



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

Tesi di Laurea

“LIVING THERAPY”: TERAPIA CELLULARE CAR-T NEL TRATTAMENTO DELLE NEOPLASIE EMATOLOGICHE.

Relatrice: Chiar.ma Prof. Adriana Chilin

Laureanda: Elisabetta Fantelli

Matricola: 1167120

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INDICE DEI CAPITOLI

ABSTRACT _____	1
INTRODUZIONE _____	2
1. CELLULE CAR-T _____	5
1.1 Cosa sono e come agiscono _____	5
1.2 Le diverse generazioni di CAR _____	7
1.3 Processo di produzione di cellule CAR-T _____	10
2. QUALI PATOLOGIE INTERESSA LA TERAPIA CAR-T E QUALE PAZIENTE VI PUÒ ACCEDERE _____	14
2.1 Leucemie _____	14
2.2 Linfomi _____	16
2.3 Mielomi _____	18
2.4 Accesso alla terapia CAR-T _____	18
3. TERAPIE CON CELLULE CAR-T ATTUALMENTE APPROVATE ____	21
3.1 Kymriah® _____	21
3.2 Yescarta® _____	23
3.3 Tecartus® _____	24
3.4 Abecma® _____	25
3.5 Breyanzi® _____	25
4. EFFETTI COLLATERALI DELLE TERAPIE CON CELLULE CAR-T_	27
4.1 Sindrome da rilascio di citochine (CRS) _____	27
4.2 Sindrome da neurotossicità associata alle cellule effettrici immuni (ICANS) _____	30
4.3 Effetti on-target/off-tumor _____	32
4.4 Anafilassi _____	32
4.5 Infezioni associate all'infusione di cellule CAR-T _____	33
4.6 Sindrome da lisi tumorale (TLS) _____	33
4.7 Displasia delle cellule B _____	33
4.8 Disturbi della coagulazione _____	34
5. MECCANISMI DI RESISTENZA ALLA TERAPIA CON CELLULE CAR- T _____	35
5.1 Cellule CAR-T con porta OR _____	36
5.2 Cellule CAR-T con porta AND _____	36
5.3 Cellule CAR-T con porta NOT _____	37

6. LA TERAPIA CON CELLULE CAR-T IN ITALIA _____	39
6.1 Istituzione di un diagnosis related group (DRG) _____	41
7. NUOVE PROSPETTIVE _____	44
7.1 Cellule CAR-T allogeniche _____	44
7.2 Cellule CAR-T contro i tumori solidi _____	45
7.3 Combinazione di terapie _____	48
CONCLUSIONI _____	51
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA _____	53

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1 Rappresentazione strutturale del recettore chimerico antigenico (CAR) _____	6
Figura 2 Generazioni del recettore chimerico dell'antigene (CAR) _____	10
Figura 3 Processo di produzione di cellule CAR-T _____	12
Figura 4 Fisiopatologia della sindrome da rilascio di citochine _____	29
Figura 5 Meccanismi di resistenza _____	35
Figura 6 Cellule CAR-T multispecifiche _____	38
Figura 7 Microambiente tumorale _____	48

ABSTRACT

L'ingegnerizzazione dei linfociti T attraverso l'introduzione del cosiddetto recettore chimerico antigenico (dall'acronimo inglese CAR: Chimeric Antigen Receptor) sta avendo un particolare risvolto nel trattamento di alcune neoplasie ematologiche. Negli anni sono state sviluppate diverse generazioni di CAR, nel tentativo di migliorare l'efficacia e soprattutto la sicurezza di questa terapia cellulare. La sindrome da rilascio di citochine e la neurotossicità sono gli effetti collaterali più frequenti e più gravi associati a questo tipo di trattamento. Le terapie con cellule CAR-T attualmente approvate dalla Food and Drug Administration (FDA) sono in totale cinque, queste sono state tutte autorizzate in Europa da parte dell'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), delle quali solo tre sono disponibili in Italia. Si tratta di una terapia avanzata e personalizzata in cui i linfociti T del paziente vengono prelevati, modificati geneticamente attraverso l'introduzione del recettore chimerico dell'antigene e successivamente reinfusi per combattere il tumore. Tale recettore viene progettato in modo da poter riconoscere gli antigeni associati al tumore e attivare la risposta immunitaria una volta legatosi ad esso. Oggi sono disponibili terapie a base di cellule CAR-T per alcune forme di leucemie e linfomi recidivanti e refrattari al trattamento e per il mieloma multiplo.

INTRODUZIONE

Oggi quando si parla di immunoterapia ci si riferisce subito all'ultima frontiera della lotta al cancro. Essa si basa sul concetto di combattere i tumori come se fossero un'infezione, ossia sfruttando il sistema immunitario del paziente affinché esso riconosca le cellule tumorali e le distrugga.

Negli ultimi anni la lotta contro i tumori ha subito una straordinaria accelerazione, scandita da approfondite ricerche, innovazioni tecnologiche e progresso scientifico. La terapia CAR-T rappresenta proprio questo progresso e attualmente delinea una possibile via di uscita per quei pazienti che si trovano di fronte all'ennesima sconfitta da parte della malattia.

