule B alla seconda recidiva o refrattari, con coinvolgimento midollare misurabile e, quindi, con malattia minima residua positiva, trattati con un'infusione di cellule CAR T dirette contro l'antigene CD19 (CD19-CART01). Il secondo (codice identificativo NCT03373097) è, di nuovo, uno studio di fase 1/2a, nel quale utilizziamo però le cellule CAR T per trattare un tumore solido: il neuroblastoma, che è il tumore extracranico più frequente in età pediatrica. I pazienti arruolati sono anch'essi recidivati o refrattari e le cellule CAR T hanno come bersaglio, in

Il professor
Franco Locatelli



La professoressa
Concetta Quintarelli



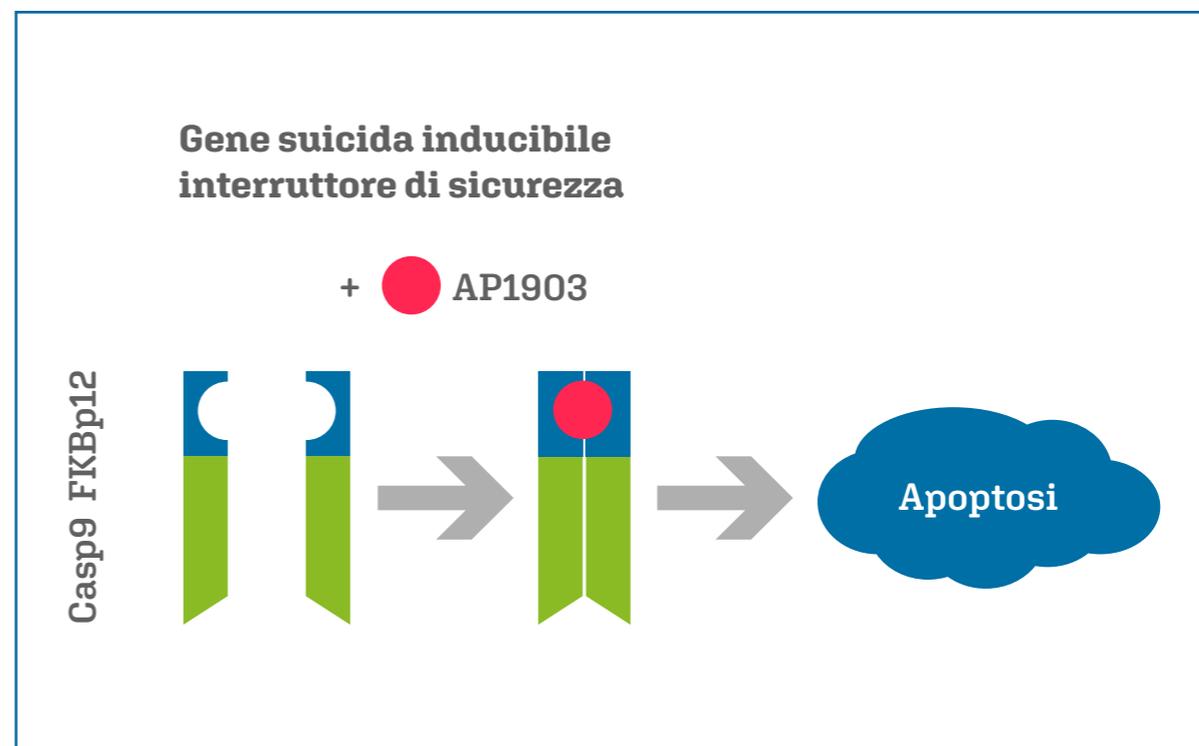
questo caso, l'antigene GD2 [GD2-CART01]. In entrambi gli studi, le cellule CAR T che utilizziamo sono autologhe e preparate in una struttura dedicata dell'Ospedale stesso, l'Officina Farmaceutica OPBG, approvata dall'Aifa per la preparazione di prodotti di terapia genica e cellulare per utilizzo nell'uomo.

Che caratteristiche hanno le cellule CAR T che state testando nello studio sui tumori ematologici?

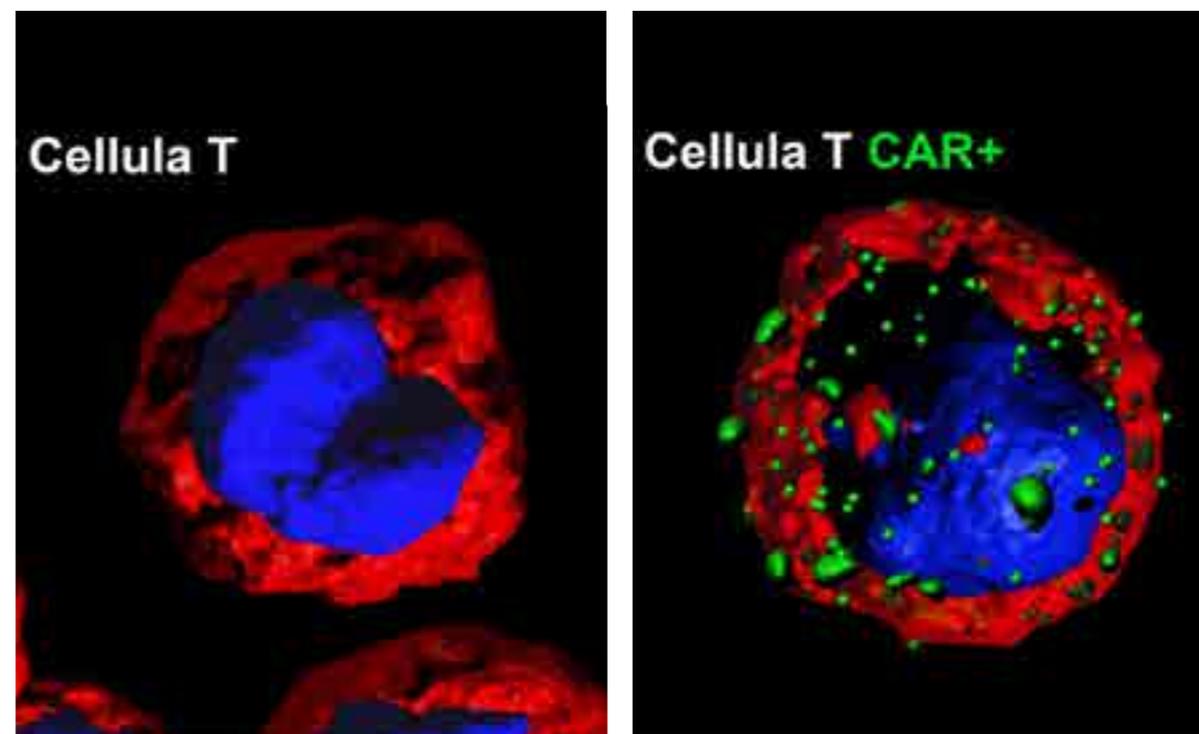
Vengono preparate prelevando le cellule T linfocitarie dal paziente e trasducendole con un vettore retrovirale messo a punto nei nostri laboratori di ricerca e sviluppo, che veicola al loro interno il gene di un CAR di seconda generazione, caratterizzato dal dominio extracellulare che riconosce l'antigene CD19 e, all'interno della cellula, dal dominio di co-stimolazione 4-1BB e dal dominio di attivazione del segnale CD3 zeta. In aggiunta a questi componenti, che sono quelli di un classico costrutto di seconda generazione, il nostro CAR anti-CD19 contiene anche due innovazioni: un marker di tracciabilità derivato dalla molecola CD34 che permette di controllare la farmacocinetica del preparato infuso, cioè se e quanto si espandono le cellule T CAR-positivo nell'organismo del paziente, e un 'gene suicida', il gene della caspasi 9 inducibile, che serve per aumentare il livello di sicurezza del nostro prodotto.

Come funziona questo 'gene suicida' che caratterizza le vostre cellule CAR T?

Il gene suicida inducibile è in realtà un gene ibrido chimerico, normalmente inattivo, composto da due parti: il gene della caspasi 9 più un gene che codifica per una porzione mutata di una proteina chiamata FKBP12. Nel caso in cui il paziente sviluppi un evento avverso che non può essere altrimenti controllato, si può somministrare un farmaco dimerizzante (AP1903, o Rimiducid) che è inerte sulle cellule non modificate geneticamente, ma che agisce su quelle geneticamente modificate per attivare il gene suicida. In presenza di questo agente, infatti, grazie alla mutazione presente su FKBP12 (Phe36Val), che ne aumenta di 1000 volte



La figura mostra il meccanismo d'azione del gene suicida inducibile FKBP12-caspasi 9, attivabile in caso di effetti collaterali pericolosi per la vita del paziente. Somministrando il farmaco AP1903, la proteina chimerica FKBP12-caspasi 9 dimerizza, attivando la cascata del segnale della caspasi 9, che porta alla morte per apoptosi delle CAR T-cells.





l'affinità per questo farmaco, la proteina chimerica FKBP12-caspasi 9 forma un dimero che attiva la cascata di trasduzione del segnale della caspasi 9. Attivando questo sistema, si induce la morte per apoptosi delle cellule CAR T somministrate, eliminandole così nel giro di 24 ore dall'organismo del paziente.

Che disegno ha lo studio sui pazienti con leucemia linfoblastica acuta o linfoma, e che risultati avete ottenuto finora?

La fase 1 aveva un classico disegno di progressivo incremento delle dosi (*dose-escalating design*) definito 3+3, perché abbiamo testato tre livelli di dose diversi, trattando per ciascuno di essi almeno tre pazienti (il numero totale di pazienti trattati per livello di dose dipende dal grado di tossicità riscontrato). Il primo livello di dose (mezzo milione di cellule CAR T/kg) è stato somministrato ai primi tre pazienti in assenza di tossicità; quest'osservazione ci ha permesso di passare immediatamente ai livelli di trattamento successivi (un milione e mezzo di cellule CAR T/kg, fino poi ad arrivare alla dose più alta pre-

vista, pari a 3 milioni di cellule CAR T/kg). Il primo obiettivo della fase 1 era dimostrare la sicurezza del trattamento, dal momento che si trattava di un nuovo prodotto generato all'interno dei nostri laboratori, mai utilizzato prima in clinica. Da questo punto di vista, la fase 1 è stata completata con successo, senza osservare eventi di tossicità dose-limitante e senza che i pazienti abbiano manifestato tossicità importanti. Non ci sono stati episodi di neurotossicità, mentre abbiamo avuto alcuni casi di CRS, ma solo di grado 1 (per lo più) e 2, con febbre non particolarmente alta e persistente, che abbiamo gestito semplicemente con paracetamolo. In nessun paziente è stato necessario attivare il gene suicida.