Nei capitoli che seguiranno verranno prese in considerazione le terapie con cellule CAR-T attualmente approvate nel trattamento delle neoplasie ematologiche. Dapprima verranno considerate le diverse generazioni del recettore chimerico antigenico (CAR) con particolare attenzione alla struttura dei domini intracellulari e alla loro evoluzione negli anni. Seguirà un approfondimento per quanto riguarda il processo di produzione delle cellule CAR-T, considerando tutte le fasi coinvolte: dal prelievo del campione di sangue, al processo di manipolazione genetica fino alla re-infusione del trattamento, tenendo conto delle accortezze nelle fasi di trasporto, conservazione e ingegnerizzazione. Verranno poi brevemente considerate le diverse neoplasie ematologiche che possono essere trattate con terapia a base di cellule CAR-T e per le quali vi sono attualmente cinque prodotti cellulari approvati, con una piccola digressione per quanto riguarda la leucemia linfoblastica acuta (LLA), il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) e linfoma primitivo del mediastino a cellule B (PMBCL). Seguirà un approfondimento sulle terapie attualmente approvate da parte della Food and Drug Administration (FDA) negli Stati Uniti, da parte dell'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) in Europa e da parte dell'AIFA in Italia con un accenno agli studi clinici, terminati o ancora in atto, che hanno portato all'approvazione di ciascun prodotto cellulare. Un capitolo verrà interamente dedicato alla descrizione dei possibili effetti collaterali più significativi a cui

tali terapie possono esporre, considerandone i meccanismi fisiopatologici e gli eventuali trattamenti. I limiti e le sfide di questo nuovo approccio terapeutico sono rappresentati proprio dagli effetti collaterali, che talvolta portano ad esiti infausti e sono il motivo per il quale attualmente queste terapie sono ancora in numero limitato e solo per determinate neoplasie ematologiche come seconda o terza linea di trattamento. Verranno successivamente trattati i principali meccanismi d'azione che portano alla resistenza delle neoplasie ematologiche nei confronti della terapia con cellule CAR-T, in particolare la fuga dell'antigene e il cambio di lignaggio e seguirà un accenno alle tecnologie che potrebbero superare questo tipo di problema. Si parla di cellule CAR-T tandem, cellule CAR-T bicistrioniche e tricistrioniche: in ciascuna di esse il tentativo è quello di colpire contemporaneamente più antigeni, cercando di superare il meccanismo di resistenza messo in atto dalle cellule tumorali. Verrà brevemente introdotto anche il possibile utilizzo dei cosiddetti cancelli logici di precisione, con i circuiti OR, AND e NOT, i quali in un'ottica di affinamento della tecnica potrebbero aumentare la specificità del trattamento e ridurre la tossicità. Infine, verrà discussa la modalità di gestione della terapia in Italia, partendo dalle modalità di pagamento approvate di recente da AIFA per due prodotti cellulari e dando uno sguardo al numero di pazienti trattati, utilizzando i dati disponibili fino a giugno 2021. Seguirà una considerazione per quanto riguarda le difficoltà presenti nell'individuare i pazienti adatti ad essere sottoposti a questo tipo di terapia, nella presa in carico dei pazienti da parte del centro che eroga il trattamento e nel garantire una corretta informazione che non alimenti false speranze nei confronti dei malati e dei familiari. Per finire, l'ultimo capitolo affronterà brevemente quelle che sono le prospettive future per quanto riguarda la terapia con cellule CAR-T, facendo riferimento ai possibili ambiti di applicazione di questo tipo di immunoterapia. Si farà riferimento allo sviluppo di terapie con cellule CAR-T allogeniche, prelevate da donatori sani, in modo da ottimizzare i tempi di produzione, ridurre i costi e rendere la terapia più accessibile. Verranno presi in considerazione brevemente i tumori solidi, come possibile ambito futuro di applicazione,

considerando i limiti che sono stati finora evidenziati dalla ricerca, i quali rendono difficile lo sviluppo di questa terapia. Infine, verranno considerate delle possibili associazioni tra più terapie, nell'ottica di potenziare l'efficacia e la sopravvivenza delle cellule CAR-T all'interno del microambiente tumorale: combinazione delle cellule CAR-T con i virus oncolitici, combinazione delle cellule CAR-T con trattamenti chemioterapici e radioterapici e combinazione delle cellule CAR-T con gli inibitori di checkpoint immunitario.

1. CELLULE CAR-T

1.1 Cosa sono e come agiscono

Le cellule CAR-T sono linfociti T prelevati dal paziente che vengono modificati geneticamente, inserendo nel loro patrimonio genetico un gene artificiale, il quale esprime la molecola CAR, acronimo inglese che sta per Chimeric Antigen Receptor ossia recettore chimerico per l'antigene. Tale recettore viene detto chimerico in quanto è costruito mettendo insieme la porzione di due molecole diverse: la porzione di un anticorpo che funge da recettore per l'antigene e una o più porzioni co-stimolatorie che attivano il linfocita una volta legato il bersaglio. La particolarità di queste cellule sta nel fatto che esse vengono modificate in modo da poter riconoscere un particolare antigene espresso dalle cellule tumorali e una volta legate ad esso sono in grado di attivarsi e proliferare in modo da eliminare il tumore stesso. Inoltre, trattandosi di prodotti cellulari, sono in grado di esercitare un effetto che persiste nel tempo ed essendo progettati "ad-personam" si tratta di veri e propri trattamenti personalizzati.¹

Dal punto di vista strutturale il recettore CAR è composto da tre parti: un frammento variabile extracellulare a singola catena di un anticorpo (scFv) che riconosce l'antigene, un dominio transmembrana e un dominio di attivazione intracellulare. Il dominio extracellulare è composto da un segmento variabile a singola catena che comprende le regioni variabili di catene sia leggere che pesanti di un anticorpo, legate tra loro tramite un linker flessibile.² Tra il dominio esterno e il dominio transmembrana si trova una piccola regione cerniera, che prende anche il nome di "distanziatore", la quale conferisce flessibilità al recettore nel processo di legame dell'antigene.³ Il dominio transmembrana, costituito da un'alpha elica, attraversa la membrana cellulare e collega la regione esterna di riconoscimento dell'antigene con il dominio citoplasmatico intracellulare.

Quest'ultimo è il cosiddetto dominio funzionale, che generalmente consiste in una regione di attivazione e una regione di co-stimolazione linfocitaria.²

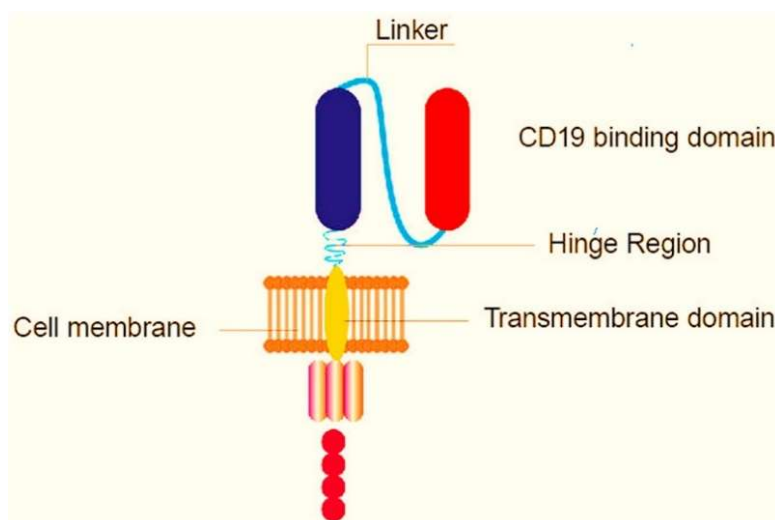


Figura 1 Rappresentazione strutturale del recettore chimerico antigenico (CAR)³

In questo modo si viene a creare una struttura non presente in natura, che associa la capacità di riconoscimento dell'antigene posseduta da un anticorpo e la via di trasduzione del segnale citotossico propria dei linfociti T. Questo fa sì che nel momento in cui avviene il legame antigene-anticorpo, il linfocita T si attivi e metta in atto una risposta immunitaria tale da superare i meccanismi di evasione che le cellule neoplastiche sono in grado di mettere in atto.⁴ Dal momento che i CAR combinano il dominio di un anticorpo con i domini di trasmissione del segnale delle cellule T, essi possono reindirizzare la specificità delle cellule T verso i tumori in maniera indipendente dall'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità MHC, il quale spesso subisce un processo di sottoregolazione per evitare gli effetti antitumorali delle cellule T.⁵

Dal punto di vista fisiologico il linfocita T è già la cellula preposta alla difesa del nostro organismo da patogeni provenienti dall'esterno, ma anche da patologie che originano all'interno come il caso dei tumori. In questo ultimo caso però il linfocita T fa più fatica e spesso le cellule tumorali sono in grado di evadere abilmente i meccanismi di difesa propri del nostro organismo, per proliferare indisturbate. Per questo motivo negli anni 90 si è iniziato a

pensare come si potesse potenziare questa attività fisiologica già presente nei linfociti T per renderla una risposta antitumorale più forte ed efficace.¹

Dal punto di vista teorico sarebbe ottimale riuscire ad individuare dei bersagli specifici, espressi sulle cellule tumorali, in modo tale da indirizzare i linfociti T esclusivamente su di essi. Questo consentirebbe una elevata specificità d'azione e ridurrebbe i cosiddetti effetti "on-target off-tumor" ossia gli effetti fuori bersaglio.⁶ Il primo antigene bersaglio utilizzato nella progettazione delle cellule CAR-T è stato il CD19: questa proteina è altamente espressa dalle cellule B maligne presenti nei tumori ematologici, costituendo un ottimo bersaglio da colpire per eliminare le cellule malate.⁷