Il secondo obiettivo primario era la fattibilità: dovevamo dimostrare che, come centro accademico, eravamo in grado di produrre queste cellule e somministrarle ai nostri pazienti. In effetti, il tasso di successo nella produzione delle CAR T è stato del 100% e tutti i pazienti arruolati hanno potuto beneficiare dell'infusione delle cellule T ingegnerizzate. Siamo, quindi, passati alla fase 2, nella quale i pazienti vengono infusi con 3 milioni di cellule CAR T/kg. Ad oggi, abbiamo già prodotto cellule CAR T per 25 pazienti e ne abbiamo trattati 16 (di cui 9 nella fase 1 e sette nella fase 2), mentre i restanti 9 sono in attesa di ricevere il prodotto. Dal punto di vista dell'*outcome*, quando abbiamo effettuato la prima valutazione, dopo 4 settimane dall'infusione, l'85% dei 16 pazienti trattati era in remissione completa e con malattia minima residua negativa, sia nel midollo osseo sia nel sangue periferico. Alcuni pazienti hanno poi presentato una recidiva di malattia. Il follow-up più lungo ad oggi è di 22 mesi e al momento ci siamo attestati su una percentuale di sopravvivenza pari al 70%.

Come proseguirà questo studio?

Dobbiamo completare l'arruolamento e dovremo arrivare a trattare in tutto, tra la fase 1 e la fase 2, 38 pazienti. Il termine della fase 2 è previsto nel 2020. I pazienti saranno seguiti per almeno



5 anni dopo il trattamento L'analisi primaria dei dati sarà disponibile nel 2021 e l'intero studio dovrebbe concludersi nel 2025.

Che caratteristiche hanno, invece, le cellule CAR T che avete sviluppato per il trattamento del neuroblastoma?

In questo caso, abbiamo sviluppato cellule CAR T contenenti un CAR di terza generazione anti-GD2, perché, nel contesto dei tumori solidi, le cellule CAR T di seconda generazione non hanno mai dato risultati particolarmente incoraggianti. Le cellule vengono trasdotte con un vettore retrovirale e il CAR contiene il dominio di riconoscimento dell'antigene GD2 (un disialoganglioside altamente e pressochè universalmente espresso da cellule di neuroblastoma, ndr) più due domini intracellulari di co-stimolazione, CD28 e 4-1BB, il dominio di attivazione del segnale CD3 zeta e, come per il CAR sviluppato per la leucemia linfoblastica acuta e i linfomi, è presente il sistema della caspasi 9 inducibile, come 'interruttore di sicurezza'. In questo caso, invece, non è stato necessario introdurre un dominio ulteriore per il monitoraggio delle cellule nel

paziente, in quanto esiste già in commercio un anticorpo in grado di riconoscere il dominio del CAR stesso. Abbiamo valutato estesamente questo costrutto in studi preclinici, nei quali lo abbiamo confrontato con un altro CAR di terza generazione sviluppato presso un'istituzione americana, che era già arrivato allo sviluppo clinico senza però dare risultati importanti, e abbiamo dimostrato che il nostro prodotto presenta rispetto a questo diversi vantaggi, sia in termini di attività antitumorale, sia di persistenza delle cellule nel modello animale. Incoraggiati da questi risultati, siamo passati allo sviluppo clinico.

Che tipo di studio state facendo sui pazienti con neuroblastoma?

Si tratta di un trial monocentrico di fase 1/2a in pazienti con neuroblastoma di età non superiore ai 18 anni recidivati dopo almeno due linee di terapia o refrattari. Lo studio è stato disegnato un po' diversamente rispetto a quello sulla leucemia linfoblastica acuta e i linfomi, perché i soggetti arruolati sono in genere in uno stadio di malattia più avanzato. Per questo motivo, abbiamo pensato di iniziare la fase 1 trattando i primi tre pazienti con una dose intermedia -3 milioni di cellule CAR T/kg - che in altri studi clinici aveva già mostrato qualche effetto terapeutico, anziché con una dose troppo bassa, non efficace. La fase 1 era disegnata in modo tale che dopo 4 settimane dalla prima infusione, qualora nei primi tre pazienti non si fossero osservati effetti avversi, si potesse salire a una dose più alta, trattando i successivi tre pazienti con 5 milioni di cellule CAR T/kg e, di nuovo, in assenza di tossicità in questo secondo gruppo, si potesse passare alla dose più alta - 10 milioni di cellule CAR T/kg - negli ultimi tre pazienti. In caso di tossicità, si sarebbe potuto scendere di dosaggio da 3 milioni di cellule CAR T/kg a un milione e mezzo, e da un milione e mezzo a mezzo milione di cellule CAR T/kg (*escalating/de-escalating design*). Invece, siamo riusciti ad arrivare alla dose più alta senza osservare tossicità dose-limitante e siamo, quindi, passati alla

fase 2, ancora in corso, nella quale i pazienti vengono trattati con 10 milioni di cellule CAR T /kg. Ad oggi siamo arrivati a 15 pazienti trattati: i 9 della fase 1 più sei nella fase 2.

Dal punto di vista della sicurezza, che risultati avete ottenuto?

Questo prodotto ha mostrato complessivamente un buon profilo di sicurezza. Ci sono stati alcuni episodi di CRS, di entità un po' più alta rispetto a quelli osservati nello studio su leucemia e linfomi. Sono stati quasi sempre di grado 1 e 2, solo un paziente ha sviluppato una CRS di grado 3; tuttavia, in questo studio i picchi febbrili registrati sono stati molto più alti, fino a 40 gradi, e molto più persistenti, la sintomatologia febbrile essendo durata anche più di 15 giorni. In un bambino piccolo, gestire una febbre così alta e persistente non è semplice, ma d'altro canto questo sintomo è associato a una grande attivazione delle cellule CAR T circolanti e, quindi, a miglior risultato in termini di *outcome*. Tutti i casi sono stati gestiti con successo somministrando solo paracetamolo, tranne quello di grado 3, nel quale si è dovuto attivare il gene suicida perché il paziente non aveva risposto in precedenza né ai corticosteroidi né a tocilizumab, un anticorpo monoclonale antagonista recettoriale dell'interleuchina-6. Inoltre, non abbiamo osservato alcuna neurotossicità.

E per quanto riguarda l'efficacia?

Tutti i pazienti arruolati avevano lesioni multiple, e tutti avevano il midollo compromesso e linfonodi in varie parti del corpo coinvolti. Al momento del primo controllo scintigrafico, 6 settimane dopo l'infusione, tutti tranne due hanno mostrato una riduzione significativa del tumore, con un controllo praticamente totale di tutte le lesioni ossee. Pertanto, coloro che avevano solo localizzazioni ossee sono andati in remissione completa, mentre chi aveva una massa tumorale localizzata nei linfonodi o a livello dell'addome ha riposto al trattamento,

ma non in modo completo, e ha poi presentato una recidiva. Nei due pazienti definiti come *non responder* si è osservata una stabilizzazione della malattia.

A che punto siete con il follow-up?

Il follow-up più lungo è sempre di 22 mesi, perché il primo paziente è stato trattato il 14 gennaio 2018, 10 giorni dopo il primo paziente trattato con leucemia linfoblastica acuta. Il termine della fase 2 è previsto nel 2020. L'analisi primaria dei dati dovrebbe essere disponibile nel 2022 e l'intero studio dovrebbe concludersi nel 2025. Lo studio sulla leucemia linfoblastica acuta e quello sul neuroblastoma, di fatto, stanno procedendo in parallelo, con grande impegno sia da parte dell'officina farmaceutica – al momento in Italia non c'è nessun'altra *cell factory* che sta producendo una quantità così elevata di terapie con cellule CAR T– sia da parte dei clinici, che stanno gestendo un numero molto alto di pazienti, malati che dopo l'infusione delle cellule, di per sé non più lunga di 10 minuti, devono restare ricoverati per uno stretto monitoraggio per almeno 15 giorni, e poi essere seguiti frequentemente presso la struttura di day-hospital per almeno i primi mesi.

Tra tutti i casi che avete trattato e seguito finora, ce n'è uno che vi ha colpito in modo particolare?

Ogni paziente ha una sua storia e ognuno, a suo modo, ci ha colpito. Tuttavia, quello che forse ci ha coinvolto di più è stato il primo, un bambino affetto da leucemia linfoblastica acuta che al momento dell'infusione aveva solo 4 anni. Infatti, in base alla letteratura e ai dati di altri studi, ci aspettavamo di vedere un'espansione delle cellule CAR T nel sangue periferico a partire dal secondo o terzo giorno post-trattamento. Invece, nella prima settimana non è successo nulla. A quel punto ci siamo preoccupati e abbiamo temuto di aver fatto un *bucò nell'acqua*, anche perché il paziente era già stato sottoposto senza successo a due trapianti di cellule staminali ed era in

uno stadio molto avanzato di malattia. Quello è stato forse il momento più difficile dello studio, perché avevamo lavorato 4 anni per vedere potenzialmente fallire tutto nel giro di una manciata di giorni. In realtà, in tutti i pazienti che abbiamo trattato successivamente è poi successa la stessa cosa, ma nel primo caso non sapevamo esattamente cosa sarebbe successo, ci aspettavamo un'espansione rapida delle cellule CAR T ed eravamo impreparati ad affrontare un'attesa più lunga. Dopo una settimana dall'infusione, finalmente, il paziente ha sviluppato la febbre, con grande gioia e sollievo di tutti, perché sapevamo che questo sintomo poteva essere associato a un'espansione delle cellule infuse, che effettivamente c'è stata. Il bambino ha risposto assai bene al trattamento e ancora oggi, a distanza di 21 mesi, è in remissione completa della sua malattia leucemica, un risultato straordinario.

Guardando al futuro, avete nuovi progetti in cantiere che coinvolgono cellule CAR T?