Le cellule CAR-T, una volta legate al loro antigene bersaglio, attivano una via di trasduzione del segnale, mediata dai domini intracellulari del recettore CAR, che porta alla lisi delle cellule tumorali mediante meccanismi diretti e indiretti. Possono mettere in atto una risposta citotossica diretta, mediata dal rilascio di perforina e granzimi, possono attivare altri componenti del sistema immunitario, amplificando la risposta diretta verso il tumore e possono produrre direttamente citochine infiammatorie. La citolisi diretta delle cellule bersaglio viene messa in atto in seguito al legame tra il recettore CAR e l'antigene tumorale. Questo segnale innesca l'esocitosi dalla cellula T di granuli contenenti molecole di granzimi e perforina, la quale una volta rilasciata nello spazio extracellulare induce la formazione di pori a livello della membrana della cellula tumorale, in questo modo consente l'entrata dei granzimi che avendo azione pro-apoptotica portano ad uccisione rapida e precisa della cellula bersaglio. Anche la produzione diretta di citochine infiammatorie da parte delle cellule CAR-T svolge un ruolo importante nell'efficacia antitumorale. Queste molecole mediano la lisi delle cellule tumorali e al contempo richiamano ulteriori cellule immunitarie nel sito tumorale, potenziando ulteriormente la risposta antitumorale.⁸

1.2 Le diverse generazioni di CAR

Negli ultimi anni sono state sviluppate diverse generazioni di CAR, modificando progressivamente il dominio intracellulare, nell'ottica di

migliorare la risposta effettrice mediata dai linfociti T. Dalla prima generazione alle successive si è cercato di aumentare progressivamente la capacità di attivazione e proliferazione delle cellule CAR-T, attraverso l'introduzione di domini di co-stimolazione accanto al componente principale del dominio intracellulare, rappresentato dalla catena zeta del dominio di attivazione CD3. Questa porzione fornisce il segnale necessario all'attivazione del linfocita T ed è presente in tutte le generazioni del recettore CAR.

La prima generazione di CAR include frammenti variabili a catena singola specifici per antigeni associati al tumore, fusi a un dominio transmembrana che a sua volta è collegato al dominio citoplasmatico di trasmissione del segnale del recettore delle cellule T, generalmente la catena CD3z. Questa prima generazione è la più semplice dal punto di vista strutturale, ha però dimostrato una scarsa efficacia clinica a causa di una ridotta persistenza delle cellule CAR-T negli studi in vivo, per questo motivo è stata subito superata.⁶

La seconda generazione di CAR, oltre ai domini già presenti nella prima generazione, vede l'introduzione di un dominio di trasmissione del segnale co-stimolatorio come la catena CD28 o 4-1BB. Questa modifica ha subito dimostrato un profilo di sopravvivenza migliore delle cellule CAR-T e una proliferazione cellulare aumentata, inoltre si è osservata una robusta produzione di citochine, che ha potenziato nel complesso la risposta citotossica.⁶ I domini di trasmissione del segnale co-stimolatori più utilizzati sono la catena CD28 e 4-1BB, i quali hanno dimostrato negli studi in vivo due comportamenti diversi: le cellule CAR-T caratterizzate dal dominio 4-1BB hanno evidenziato una maggiore persistenza in vivo a lungo termine, mantenendo una elevata capacità di proliferazione anche dopo l'eradicazione del tumore; le cellule CAR-T caratterizzate dal dominio CD28 invece hanno mostrato una maggiore espansione clonale e una maggiore secrezione di IL-2 nelle fasi precoci di attivazione cellulare. Questo ha dimostrato come la decisione del dominio di co-stimolazione sia importante nel determinare l'azione in vivo delle cellule CAR-T.⁹

La terza generazione di CAR, rispetto alla seconda, vede l'introduzione di una coppia di domini di trasmissione e una coppia di domini di trasmissione del segnale co-stimolatorio, nel tentativo di aumentare la potenza delle cellule CAR-T con una sostanziale produzione di citochine, una maggiore azione antitumorale e un incremento della proliferazione cellulare.⁶

La quarta generazione di CAR viene anche chiamata TRUCK, acronimo inglese che indica "T cells Redirected for antigen Unrestricted Cytokine-initiated Killing", ossia cellule T reindirizzate per l'uccisione mediata da citochine senza restrizione per l'antigene.⁶ Queste cellule CAR-T vengono ulteriormente ingegnerizzate per rilasciare localmente, in maniera costitutiva o inducibile, dei prodotti transgenici cellulari quali citochine pro-infiammatorie come IL-12, IL-15 e IL-18. In questo modo, il rilascio locale di molecole immunomodulatrici come le citochine pro-infiammatorie consente alle cellule T di convertire l'ambiente tumorale immunosoppressivo in un ambiente meno ostile per l'azione delle cellule immunitarie.⁹ In particolare, IL-12 contribuisce in maniera determinante alle risposte antitumorali efficaci in quanto stimola le funzioni effettrici dei linfociti T e dei linfociti Natural Killer attraverso l'induzione di enzimi citotossici come la perforina e attraverso l'induzione alla produzione di citochine come l'IFN- γ da parte di cellule Natural Killer e linfociti T. Gli enzimi citotossici agiscono direttamente sulle cellule tumorali, uccidendole, mentre IFN- γ inibisce la crescita del tumore.¹⁰