Sì, più d'uno e su vari fronti. Per esempio, grazie a una sponsorizzazione dell'AIRC stiamo sviluppando un approccio con cellule CAR T- bi-specifiche per il trattamento di pazienti con leucemia linfoblastica acuta ricaduta/refrattaria, con l'obiettivo di ridurre il numero di recidive CD19 negative. In particolare abbiamo messo a punto un CAR bi-specifico capace di riconoscere contemporaneamente gli antigeni CD19 e CD22, grazie alla presenza di due siti di riconoscimento degli antigeni bersaglio sullo stesso costrutto. Lo sviluppo preclinico è già in una fase molto avanzata: i test *in vitro* sono finiti e stiamo ultimando quelli *in vivo* sul modello murino. Poi stiamo focalizzando la nostra attenzione anche su patologie diverse rispetto a quelle sulle quali già stiamo facendo studi clinici: per esempio, la leucemia mieloide acuta, per la quale stiamo sviluppando cellule che esprimono un CAR diretto contro l'antigene CD123 non più derivate da cellule T, bensì da cellule NK, cioè cellule CAR NK, e allogeneiche, che si potrebbero produr-



re in grande quantità. Questo permetterebbe di ampliare notevolmente il numero di pazienti che potrebbero accedere a questa terapia e di rendere possibili anche somministrazioni multiple, anziché una singola infusione, qualora il paziente dovesse recidivare. Inoltre, nel caso di un target come CD123, espresso oltre che dalle cellule leucemiche anche dalle staminali emopoietiche normali, partire da cellule quali le NK, che non generano memoria, come accade invece con le cellule T, consente di ottenere un prodotto con un profilo di sicurezza maggiore. Infine, abbiamo in cantiere anche un progetto nel quale si stanno mettendo a punto cellule CAR T anti-CD30 per il trattamento dei tumori CD30+: linfoma di Hodgkin, linfoma anaplastico a grandi cellule, linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) CD30+ e carcinoma embrionale. È già stata conclusa tutta la parte di sviluppo preclinico *in vitro* e *in vivo*, mentre l'officina farmaceutica sta lavorando alla produzione del vettore virale da utilizzare nello sviluppo clinico, che dovrebbe partire entro l'anno prossimo.



L'officina farmaceutica dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù

Tutte le cellule CAR T somministrate ai pazienti nell'ambito degli studi clinici in corso presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù sono preparate in una *cell factory* interna all'ospedale (Cell Factory OPBG). Costruita tra il 2011 e il 2014, questa officina farmaceutica, nella quale lavora al momento un team di 20 persone, occupa una superficie di 1300 mq e consta attualmente di cinque stanze per la terapia cellulare, tre stanze per la terapia genica e una stanza per la produzione dei vettori virali utilizzati per la manipolazione genetica delle cellule, tutti laboratori aseptici operanti in conformità con gli standard delle *Good Manufacturing Practices* (GMP).

Nel 2015, l'officina ha ricevuto dall'Aifa l'accreditamento per la produzione e il rilascio di terapie cellulari e nel 2017 l'autorizzazione per la produzione delle terapie geniche e delle cellule CAR T. Attualmente, il processo di produzione delle CAR T, dallo scongelamento del materiale ottenuto con la leucaferesi fino al congelamento delle cellule T ingegnerizzate, occupa una stanza per 15 giorni, per cui ogni stanza può ospitare circa due produzioni al mese, per una capacità produttiva totale di sei terapie al mese.

Una volta terminata la produzione, le cellule CAR T devono essere sottoposte a rigorosi controlli di qualità, che richiedono altri 15 giorni, per garantire la purezza microbiologica del preparato da infondere nel paziente e l'attività delle cellule CAR T. Considerando che anche il prodotto dell'aferesi, prima di arrivare all'officina farmaceutica, deve essere sottoposto a test di sicurezza che impiegano circa 7 giorni, dal momento del prelievo delle cellule T alla loro reinfusione nel paziente dopo la manipolazione genetica con l'introduzione del gene del CAR passano, al momento attuale, circa 5 settimane.

Bergamo e Monza insieme nella ricerca sulle CAR T-cells

L'Ospedale San Gerardo di Monza, con la Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma, e l'Ospedale Papa Giovanni XXXIII di Bergamo sono tra i pochi centri italiani provvisti di una *cell factory* in grado di produrre CAR T-cells sviluppate in un contesto accademico, diverse dai due prodotti industriali ad oggi approvati dalle agenzie regolatorie. I due centri hanno messo a punto linfociti ingegnerizzati particolari, denominati CARCIK cells, e stanno collaborando attivamente al loro sviluppo clinico con uno studio di fase 1/2a, già partito. In quest'intervista, il professor **Alessandro Rambaldi**, dell'Università degli Studi di Milano e direttore del Dipartimento di Ematologia e Oncologia dell'Ospedale Papa Giovanni XXXIII, spiega com'è nato questo progetto, quali sono le peculiarità delle cellule CARCIK e quali sono le prospettive di impiego e lo sviluppo del trial clinico che coordina assieme al professor **Andrea Biondi**, direttore della Clinica Pediatrica dell'Università di Milano Bicocca e della Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma.

Professore, a chi sono destinate le CARCIK cells che state sviluppando qui a Bergamo in collaborazione con il centro di Monza del professor Biondi?

I pazienti arruolati in questo studio hanno una leucemia linfoblastica acuta a precursori B, recidivata dopo il trapianto allogenico e resistente anche ai farmaci più innovativi oggi disponibili sul mercato come blinatumomab e inotuzuamb. Si tratta, quindi, di un gruppo di pazienti molto compromes-

Il professor
Alessandro
Rambaldi



Il professor
Andrea Biondi

si e in uno stadio avanzato della malattia, che non avrebbero altrimenti altre opzioni terapeutiche a disposizione. Un elemento distintivo e innovativo del nostro progetto è insito nel fatto che il trattamento è destinato pazienti sia pediatrici sia adulti. Ricordo che l'unico prodotto industriale finora approvato dall'Fda e dall'EMA per la leucemia linfoblastica acuta (tisagenlecleucel, ndr) è indicato solo per il bambino e il giovane adulto di età fino a 25 anni. Con le nostre CARCIK speriamo di offrire una chance anche a pazienti di età più avanzata.

Quali sono le basi di questo progetto?

Per i pazienti che ricadono dopo un trapianto di cellule staminali allogeniche, da più di 10 anni è attivo presso i nostri un progetto di ricerca che prevede l'utilizzo di un sottotipo particolare di linfociti T citotossici chiamati citokine-induced killer (CIK) cells, che hanno caratteristiche biologiche comuni alle cellule natural killer (NK) e ai linfociti T. Queste cellule si ottengono *in vitro* dopo stimolazione con un anticorpo anti-CD3, interferone gamma e IL-2 umana ricombinante. Questa procedura di laboratorio, relativamente semplice, permette l'espansione di queste cellule che esprimono marcatori di superficie tipici delle cellule NK (CD56) e dei linfociti T citotossici (CD3 e CD8). In questo modo, le CIK cells acquisiscono una doppia funzione di cellule sia T sia NK, mantenendo la specificità delle cellule T e acquisendo anche una citotossicità antitumorale non specifica simile a quella delle cellule NK. Nei nostri studi abbiamo già dimostrato che le infusioni di queste cellule ottenute da donatori allogenici sono sicure e non inducono GvHD. I nostri dati di laboratorio e clinici sono stati riprodotti dal gruppo della Stanford University coordinato dal professor Robert Negrin e dal gruppo pediatrico del professor Peter Bader di Francoforte.



Prof. Andrea Biondi

Le CARCIK cells, una nuova speranza per la leucemia linfoblastica acuta

 **GUARDA IL VIDEO**

Dunque, le vostre CARCIK sono cellule allogene?

Esattamente. Il nostro progetto prevede, appunto, l'impiego di questa piattaforma cellulare che ci consente di utilizzare cellule di donatori sani allogenici. Il nostro obiettivo, infatti, è quello di arrivare ad avere un prodotto *'off the shelf'*, pronto da utilizzare al momento del bisogno, superando così l'ostacolo dei tempi lunghi che attualmente caratterizzano la produzione delle CAR T-cells autologhe, un problema di non poco conto per pazienti che sono in condizioni molto critiche e che, a volte, non riescono a sopravvivere fino al momento in cui le CAR T-cells saranno pronte. Produrre le cellule a partire da un donatore, inoltre, offre il vantaggio di ottenere cellule di una persona sana, che non è mai stata sottoposta a chemioterapie e non ha mai avuto, per esempio, complicanze infettive. Partendo da un paziente che è già stato esposto a molti trattamenti, invece, non sempre le cellule riescono a crescere bene in coltura e la produzione, non di rado, falli-

sce. È possibile, inoltre, che le cellule ottenute da un donatore sano possano rimanere vitali e circolanti nel sangue del paziente per un periodo più lungo.

Che caratteristiche ha il CAR delle CARCIK cells che state sviluppando?

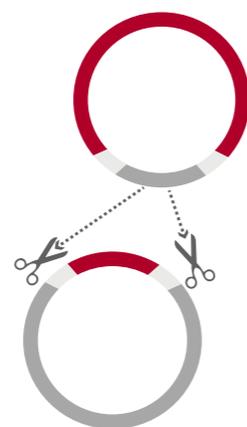
Al di là dell'aspetto di innovatività rappresentato dalle cellule di partenza, un altro elemento che contraddistingue le nostre CARCIK è modalità della trasduzione, cioè l'inserimento nelle cellule del gene del CAR capace di riconoscere l'antigene espresso dai linfociti B leucemici. Infatti, la nostra procedura di laboratorio non prevede l'uso di un vettore retrovirale o lentivirale, bensì una elettroporazione di trasposoni messa a punto dalla dottoressa Chiara Magnani nei laboratori della Fondazione Tettamanti di Monza. La nostra ipotesi di lavoro è

che l'utilizzo di questa tecnologia possa semplificare la produzione di cellule geneticamente modificate, facilitandone in teoria lo *scale-up* industriale; per ora, tuttavia, questa è solo un'ipotesi che deve essere ancora validata. Una volta integrato nel genoma della cellula CIK e tradotto, il nostro gene chimerico dà origine a un CAR di terza generazione, costituito fonda-



I trasposoni sono elementi mobili del DNA presenti naturalmente nel genoma (che non necessitano di omologia di sequenza). SB è un vettore non virale ricostruito da un transposone a DNA della superfamiglia Tc1/mariner

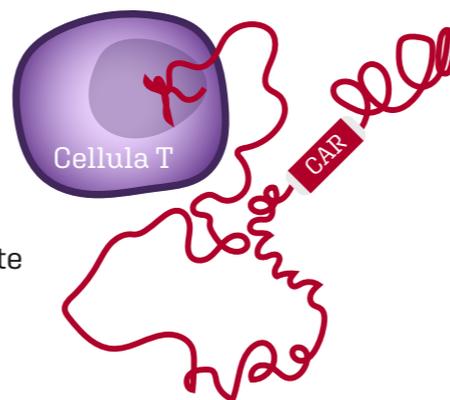
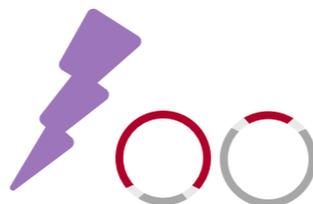
Plasmide con trasposone SB



Plasmide contenente il gene del CAR

Courtesy of CF Magnani.

Elettroporazione



L'elettroporazione sfrutta un impulso elettrico per creare pori temporanei nelle membrane cellulari

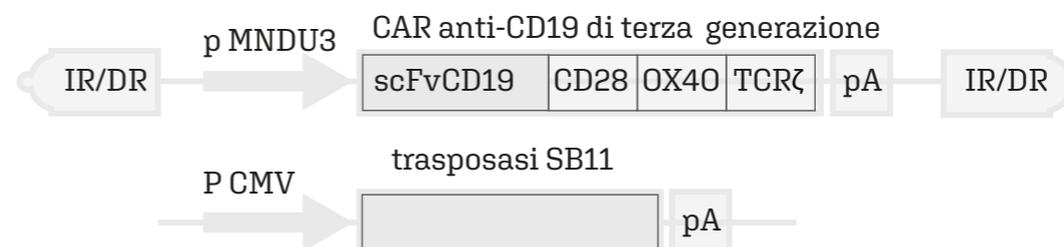


Figura. Nelle CARCIK cells sviluppate a Bergamo e Monza, il gene del CAR viene introdotto nelle cellule da trasdurre non con un vettore virale, bensì con un trasposone.



mentalmente da un dominio extracellulare di riconoscimento dell'antigene bersaglio, che è il CD19 (così come nei due prodotti commerciali già autorizzati), due domini co-stimolatori (CD28 e OX40), e un dominio di attivazione (CD3-zeta).

Dove vengono prodotte attualmente queste cellule?

Al momento, la produzione delle nostre CARCIK è concentrata nella *cell factory* dell'Ospedale San Gerardo, a Monza, perché l'investimento iniziale necessario, ottenuto interamente grazie a finanziamenti erogati dalle associazioni dei pazienti, è stato molto oneroso e non era logico duplicare i costi. Poiché l'arruolamento dei pazienti nello studio già partito sta andando bene, ci stiamo preparando a chiedere l'estensione della produzione anche per la *cell factory* di Bergamo, presso il laboratorio di Terapia Cellulare "G. Lanzani", diretto dal dottor Martino Introna.

A che punto siete con lo sviluppo clinico?

I test preclinici sono stati conclusi con successo ed è iniziato lo sviluppo clinico, anche se siamo ancora in una fase molto preliminare. È già stato avviato uno studio di fase 1/2a registrato su clinicaltrials.gov (NCT03389035), che vede coinvolti pazienti pediatrici e adulti affetti da leucemia linfoblastica acuta da precursori delle cellule B, refrattari o ricaduti dopo un trapianto di cellule staminali. Il professor Biondi è il referente per la parte pediatrica, che si svolge a Monza, mentre io sono il referente per la parte sull'adulto, che ha luogo qui a Bergamo.

Quali sono gli obiettivi e il disegno dello studio?

È un trial a braccio singolo, in aperto, i cui obiettivi principali sono determinare la dose massima tollerata, la dose raccomandata per la fase 2 e la sicurezza di una singola infusione di CARCIK cells anti-CD19. I pazienti vengono trattati a gruppi di tre con dosi crescenti di prodotto, finché compaiono tossicità dose-limitanti. I primi pazienti hanno ricevuto dosi cellulari che sono state poi progressivamente aumentate secondo un programma concordato con le autorità regolatorie.

Che risultati avete ottenuto finora?

Finora abbiamo trattato i primi 15 pazienti. Il profilo di tossicità è apparso molto buono, con un solo caso di CRS e impegno respiratorio. Abbiamo raggiunto il quarto livello di dose cellulare senza incontrare una tossicità dose-limitante e confermato l'assenza di GvHD anche quando il donatore allogenico era aploidentico. Alle dosi più alte abbiamo anche ottenuto evidenza di attività clinica.

Quando e dove contate di presentare i primi dati?

Abbiamo già presentato i nostri primi risultati con comunicazioni orali all'ultimo congresso dell'ASH, nel dicembre



2018, e nel giugno scorso ad Amsterdam, nel corso del meeting della Società Europea di Ematologia (EHA). Porteremo ora nuovi dati al prossimo congresso dell'ASH, fra meno di un mese, a San Diego.

In prospettiva, pensate di sviluppare le vostre CARCIK come trattamento anche per altre patologie, oltre alla leucemia linfoblastica acuta?

Tutte le malattie linfoproliferative dei linfociti B che esprimono l'antigene CD19 (come i linfomi) rappresentano un target potenziale delle nostre cellule. Stiamo lavorando in laboratorio su molte ipotesi, tra cui la leucemia mieloide acuta, per la quale ci sono grosse difficoltà nello sviluppo di CAR T-cells adeguate, perché finora non si sono trovati target così validi come lo è CD19 per la leucemia linfoblastica acuta e il linfoma diffuso a grandi cellule B. In questo momento, però, il nostro obiet-

tivo scientifico principale resta concentrato sulla possibilità di avere un prodotto *'off the shelf'* prontamente disponibile, e in questo senso una delle ipotesi sulle quali i nostri gruppi di ricerca stanno lavorando intensamente è utilizzare come cellule di partenza linfociti T ricavati da unità di cordone ombelicale criopreservate. Queste cellule, infatti, sono in gran parte naïve, e quindi non sono ancora state polarizzate nella risposta immunologica. Analogamente a quanto accade nella scelta di queste unità per eseguire trapianti di cellule staminali emopoietiche, riteniamo che il livello di compatibilità richiesto per un potenziale ricevente di CAR T-cells potrebbe essere ridotto. Dalle unità di cordone ombelicale criopreservate e non utilizzate a fini trapiantologici, quindi, potrebbe essere possibile ottenere grandi quantità di CAR T T-cells, per molti pazienti.

In futuro, se le vostre CARCIK cells si dimostreranno efficaci, si potrà accedere a questa terapia solo qui da voi e al San Gerardo di Monza o è possibile che l'Aifa autorizzi l'impiego del prodotto anche in altri centri?

Le nostre CARCIK non sono state sviluppate a fini commerciali. Se risulteranno un trattamento valido, non è escluso che possano essere sottoposte anche a uno sviluppo di tipo industriale, al fine di ampliare la platea di pazienti che potrebbero avere accesso al trattamento. Fermo restando, tuttavia, che il nostro progetto è stato concepito e implementato con una filosofia *no profit*, per fare ricerca e per dare un contributo al progresso scientifico.

Lo studio che ci ha descritto è un progetto di ricerca indipendente. State partecipando anche a studi sponsorizzati dalle aziende?

Lo studio in corso è un progetto accademico sponsorizzato dalla Fondazione Matilde Tettamanti Menotti De Marchi *onlus*,

con finanziamenti ricevuti da agenzie pubbliche, l'AIRC in primis, nell'ambito di un programma europeo più ampio chiamato Accelerator Award, finalizzato allo sviluppo di terapie oncologiche d'avanguardia. Inoltre, abbiamo ricevuto finanziamenti anche da Formula Pharmaceuticals, una *biotech* americana. Non siamo quindi in competizione con l'industria, anzi. Il centro del professor Biondi ha partecipato allo studio registrativo che ha portato all'approvazione di tisagenlecleucel per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta. Il nostro centro di Bergamo ha partecipato allo studio registrativo KarMMa, uno studio sponsorizzato da Celgene nel quale si stanno studiando CAR T-cells dirette contro l'antigene BCMA espresso sulle plasmacellule di pazienti con mieloma multiplo. Inoltre, è partito da poco un programma di accesso compassionevole alle CAR-T-cells prodotte da Kite/Gilead per il trattamento di pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B, al quale il nostro centro aderisce. La storia dell'immunoterapia con le CAR T-cells è solo all'inizio e c'è bisogno di tutti.

I due prodotti 'industriali' autorizzati poco più di un anno fa dall'Ema hanno avuto di recente anche il via libera dell'Aifa. Ora che sono disponibili anche in Italia, pensate di utilizzarli nel vostro centro?

Possediamo tutti i requisiti necessari per poter somministrare questa terapia cellulare innovativa ai pazienti che ne hanno bisogno. Quindi, daremo tutta la nostra disponibilità quando saremo autorizzati dalle autorità competenti nazionali e regionali.

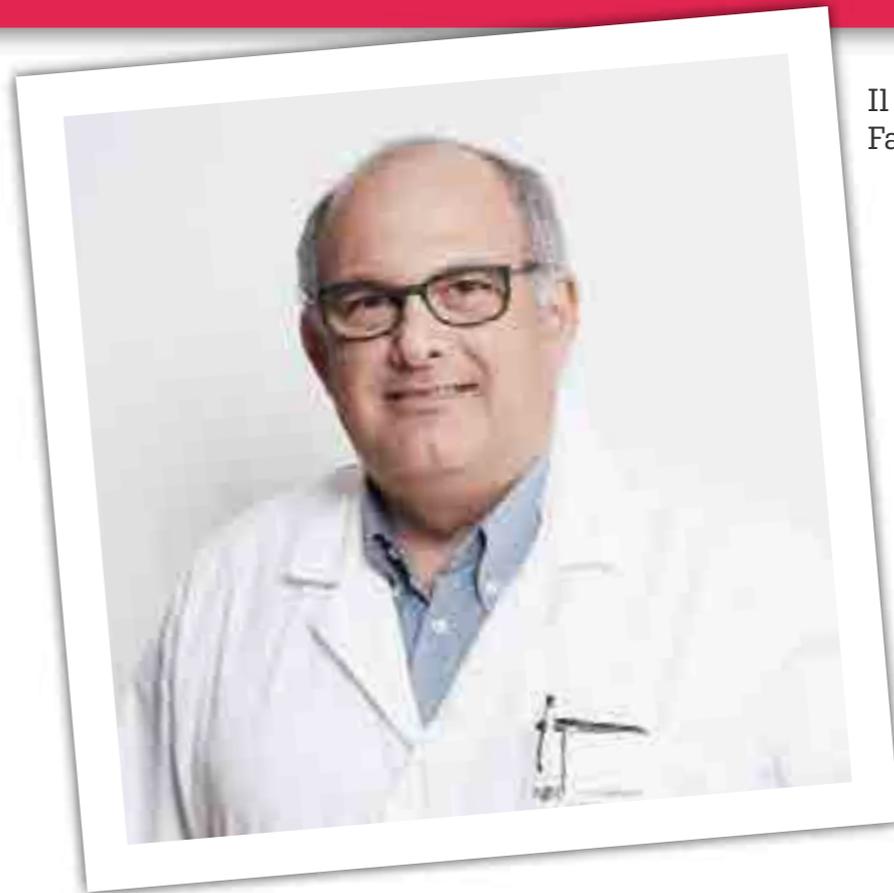


Le CAR T-cells sviluppate al San Raffaele di Milano

L'IRCCS Ospedale San Raffaele di Milano è uno dei centri italiani in cui si fa ricerca indipendente sulle CAR T-cells e nei suoi laboratori sono state messe a punto CAR T-cells originali, note per ora con la sigla CAR T CD44v6, diverse per vari aspetti – a partire dalle patologie per le quali sono state sviluppate – dai due prodotti commerciali già approvati dall'Fda, dall'Ema, e ora anche dall'Aifa (tisagenlecleucel e axi-cel). Scopriamo come si è arrivati a queste cellule e quali sono le loro prospettive di impiego e di sviluppo in quest'intervista al professor **Fabio Ciceri**, Direttore dell'Unità di Ematologia e Trapianto Midollo Osseo dell'IRCCS Ospedale San Raffaele di Milano.