La quinta generazione di CAR è attualmente in fase di sviluppo, si basa su cellule CAR-T di seconda generazione con l'aggiunta di un dominio troncato della catena β del recettore citoplasmatico dell'IL-2 situato tra il dominio di trasmissione CD3z e il dominio co-stimolatorio CD28; inoltre, nella porzione terminale della catena CD3z è presente un sito di legame per il fattore di trascrizione STAT3/5. Questa struttura, al momento dell'attivazione del recettore da parte del legame all'antigene, consente di attivare simultaneamente il recettore TCR, attraverso il dominio co-stimolatorio CD28 e la segnalazione di rilascio di citochine attraverso il fattore di

trascrizione STAT3/5. Questi tre segnali nel complesso sono necessari per una fisiologica e completa attivazione dei linfociti T.⁵

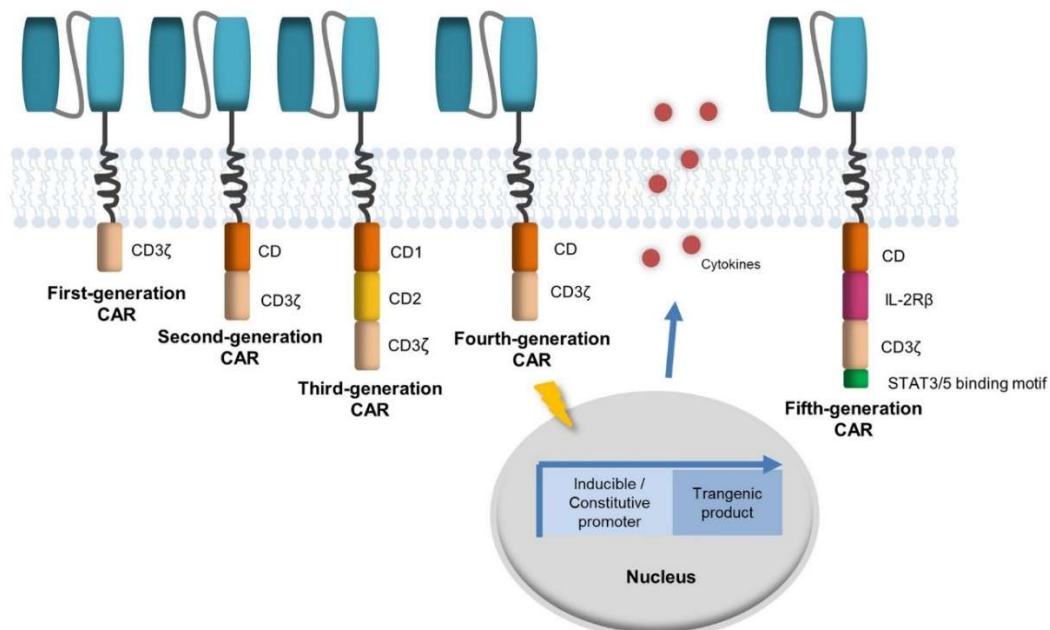


Figura 2 Generazioni del recettore chimerico dell'antigene (CAR)⁹

1.3 Processo di produzione di cellule CAR-T

Il processo di produzione di questo innovativo prodotto cellulare è molto delicato e complesso, per questo motivo viene effettuato esclusivamente all'interno di impianti autorizzati dall'ente regolatorio nazionale e seguendo le leggi GMP (Good Manufacturing Practice). Dal momento che si tratta di una terapia a base di cellule autologhe, la prima fase del processo prevede l'estrazione dal paziente di un campione di sangue periferico all'interno di un centro trasfusionale autorizzato. In questo primo step, si procede alla raccolta dei leucociti tramite un processo che prende il nome di leucaferesi, il quale consente la separazione dei leucociti dalle restanti cellule ematiche.⁴ La separazione generalmente viene effettuata sfruttando le dimensioni cellulari oppure l'espressione di specifici marcatori cellulari presenti sulla membrana cellulare. Il campione di interesse viene quindi raccolto, congelato e spedito nelle officine altamente specializzate e certificate per il secondo step di lavorazione, mentre il restante campione di sangue non utilizzato viene reimpresso in circolo. Il tempo necessario al

completamento di questa prima fase è variabile, infatti, per produrre una quantità sufficiente di cellule CAR-T è fondamentale che venga raccolto un numero esiguo di linfociti T. Questo spesso rappresenta uno step limitante, in quanto il numero di linfociti T circolanti viene ridotto a causa di pregressi cicli di chemioterapia o a causa dell'aumento del numero di altre popolazioni cellulari, come i blasti, dovuto alla progressione della malattia.⁷