Professor Ciceri, come e quando è nata l'idea delle cellule CAR-T sviluppate al San Raffaele?

Il progetto di curare i tumori con un'immunoterapia cellulare basata sull'impiego di linfociti umani geneticamente modificati scaturisce da un'idea che ha preso corpo al San Raffaele più di 25 anni fa. Il nostro Istituto, infatti, ha una tradizione di ricerca preclinica e di applicazione clinica dell'immunoterapia con manipolazione *ex vivo* di cellule immunitarie che nasce nei primi anni '90, con i primi studi del Professor Claudio Bordignon e della Dottoressa Chiara Bonini. Il progetto sulle CAR T-cells, nello specifico, è nato 7-8 anni fa nel laboratorio della dottoressa Bonini, che è stato uno dei primi in Europa a scommettere su questa tecnologia, in particolare per impegno del dottor Attilio Bondanza. Bondanza e il suo gruppo si sono messi al lavoro innanzitutto con l'obiettivo di identificare un antigene target che soddisfacesse due requisiti fundamenta-



Il professor
Fabio Ciceri

li: essere espresso in modo selettivo sulle cellule tumorali, ma non sulla loro controparte normale, ed essere un antigene cosiddetto *driver*, avente, cioè, un ruolo nella biologia del tumore e nella sua progressione, e quindi non solo un semplice bersaglio immunologico, ma di per sé una struttura che contribuisce con la sua funzione alla trasformazione tumorale della cellula.

La ricerca di quest'antigene dove vi ha portato?

Dopo vari screening si è identificato come target CD44v6, cioè la variante 6 della glicoproteina di superficie CD44. Si tratta di un antigene mai impiegato prima d'ora in terapie con CAR T-cells, che è espresso in modo molto costante da popolazioni

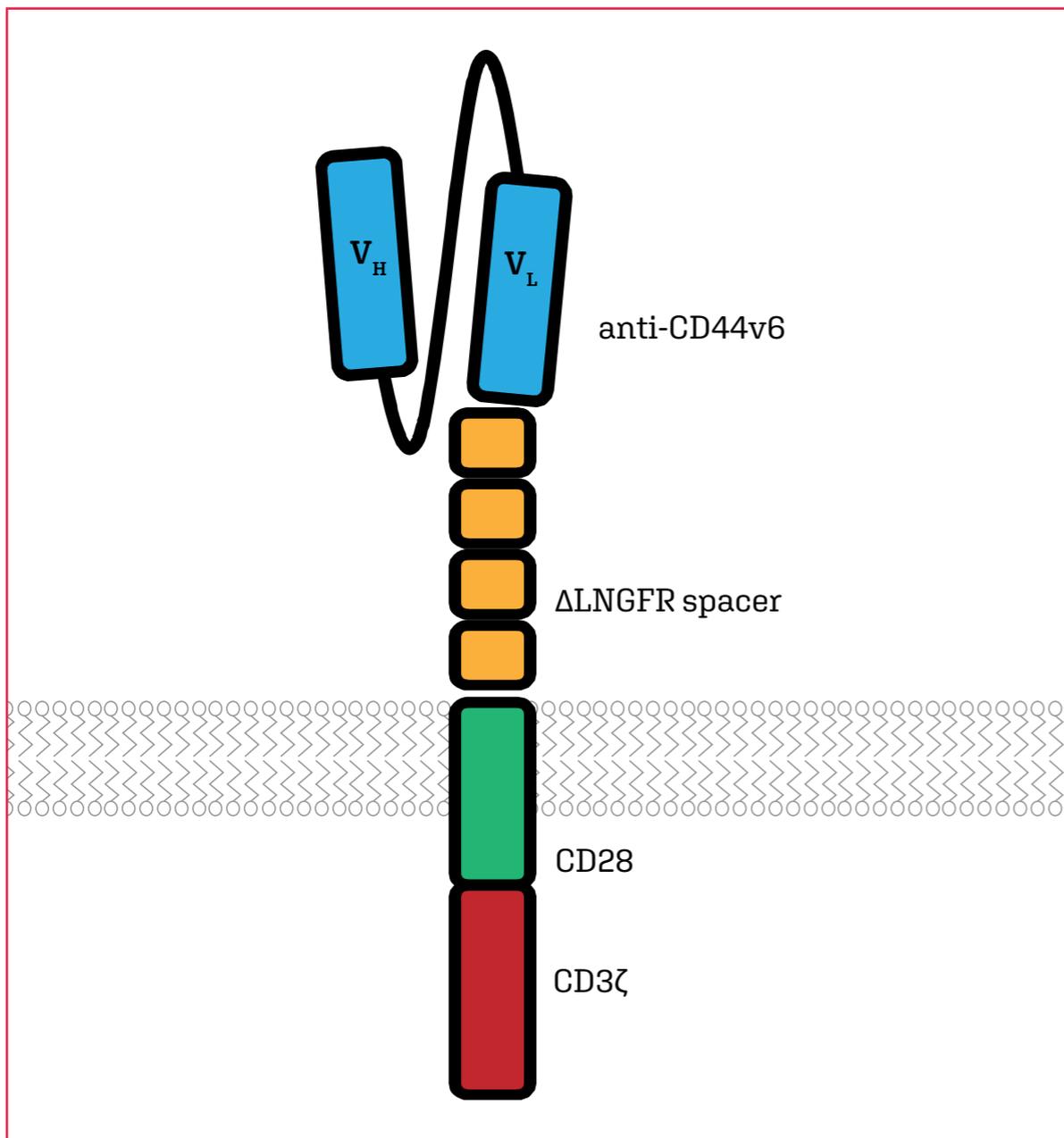


bersaglio valido CD44v6, si è passati alla costruzione del gene chimerico codificante un CAR capace di riconoscere quest'antigene, da utilizzare per produrre CAR T-cells destinate al trattamento di pazienti affetti da mieloma multiplo o leucemia acuta mieloide.

Che struttura ha il CAR da voi messo a punto e quali sono le sue specificità?

Il costrutto che abbiamo sviluppato è un CAR di seconda generazione che presenta tre importanti elementi di innovazione. Il primo, come abbiamo visto, è l'antigene bersaglio, CD44v6, che rappresenta una prima assoluta. La porzione extracellulare è costituita da un frammento di anticorpo a catena singola (scFv) in grado di riconoscere l'antigene CD44v6 più una regione spaziatrice (*spacer*) di collegamento con la porzione intracellulare, che contiene un dominio di segnalazione e un dominio co-stimolatorio. Il dominio di segnalazione è CD3 zeta, lo stesso dei due prodotti commerciali già approvati dall'Fda e dall'Ema. Come dominio co-stimolatorio la scelta è caduta su CD28, al fine di ottenere un'espansione delle CAR T infuse il più rapida possibile: un requisito importante a fronte di tumori a crescita rapida o comunque aggressivi, come un mieloma o una leucemia acuta mieloide in fase avanzata. Il secondo elemento di innovazione del nostro costrutto riguarda lo *spacer*, una struttura in genere poco descritta tra le caratteristiche del CAR, ma che ha un ruolo critico nella sua funzionalità, in particolare la capacità di orientarsi nello spazio e quindi la sua affinità nei confronti dell'antigene. *Spacer* diversi, infatti, conferiscono allo stesso CAR funzionalità differenti. Per le nostre CAR T-cells abbiamo scelto come *spacer* una porzione troncata del *nerve growth factor receptor* (NGFR), che rappresenta anche un prezioso strumento di monitoraggio delle cellule, in quanto permette di tracciarle *in vivo* utilizzando un anticorpo anti-NGFR. Infine, come terzo elemento di novità, al fine di aumentare il profilo di sicurezza del prodotto abbiamo inserito nel no-

cellulari di mieloma multiplo e di leucemia acuta mieloide e che svolge una funzione molto importante nel traffico di queste cellule nell'organismo, perché è un'integrina dotata di una struttura che permette loro, facendo da ponte, di agganciarsi sull'endotelio dei piccoli vasi, penetrare nel tessuto e quindi diffondere. Ne abbiamo quindi valutato l'espressione su un ampio pannello di tumori primari contenuti nella nostra biobanca istituzionale, che raccoglie il materiale biologico di tutti i pazienti diagnosticati in istituto, non solo alla diagnosi ma anche durante il decorso della malattia, e quindi al momento delle eventuali recidive. Queste analisi hanno evidenziato che CD44v6 è un antigene espresso costantemente dalle cellule del mieloma multiplo, ma non dalla loro controparte sana, le plasmacellule, e dalle cellule della leucemia acuta mieloide, ma non dalle cellule staminali ematopoietiche. Nello sviluppo di CAR T-cells per la leucemia acuta mieloide, infatti, una delle sfide da superare è proprio quella di identificare dei target che non siano espressi dalla cellula staminale normale, perché, in tal caso, qualunque effetto tossico sul tumore lo sarebbe anche sull'emopoiesi normale. Una volta individuato come



Struttura del CAR delle CAR T-cells CD44v6.

stro CAR un gene suicida inducibile, che si può attivare con il farmaco antivirale ganciclovir qualora si sviluppino reazioni avverse gravi.

Dove vengono prodotte le CAR T-cells che avete messo a punto?

Il CAR e tutto il processo di produzione delle CAR T-cells anti-CD44v6 – dalla trasduzione delle cellule con il vettore retro-

virale che vi inserisce il gene del CAR, alla loro espansione con un cocktail di citochine omeostatiche (IL-15 e IL-17) finalizzato a preservare il più possibile la staminalità, fino ad arrivare al prodotto finito, pronto da infondere nel paziente – sono stati messi a punto nei nostri laboratori. Nel 2015, però, tutto il pacchetto è stato acquisito da MolMed, una *biotech* nata nel 1996 come *spin-off* accademico dell'Istituto Scientifico San Raffaele, che dal marzo 2008 è una società autonoma quotata alla borsa di Milano ed è provvista di tutti i requisiti e le strutture per poter produrre queste cellule rispettando le norme della GMP. Sarà dunque MolMed a trasformare in CAR T-cells le cellule T che noi preleveremo dal paziente e invieremo loro, per poi restituirci le cellule ingegnerizzate da infondere nello stesso paziente.

A che punto siete con lo sviluppo del prodotto?