La seconda fase prevede l'ingegnerizzazione genetica dei linfociti T attraverso l'introduzione in coltura di un vettore virale che codifica per un gene ricombinante, il Recettore Chimerico dell'Antigene (CAR). I virus più utilizzati sono i lentivirus e i retrovirus, i quali hanno mostrato un profilo di integrazione genomica sicuro. Infatti, tale vettore virale serve ad introdurre nel genoma delle cellule del paziente del materiale genetico, che integrandosi permanentemente consentirà l'espressione del recettore CAR sulla membrana dei linfociti T e tale espressione viene mantenuta durante la fase di divisione ed espansione cellulare. Sono oggetto di studio altre tecniche di manipolazione genetica che non impiegano vettori virali, al fine di semplificare questa fase di produzione e ridurre i costi. Si parla dell'utilizzo di trasposoni, vettori genetici mobili che sono in grado di integrarsi in vari siti del DNA grazie all'enzima trasposasi, che taglia il DNA in determinati punti. La trasduzione mediante i trasposoni risulterebbe rapida, efficace, meno tossica e costosa ma attualmente non è ancora pronta per essere sperimentata in ambito clinico.^{4,7}

Terminata questa fase si passa all'espansione delle cellule all'interno del bioreattore, per raggiungere la dose clinica richiesta e avere così un numero di cellule rilevante per la terapia. Le cellule vengono successivamente lavate e crioconservate nella dose da infondere al paziente e inviate al centro di trasfusione che dovrà effettuare il trattamento. Tutto il processo di produzione ha una durata di 12-16 giorni.⁴

La fase finale prevede l'infusione delle cellule CAR-T al paziente, tramite un processo simile ad una trasfusione, prima della quale il paziente viene sottoposto ad una chemioterapia linfodepletiva che consente una più rapida

e intensa espansione delle cellule CAR-T nell'organismo. Come tutte le fasi finora trattate, anche l'infusione rappresenta un passaggio piuttosto delicato, per questo viene effettuato in centri specializzati per il trattamento di leucemie e linfomi e dove è disponibile l'accesso alla terapia intensiva in caso di reazioni avverse gravi. Il paziente viene monitorato per le quattro settimane successive al trattamento, in quanto è possibile che eventuali reazioni avverse sopraggiungano nelle settimane successive alla dimissione.⁴

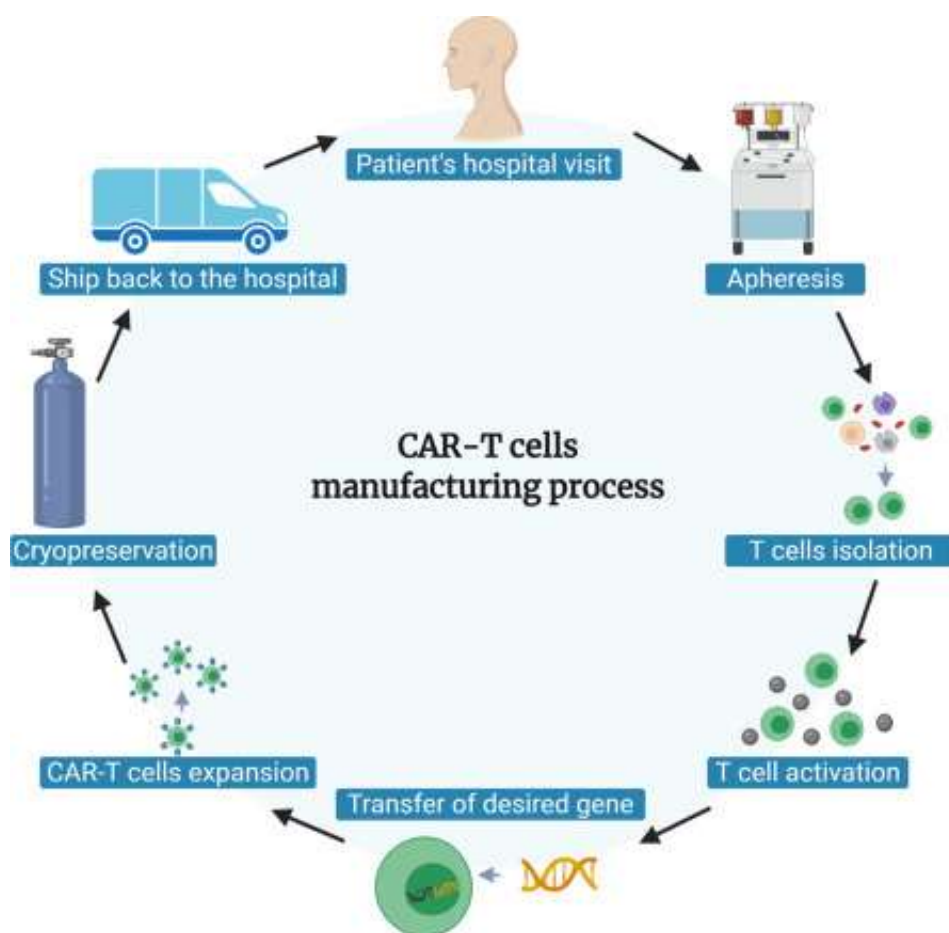


Figura 3 Processo di produzione di cellule CAR-T⁶

Trattandosi di prodotti cellulari che subiscono diversi processi di manipolazione e lavorazione prima di essere reinfusi è importante che durante tutto l'iter di produzione ne venga assicurata la sicurezza, la stabilità