È stato completato con successo lo sviluppo preclinico ed è partita la sperimentazione clinica. Il 20 marzo 2019 l'Aifa ha dato il suo via libera all'avvio in Italia di uno studio clinico multicentrico di fase 1/2, il primo sull'uomo, sulle CAR T-cells CD44v6 per il trattamento di pazienti con leucemia mieloide acuta e mieloma multiplo recidivati o refrattari. Lo studio rientra in un progetto finanziato dalla Commissione europea, chiamato Horizon 2020 EURE-CART (EUROpean Endeavour for Chimeric Antigen Receptor Therapies), di cui MolMed è coordinatore e sponsor e il San Raffaele è il centro coordinatore per la parte clinica. Oltre al nostro Istituto, parteciperanno altri quattro centri: uno italiano (l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, per la parte pediatrica) e tre di altri Paesi europei (Spagna, Germania e Repubblica Ceca). Questo progetto è interessante anche perché è un esempio di partnership pubblico-privato che rappresenta un modello virtuoso di finanziamento pubblico di un'impresa privata (MolMed), la quale ha peraltro investito in un progetto nato in ambito accademico, cioè all'interno del San Raffaele.



Che cosa vi aspettate dal punto di vista della sicurezza delle CAR T CD44v6?

In linea generale, le possibili tossicità sono quelle ormai note delle CAR T-cells, tra cui la neurotossicità e la CRS, cioè la sindrome da rilascio delle citochine. Dal punto di vista della tossicità ematologica, tra le cellule emopoietiche normali CD44v6 è espresso solo sui monociti maturi (ma non sui loro precursori); pertanto, monitoreremo con attenzione la possibile comparsa di monocitopenie prolungate. È possibile, infatti, che per effetto delle CAR T-cells anti-CD44v6 si osservi una deplezione dei monociti maturi, ma ciò non dovrebbe compromettere l'attività monocito-macrofagica, dal momento che tutto il lineage progenitore del monocita maturo non esprime l'antigene target e viene quindi risparmiato dalle CAR T-cells dirette contro di esso. Un punto interrogativo specifico di queste CAR T-cells è che, al di fuori dell'ambito ematologico, CD44v6 è espresso anche dalle cellule degli strati basali dell'epidermide. Almeno in linea teorica, quindi, è possibile la comparsa di una tossicità cutanea, che comunque non dovrebbe essere grave, dal momento che i test *in vitro* e quelli *in vivo* sul modello animale hanno dimostrato che le CAR T-cells non raggiungono un livello di targeting del CD44v6 espresso dalle cellule epiteliali paragonabile a quello che si ha nei confronti del tumore. In ogni caso, per contrastare questa e altre possibili tossicità gravi è stato inserito nel costrutto del CAR un gene suicida al quale ho già accennato, di cui oggi MolMed detiene il brevetto: il gene della timidina chinasi, un sistema che già conosciamo bene e sul quale lavoriamo da 25 anni.

Come funziona il gene suicida inserito nelle CAR T CD44v6?

Il meccanismo è quello con il quale già siamo in grado di controllare la GvDH nel setting del trapianto aplo-identico, con un prodotto di MolMed chiamato Zalmoxis®, basato su linfo-

Come si svolgerà lo studio?

È già stato aperto l'arruolamento. La fase 1 è un tipico studio di *dose-finding* volto a stabilire la sicurezza del trattamento e la dose massima tollerata. Testeremo tre dosi – 0,5, 1 e 2 milioni di cellule/kg – e il numero di pazienti da trattare con ciascuna non è prefissato, ma dipenderà dalle tossicità che osserveremo, per un totale di massimo 16 pazienti. L'arruolamento sarà competitivo tra i centri, per cui quando MolMed offrirà uno slot per la produzione delle CAR T-cells, il primo centro che avrà un paziente disponibile idoneo al trattamento lo prenoterà e una volta ricevute dalla *biotech* le cellule ingegnerizzate, le infonderà nel paziente. La fase 2, nella quale si valuterà anche l'efficacia di questa terapia, coinvolgerà altri 28 pazienti. Al di là di questo studio, nel quale si utilizzeranno le CAR T-cells sviluppate originariamente nel nostro Istituto, mi preme sottolineare che il San Raffaele possiede anche tutte le qualifiche previste dalle normative italiane e internazionali per poter trattare i propri pazienti con i due prodotti commerciali già approvati dall'EmA a base di CAR T-cells anti-CD19.

citi del donatore nei quali è stato inserito il gene suicida. Qualora il paziente sviluppi un effetto avverso grave – tipicamente, nel caso della terapia con le CAR T-cells, una neurotossicità o una CRS di grado elevato –, la tossicità si può ‘spegnere’ somministrando l’antivirale ganciclovir. L’inibizione della timidina chinasi da parte del farmaco impedisce la produzione di un metabolita necessario per il metabolismo cellulare, inducendo quindi l’apoptosi della cellula.

Lo studio clinico che sta per partire riguarda dunque l’impiego delle CAR T CD44v6 contro due tumori ematologici: mieloma multiplo e leucemia acuta mieloide. È in programma una sperimentazione di queste cellule anche contro i tumori solidi?

Siamo ancora ben lontani dalla clinica, ma c’è una linea di sviluppo potenziale su cui MolMed sta lavorando. CD44v6, infatti, oltre che dalle cellule del mieloma multiplo e della leucemia acuta mieloide, è espresso anche da linee epiteliali tumorali e può essere espresso in molti tumori solidi epiteliali, e in particolare dal carcinoma pancreatico, da quello mammario e da quello del distretto testa-collo, nei quali contribuisce alla diffusione metastatica.



Il ruolo di MolMed nella ricerca italiana sulle CAR T-cells

In Italia, si fa ricerca sulle CAR T-cells non solo in ambito accademico, ma anche in un'azienda privata, MolMed, una realtà lombarda che gioca un ruolo di primo piano nello sviluppo di questa rivoluzionaria immunoterapia cellulare. Parliamo delle attività di questa *biotech*, con uno sguardo anche alle molteplici sfide che l'arrivo delle terapie a base di CAR T-cells pone al sistema, con **Riccardo Palmisano**, amministratore delegato di MolMed e presidente di Assobiotec.

Dottor Palmisano, innanzitutto, che cos'è MolMed? Com'è nata e qual è la sua storia?

MolMed è un'azienda biotecnologica impegnata nella ricerca, sviluppo, produzione e validazione clinica di terapie geniche e cellulari per la cura di tumori e malattie rare, e può essere definita a pieno titolo una delle società pioniere a livello internazionale nell'ambito delle cosiddette terapie avanzate. Nata più di 20 anni fa, nel 1996, come *spin-off* dell'Istituto Scientifico San Raffaele di Milano, uno dei primi centri ad aver pubblicato studi scientifici sulla terapia genica e cellulare, nel 2008 viene quotata in borsa, sul mercato MTA di Borsa Italiana, e diventa la prima società – e tuttora una delle pochissime – operativa nel settore delle scienze della vita quotata in Italia. Nata come azienda di sviluppo di servizi per supportare i protocolli clinici delle terapie sperimentali del San Raffaele, MolMed si evolve rapidamente, diventando una vera e propria azienda biofarmaceutica di ricerca e sviluppo di prodotti proprietari, attività alla quale successivamente aggiunge la produzione di vettori virali e di cellule geneticamente modificate per conto di un numero crescente di clienti italiani e internazionali.



Il dottor
Riccardo
Palmisano

Per far fronte all'incremento delle attività, dovuto anche a un momento storico di grande fermento e sviluppo delle terapie innovative geniche e cellulari, MolMed ha affiancato all'unità produttiva del San Raffaele, una nuova *facility*, presso il campus scientifico OpenZone di Bresso, a nord di Milano, che ha permesso di triplicare i metri quadri dei laboratori e il numero di stanze classificate per lo sviluppo e la produzione di vettori virali e cellule ingegnerizzate secondo standard GMP, superando i 5000 mq totali e avendo a disposizione circa 30 stanze di grado B/C. Le due strutture di MolMed sono le uniche ad aver ottenuto ad oggi in Europa l'autorizzazione per la produzione di terapie geniche e cellulari *ex vivo* destinate al mercato.



Qual è il prodotto più avanzato nello sviluppo nell'ambito della vostra *pipeline* proprietaria?

La nostra è una *pipeline* diversificata, anche dal punto di vista della fase di sviluppo dei vari prodotti. Abbiamo un prodotto, Zalmoxis® che è stato autorizzato dall'Ema alla commercializzazione in tutti i Paesi dell'Unione europea e ha già ottenuto la rimborsabilità in Italia e in Germania. Si tratta di una terapia cellulare personalizzata per il trattamento di pazienti adulti affetti da leucemie e altri tumori ematologici ad alto rischio, basata sull'ingegnerizzazione del sistema immunitario del donatore in associazione al trapianto di cellule staminali ematopoietiche aploidentico, cioè da un soggetto solo parzialmente compatibile con il ricevente. I linfociti T del donatore vengono ingegnerizzati in laboratorio in modo da esprimere un gene suicida inducibile, il gene della timidina chinasi del virus herpes simplex I (HSV-TK Mut2). Una volta infusi nei pazienti, questi linfociti facilitano l'effetto anti-leucemico, eliminando il ricorso alla profilassi immunosoppressiva post-trapianto e stimolando una rapida ricostituzione immunologica; questo è possibile perché il gene suicida permette di controllare prontamente l'eventuale insorgere della reazione del trapianto contro l'ospite, la GvHD, il più importante e grave effetto collaterale del trapianto aploidentico e fattore limitante di questa importante procedura, che deriva dalla disparità genetica tra paziente e donatore, nel quale le cellule del donatore aggrediscono i tessuti del paziente, con risultati spesso letali. L'inserimento del gene suicida consente di controllare la GvHD alla comparsa dei primi sintomi, poiché i linfociti coinvolti nelle reazioni di rigetto possono essere eliminati selettivamente grazie alla somministrazione di ganciclovir, un comune farmaco antivirale che attiva il gene suicida e induce la morte delle cellule responsabili di questa complicanza.

Quindi, come si configura oggi MolMed?

Da *start up* accademica dell'esordio, oggi MolMed ha largamente superato le 200 unità di personale ed è una realtà industriale di eccellenza in ambito *Cell & Gene*. Caratteristico della società è un vero e proprio *dual business model*, che affianca all'attività di R&S di terapie proprietarie quella di sviluppo e produzione per conto terzi di vettori e cellule ingegnerizzate, destinati alla cura di malattie rare e oncologiche. Per quanto riguarda i vettori, impieghiamo sia retrovirus sia, soprattutto, lentivirus, maggiormente utilizzati oggi per la trasduzione delle cellule. Negli ultimi 3 anni abbiamo ampliato molto il portafoglio clienti anche all'estero e oggi, oltre a lavorare con realtà italiane come la Fondazione Telethon e Genenta – una *biotech* piccola, ma molto promettente – abbiamo partnership con importanti aziende europee, a partire dal gigante inglese GlaxoSmithKline, passando per Orchard, recentemente quotata al Nasdaq, alla francese Celleris, anch'essa quotata al Nasdaq, fino all'americana Rocket Pharma, focalizzata sullo sviluppo di terapie geniche per la cura di alcune malattie rare, e al prestigioso Boston Children's Hospital, al quale forniamo vettori lentivirali.

MolMed sta giocando un ruolo molto importante anche nello sviluppo di CAR T-cells ‘made in Italy’.

Esattamente. Stiamo innanzitutto sviluppando le CAR T-cells CD44v6 e nel marzo scorso abbiamo ricevuto l'autorizzazione all'avvio della prima sperimentazione sull'uomo per il trattamento di pazienti con leucemia mieloide acuta e mieloma multiplo. Si tratta di un prodotto messo a punto in origine dai ricercatori del San Raffaele e acquisito nel 2015 da MolMed, che ne ha intuito le potenzialità quando ancora era in fase di sviluppo preclinico e lo ha ulteriormente sviluppato portandolo fino alla fase clinica, appena autorizzata. Consapevoli di non essere i pionieri assoluti in questo campo, abbiamo scelto di non fare una ricerca di inseguimento, ma di focalizzarci su qualcosa di originale. È per questo che si è evitato come antigene bersaglio il CD19, che è attualmente il più utilizzato negli studi sulle CAR T-cells, nonché quello su cui si basano le due terapie a base di CAR T-cells approvate dall'Fda e dall'EmA, ma ne limita l'impiego al trattamento di tumori ematologici di derivazione B linfocitaria. Abbiamo scelto, invece, un target com-

pletamente diverso: il CD44v6, un antigene finora mai impiegato come bersaglio in terapie con CAR T-cells, che è espresso da alcuni tumori ematologici come il mieloma multiplo e la leucemia mieloide acuta, ma anche da diversi tumori solidi, tra cui alcuni *big killer* quali gli adenocarcinomi del pancreas, della testa e del collo, dell'ovaio e altri. Da sottolineare che anche questo prodotto incorpora nel costrutto del CAR lo stesso gene suicida – di cui MolMed detiene il brevetto – che caratterizza Zalmoxis®, per aumentare la sicurezza del trattamento. Come detto, questo gene funziona come una sorta di ‘pulsante di controllo’: qualora dovesse manifestarsi un effetto avverso grave si può indurre la morte delle cellule responsabili della reazione avversa somministrando ganciclovir, in modo da ridurre l'impatto dell'eventuale effetto collaterale.

Di recente, il Ministero della Salute ha annunciato l'avvio del “Progetto Italia CAR T-cells”, messo a punto in collaborazione con l'Aifa e non ancora divulgato in dettaglio, che punta a

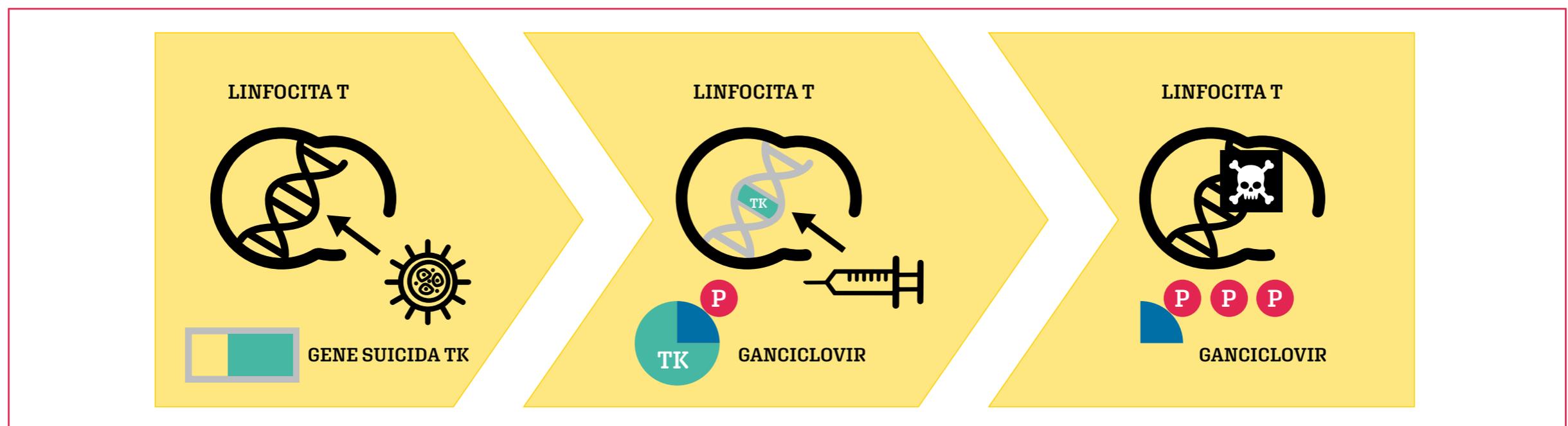


Figura. Meccanismo d'azione del gene suicida TK.



sviluppare una rete nazionale in grado di svolgere attività di ricerca, sulle CAR T-cells. Ne fa parte anche Molmed?

Sì, MolMed è l'unica azienda coinvolta nel gruppo di progetto, al quale partecipano rappresentanti di ricerca pubblici e di Istituti di ricovero e cura a carattere scientifico (Irccs) appartenenti alla rete di Alleanza contro il cancro. Come previsto dal Decreto del Ministero della Salute, il gruppo ha l'obiettivo di predisporre lo studio di fattibilità relativo alle nuove tecnologie antitumorali basate su CAR T-cells da presentare alla VII Commissione Cultura, Scienza e Istruzione della Camera dei deputati. Il Governo in prima persona ha identificato nelle CAR T-cells un'area importante per il futuro della salute dei cittadini e per la crescita della ricerca italiana; l'inclusione di MolMed ci sembra un riconoscimento dell'eccellenza raggiunta dalla nostra società a livello nazionale e non solo. La sostenibilità sarà certamente uno dei temi da affrontare, ma le soluzioni non possono essere semplicistiche come alcuni commentatori hanno ventilato in questo periodo.

A che punto siete con lo sviluppo delle CAR T-cells CD446v?

Come anticipato, a fine marzo l'Aifa ha autorizzato l'avvio in Italia della sperimentazione clinica sull'uomo, uno studio multicentrico europeo di fase 1/2 su pazienti con mieloma multiplo e leucemia mieloide acuta, coordinato da MolMed. Lo studio rientra nel progetto EURE-CART Horizon 2020 e oltre a due centri italiani – il San Raffaele e l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, quest'ultimo per la parte pediatrica – vi prenderanno parte altri tre centri altamente specializzati di Spagna, Germania e Repubblica Ceca. Per quanto riguarda i tumori solidi siamo in una fase un po' più precoce. Finora abbiamo testato le CAR T-cells CD44v6 su modelli preclinici di adenocarcinoma del polmone e di carcinoma ovarico, nei quali abbiamo dimostrato ad oggi che le cellule ingegnerizzate sono in grado di penetrare nel tumore – una delle maggiori sfide nello sviluppo di CAR T-cells per le neoplasie solide – e di ridurne in modo significativo le dimensioni, senza impattare sulle cellule epiteliali sane. Nel corso del 2019 contiamo di completare la fase preclinica e di mettere a punto il dossier per avviare i test sull'uomo anche sui tumori solidi.

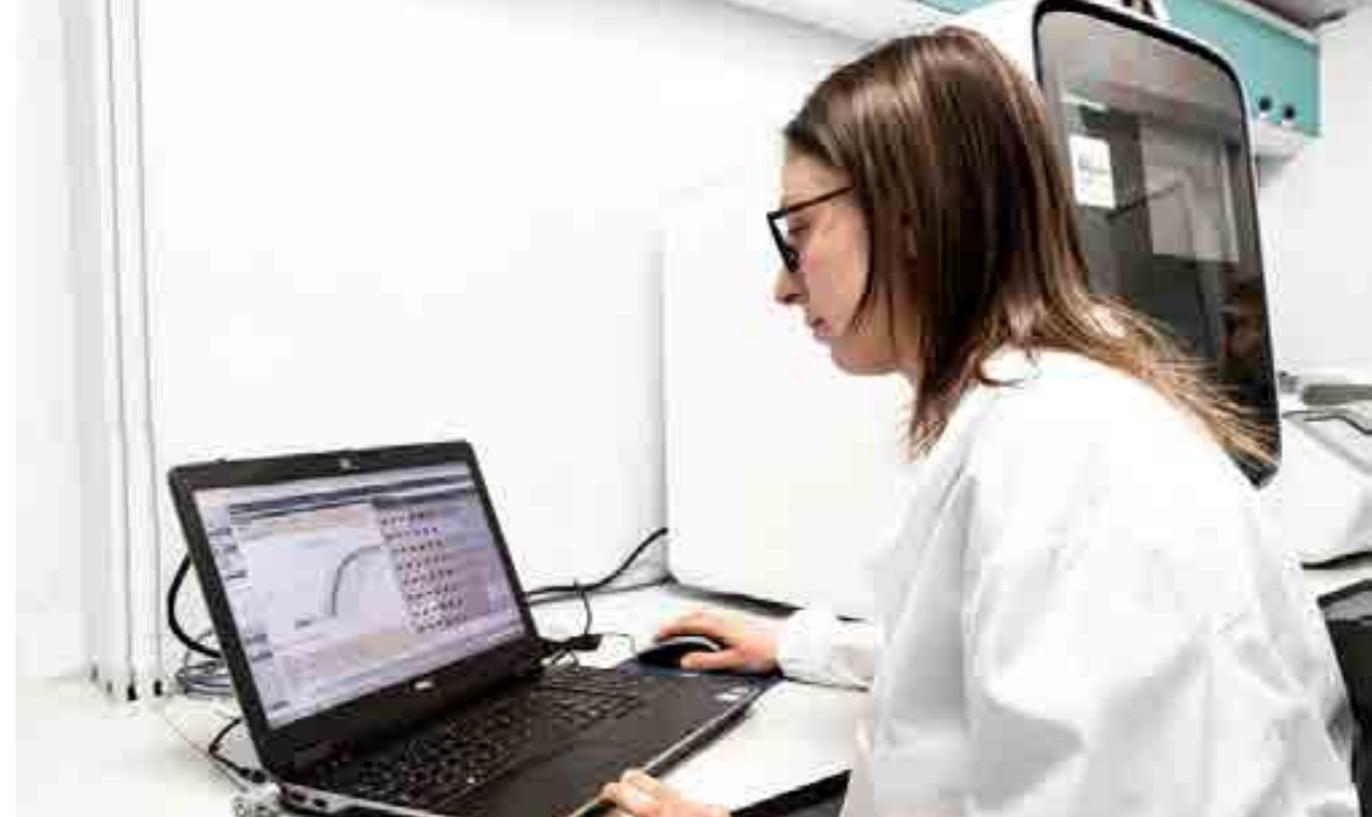
Come si svolgerà e che tempi avrà questo primo studio clinico sulle CAR T-cells Cd446v?