e la sterilità. Non potendo subire un processo di sterilizzazione finale, come accade per i farmaci “tradizionali”, è fondamentale che sia garantita la qualità di produzione per l'intero processo, in particolare si parla di sterilità del terreno di coltura, monitoraggio ambientale, degli operatori e delle aree di produzione che devono essere sempre pulite, sterili e prive di rischi di contaminazione. Ogni fase di questo procedimento risulta essere particolarmente delicata e richiede strumentazione e tecnologie di ultima generazione. Se anche solo una fase del processo produttivo dovesse subire contaminazioni l'intero prodotto finale risulterebbe compromesso e quindi inutilizzabile. Durante il processo di produzione, per assicurare la sicurezza, l'identità e la stabilità delle cellule CAR-T vengono effettuati una serie di test di sicurezza che comprendono i test di sterilità, i test per la rilevazione delle endotossine e dei micoplasmi.⁴

2. QUALI PATOLOGIE INTERESSA LA TERAPIA CAR-T E QUALE PAZIENTE VI PUÒ ACCEDERE

Le terapie a base di cellule CAR-T hanno mostrato successo nel trattamento delle neoplasie ematologiche, mentre per quanto riguarda i tumori solidi ci sono ancora diversi aspetti da chiarire, i quali ad oggi sono oggetto di numerosi studi.

La prima paziente pediatrica ad essere arruolata in uno studio clinico per testare una terapia CAR-T fu Emily Whitehead, una bambina di 7 anni affetta da leucemia linfoblastica acuta (LLA). Questo trattamento sperimentale, sviluppato dal team di Carl June dell'Università della Pennsylvania, venne somministrato ad Emily presso il Children's Hospital di Philadelphia nell'aprile del 2012, dopo la seconda ricaduta della leucemia. Il trattamento ebbe successo e portò alla completa remissione del tumore, ancora ad anni di distanza. Questa data ha segnato profondamente il panorama terapeutico delle patologie onco-ematologiche come la leucemia linfoblastica acuta e il linfoma diffuso a grandi cellule B, tanto che le prime approvazioni da parte della Food and Drug Administration (FDA) negli Stati Uniti di terapie a base di cellule CAR-T arrivarono nel 2017.⁴

Le neoplasie ematologiche si suddividono in tre macro-gruppi: leucemie, linfomi e mielomi. A loro volta, all'interno di questi macro-gruppi, si differenziano ulteriori sottotipi diversi di neoplasie che si possono manifestare in forma acuta o cronica. Quello che accomuna ciascuna di queste forme tumorali è il fatto che venga interessato il midollo osseo e la sua produzione di cellule ematiche quali globuli rossi, globuli bianchi e piastrine.¹¹

2.1 Leucemie

La leucemia è un tumore del sangue causato dalla proliferazione incontrollata di cellule immature chiamate cellule staminali ematopoietiche. Tali cellule si trovano nel midollo osseo e, in condizioni normali, si differenziano in globuli rossi, globuli bianchi e piastrine seguendo due linee

di sviluppo: mieloide e linfoide. Le cellule della linea mieloide danno origine a neutrofili, monociti, precursori di piastrine ed eritrociti mentre le cellule della linea linfoide danno origine ai linfociti. La proliferazione anomala delle cellule staminali ematopoietiche, dovuta a mutazioni genetiche o alterazioni di meccanismi cellulari non ancora noti, porta ad una mancata maturazione degli elementi che costituiscono la parte corpuscolare del sangue e ad un accumulo di tali cellule nel midollo osseo e talvolta nei linfonodi, portando così allo sviluppo della leucemia. Esistono varie forme di leucemia, infatti si distinguono forme di leucemia acuta, le quali sono caratterizzate da una progressione molto veloce della malattia e le cellule mostrano un blocco nel processo di maturazione dei precursori e forme di leucemia cronica, le quali presentano un'evoluzione più lenta e viene mantenuta la capacità di maturazione da parte dei precursori cellulari, anche se questa avviene in maniera anomala.¹² Le leucemie sono le patologie tumorali più frequenti nei bambini in età pediatrica, mentre negli adolescenti rappresentano la terza patologia più frequente.⁴