Lo studio prevede due fasi: la prima fase coinvolgerà pazienti adulti con lo scopo di identificare la dose massima tollerata tra i livelli di dose previsti dal protocollo; la seconda avrà l'obiettivo primario di valutare in ciascuna patologia l'attività delle CAR T-cells Cd446v in un numero maggiore di pazienti, inclusi quelli pediatrici, e di verificarne l'efficacia clinica e la sicurezza d'impiego. Entro l'anno prossimo ipotizziamo di avere la prima coorte di pazienti trattati, e quindi anche una prima indicazione dell'efficacia del trattamento. A fronte di risultati positivi di sicurezza ed efficacia, la strategia di MolMed preve-

de anche di cercare un partner per uno sviluppo più ampio del prodotto, perché siamo ben consapevoli delle nostre dimensioni e dell'impossibilità di poter competere sul mercato con colossi come Novartis o Gilead, che producono le due terapie con CAR T-cells attualmente autorizzate degli enti regolatori, e con gli altri che seguiranno in questo settore.

Sia i due prodotti a base di CAR T-cells già approvati dalle agenzie regolatorie sia CAR-T CD44v6 sono terapie autologhe, ottenute dalla manipolazione in laboratorio delle cellule T del paziente. Si inizia a parlare, però, anche di CAR T-cells allogeniche. Ci sta lavorando anche MolMed?

Sì, e siamo tra i pochi a sviluppare cellule ingegnerizzate in modo da esprimere un CAR sia autologhe sia allogeniche. Per quello che riguarda le seconde, MolMed sta sviluppando una *pipeline* basata in realtà su cellule Natural Killer (NK) grazie anche a un accordo di ricerca firmato nel 2018 con Glycostem. Le cellule NK del sistema immunitario naturale possiedono un'elevata attività antitumorale intrinseca, che viene potenziata con l'inserimento di un gene codificante per un CAR, che le trasforma in CAR NK-cells. A differenza delle CAR T-cells autologhe, le CAR NK-cells sono prodotte a partire non dalle cellule prelevate dal paziente, ma dalle cellule di un donatore sano ingegnerizzate e possono essere utilizzate su più pazienti, in quanto le cellule NK non prevedono il riconoscimento del *self*. L'impiego di cellule allogeniche ingegnerizzate presenta, quindi, sulla carta diversi vantaggi e permetterebbe di superare i due principali colli di bottiglia delle terapie con CAR T-cells autologhe: quello dei tempi di produzione, che, visto il processo produttivo "personalizzato", sono attualmente minimo di 3 settimane e appaiono poco comprimibili, e quello dei costi di



produzione, difficilmente sostenibili per qualsivoglia pagatore se si amplierà la popolazione dei pazienti trattati. Un ulteriore vantaggio atteso deriva dal fatto che i CAR espressi da cellule allogeniche, a differenza di quelli espressi da cellule autologhe, sarebbero prodotti '*off the shelf*', cioè prodotti in anticipo a partire dalle cellule di un paziente sano, essendo quindi disponibili come un farmaco tradizionale che può essere stoccato in magazzino e pronto per la somministrazione quando il paziente ne ha bisogno. Il fattore tempo, infatti, è cruciale: siamo di fronte a pazienti con una malattia aggressiva, che non sempre riuscirebbero a sopravvivere il tempo attualmente necessario alla produzione di CAR T-cells autologhe. Senza contare che molti di questi soggetti, sia per la malattia sia a causa di tutti i trattamenti ai quali sono stati già sottoposti, non riescono a fornire con l'aferesi un numero di cellule T sufficiente per poterle trasformare in CAR T-cells. Per tutti questi motivi abbiamo cominciato a sviluppare nei nostri laboratori una *pipeline* di CAR-NK-cells allogeniche che, una volta a regime, ipotizziamo ci consentiranno di produrre a partire da un singolo lotto un numero di dosi sufficiente per trattare 80-100 pazienti.

In futuro, quindi, le CAR T-cells allogene potrebbero sostituire quelle autologhe?

Non credo. Quanto meno, non totalmente. Uno scenario possibile è che le autologhe risulteranno più efficaci delle allogene; in tal caso, le prime potrebbero essere riservate a nicchie di pazienti particolarmente gravi, recidivanti e senza altre opzioni a disposizione, mentre le seconde potrebbero essere destinate a un numero di pazienti più vasto, magari in una fase più precoce della malattia o per eradicare la cosiddetta malattia minima residua o anche come ponte per portarli al trapianto.

Quali sfide pone lo sviluppo di terapie basate su CAR T-cells dal punto di vista regolatorio, e non solo?

Le sfide sono molte e particolarmente complesse, a partire dal fatto che le CAR T-cells sono considerate prodotti geneticamente modificati, e questo implica tutta una serie di vincoli in sede regolatoria. Un secondo ostacolo è legato alla standardizzazione e alla riproducibilità del processo produttivo. Nel caso delle terapie con CAR T-cells, il prodotto e il processo coincidono, e ogni volta che si cambia qualcosa nel processo, il prodotto cambia; tuttavia, bisogna essere in grado di garantire all'autorità regolatoria una continua equivalenza con prodotti realizzati su larga scala. Un'altra difficoltà è legata al fatto che i prodotti di terapia avanzata genica, cellulare e rigenerativa, i cosiddetti *Advanced Therapy Medicinal Products* (ATMP), prima di essere presi in esame dal comitato regolatorio dell'Ema, il Chmp, devono passare il vaglio di un comitato speciale, il *Committee for Advanced Therapies* (CAT), e devono quindi sottostare a un doppio esame per essere approvati. Poi c'è il tema dei registri. Per terapie così complesse e costose come le CAR T-cells è imprescindibile istituire un registro; tuttavia, le schede di registro, così come sono costruite oggi, non si adattano agli ATMP. Altra sfida enorme è stabilire chi abbia i requisiti



adeguati per produrre CAR T-cells e somministrare queste terapie ai pazienti. Non c'è dubbio che bisogna preparare il sistema ad accoglierle. E non è solo un problema di prezzo. Come spesso accade, i prodotti sono arrivati prima dell'adeguamento delle norme, per cui si stanno oggi utilizzando regole che erano state scritte per trattamenti tradizionali. È chiaro che gli apripista pagano questo dazio, mentre chi arriverà dopo troverà un terreno un po' più 'dissodato' da questo punto di vista.

Novartis Italia



Per cambiare la medicina, nei fatti

In Novartis, affrontiamo con la forza dell'innovazione scientifica alcune tra le sfide sanitarie più impegnative della società. I nostri ricercatori lavorano per allargare i confini della scienza, ampliare la comprensione delle malattie e sviluppare prodotti innovativi in aree dove ci sono grandi bisogni medici ancora non soddisfatti.

Con passione, siamo impegnati a scoprire nuovi modi per prolungare e migliorare la vita dei pazienti.





Soluzioni terapeutiche
all'avanguardia per una
migliore qualità di vita.

Quando i nostri ricercatori guardano una molecola vedono il suo futuro.

Da oltre 30 anni, i nostri farmaci migliorano la salute e la qualità di vita di milioni di pazienti in tutto il mondo.

HIV/AIDS, malattie epatiche, ematologia e oncologia, malattie infiammatorie e respiratorie sono in attesa della prossima generazione di farmaci innovativi.

Questo è il nostro obiettivo, questo il nostro impegno.

© 2019 Gilead Sciences, Inc.



Il valore della ricerca.

Avere soluzioni terapeutiche innovative significa migliorare la vita delle persone dal punto vista umano, sociale ed economico. Ma non sarebbe possibile senza nuove e incoraggianti scoperte in ambito farmaceutico: per questo motivo Janssen sostiene la ricerca globale all'interno dei propri laboratori e collabora con le realtà accademiche, scientifiche, industriali, istituzionali.

Giorno dopo giorno, Janssen affronta sfide sempre più complesse nel campo della medicina, rimanendo al fianco dei pazienti in molte delle principali aree terapeutiche: neuroscienze, infettivologia e vaccini, immunologia, malattie cardiovascolari e metaboliche, oncologia ed ematologia. Al tempo stesso promuove la sostenibilità del sistema salute con modelli innovativi di accesso e programmi di formazione e informazione.

Il valore della ricerca è solo uno dei cardini sui cui si basa l'operato di Janssen in Italia: da 40 anni al servizio della ricerca per un mondo più sano.

Janssen. Più vita nella vita.

Janssen-Cilag SpA
www.janssen.com/italy

 @JanssenITA

janssen 



STA GUARDANDO LONTANO.

Innovazione. Passione. Coraggio.
È grazie a questi valori che siamo diventati leader mondiali nelle cure ematologiche e oncologiche, e oggi guardiamo con nuova speranza alle malattie infiammatorie immunomediate.

Per questo investiamo il **40% del fatturato** in ricerca e sviluppo.

Perché ogni giorno, lavorando per milioni di pazienti in tutto il mondo, vediamo anche le sfide che verranno.

celgene.it



PHARMASTAR

www.pharmastar.it

Registrazione al Tribunale di Milano

n° 516 del 6 settembre 2007

EDITORE

MedicalStar

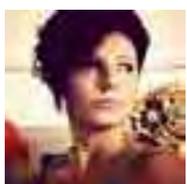
Via San Gregorio, 12 - 20124 Milano

info@medicalstar.it - www.medicalstar.it



DIRETTORE RESPONSABILE

Danilo Magliano



PROGETTO E GRAFICA

Francesca Bezzan

www.franbe.it

AVVERTENZE PER I LETTORI

Nessuna parte di questa pubblicazione può essere copiata o riprodotta anche parzialmente senza l'autorizzazione dell'Editore.

L'Editore declina ogni responsabilità derivanti da errori od omissioni in merito a dosaggio o impiego di medicinali o dispositivi medici eventualmente citati negli articoli e invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza delle informazioni, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

HANNO COLLABORATO ALLO SPECIALE



Alessandra Terzaghi

Testi, videointerviste, redazione ed editing



Prof. Danilo Norata

Università degli Studi di Milano

Testi



Elisa Spelta

Testi

SEGUICI SU



REDAZIONE@PHARMASTAR.IT



Iscriviti alla newsletter
di PharmaStar

PHARMASTAR[★]
il Giornale online sui Farmaci
WWW.PHARMASTAR.IT