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) è una forma di leucemia caratterizzata da una crescita incontrollata di cellule immature o blasti a livello del midollo osseo, in questo caso le cellule affette da tale anomalia sono i precursori dei linfociti. I blasti, oltre ad invadere il sangue e il midollo osseo, sono in grado di infiltrarsi in altri tessuti e organi come i linfonodi, la milza, il fegato e il sistema nervoso centrale. A seconda dell'anomalia cromosomica e genica che si evidenzia a livello dei blasti, la leucemia linfoblastica acuta viene ulteriormente classificata in sottogruppi distinti.¹² Come riportato sul sito ufficiale dell'Associazione Italiana per la ricerca sul Cancro (AIRC): *“Le leucemie rappresentano un terzo di tutti i tumori dei bambini e circa 4 bambini colpiti da leucemia su 5 sviluppano la leucemia linfoblastica acuta. In Italia, in base ai dati AIRTUM (Associazione Italiana Registri Tumori), vengono colpiti dalla leucemia linfoblastica acuta circa 40 bambini su un milione. L'incidenza è leggermente più alta tra i maschi che tra le femmine. La leucemia linfoblastica acuta colpisce soprattutto i bambini di età compresa tra 2 e 5 anni; in questa fascia d'età l'incidenza può arrivare*

addirittura a valori di 80-90 bambini su un milione."¹³ La sintomatologia all'esordio della malattia spesso è aspecifica e comprende importante astenia, a causa della diminuzione del tessuto ematopoietico in grado di produrre emoglobina, dolori articolari e ossei, febbre, dovuta alla malattia o ad infezioni concomitanti agevolate da una diminuzione dei globuli bianchi e manifestazioni emorragiche dovuta alla diminuzione delle piastrine circolanti. L'esame d'elezione in caso di sospetta LLA è l'emocromo, i cui dati risultano alterati a causa della presenza in circolo dei blasti, i quali possono essere evidenziati mediante valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico. La diagnosi di leucemia viene confermata eseguendo un agoaspirato midollare.⁴

2.2 Linfomi

I linfomi sono tumori causati dalla proliferazione incontrollata dei linfociti, le cellule del nostro sistema immunitario deputate alla difesa dell'organismo da parte di agenti esterni e non solo. La capacità di crescita incontrollata viene acquisita in seguito a mutazioni di geni che regolano la proliferazione, la crescita e la morte cellulare. I linfociti mutati e in continua crescita si accumulano così nei linfonodi causando l'insorgenza dei linfomi. A seconda del tipo di mutazione genetica e in base alla fase dello sviluppo del linfocita che viene interessata si possono classificare diversi tipi di linfomi. Si distinguono due gruppi: i Linfomi di Hodgkin in cui sono interessati i linfociti della linea B e i Linfomi di non Hodgkin in cui vengono coinvolti i linfociti di entrambe le linee cellulari, i linfociti B e i linfociti T. A seconda della velocità di progressione della malattia si parla di linfomi indolenti, a lenta crescita e linfomi aggressivi, a crescita rapida.¹⁴ Il linfoma di Hodgkin prende il nome dal medico che lo ha descritto agli inizi dell'Ottocento, Thomas Hodgkin, ed è una forma tumorale piuttosto rara nei bambini e negli anziani, mentre in genere si manifesta nell'adulto tra i 20 e i 50 anni. Il linfoma non Hodgkin comprende diversi sottotipi di neoplasie che coinvolgono i linfociti B, i linfociti T o le cellule Natural Killer (NK) e nel complesso rappresenta circa il 4-5% di nuovi casi di tumore al mondo. In particolare i linfomi non Hodgkin si possono raggruppare in quattro ampie categorie⁴:

- Neoplasie dei precursori dei linfociti B;
- Neoplasie delle cellule B mature
- Neoplasie derivanti dai precursori delle cellule T;
- Neoplasie derivanti dai linfociti T periferici o dalle cellule Natural Killer (NK);

All'interno del grande gruppo dei linfomi non Hodgkin rientrano il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) e il linfoma primitivo del mediastino a cellule B (PMBCL).

Il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) rappresenta una forma di linfoma non Hodgkin molto aggressiva e difficile da trattare, rappresenta il 35-40% di tutti i linfomi a cellule B.¹⁵ Si tratta di una patologia che nella maggior parte dei casi esordisce nell'età adulta, dopo i 60 anni. A causa di una mutazione che colpisce i linfociti B, questi iniziano a proliferare in maniera incontrollata portando ad un malfunzionamento del sistema immunitario. Nelle forme iniziali vengono interessati i linfonodi di aree come il collo, le ascelle mentre nelle forme più estese si possono riscontrare masse linfonodali più voluminose a livello addominale o nel mediastino. In alcuni casi il linfoma può estendersi a zone extra linfatiche quali stomaco, intestino, fegato, tiroide, cervello, testicoli, mammella.¹

Il linfoma primitivo del mediastino a cellule B (PMBCL) è un raro sottotipo di linfoma diffuso a grandi cellule B. I linfociti B del timo, in seguito ad una mutazione genica, proliferano dando origine ad una massa voluminosa nella parte anteriore del mediastino, tale ingrossamento può portare a versamento pleurico e può invadere polmoni, vena cava superiore, pleura, pericardio e parete toracica. Colpisce principalmente le donne di età compresa tra i 30 e i 40 anni e si presenta con sintomi quali tosse, dispnea e affanno dovuti alla compressione mediastinica localizzata da parte della massa.¹⁶

2.3 Mielomi

I mielomi sono forme tumorali che interessano il midollo osseo, in particolare coinvolgono le plasmacellule, ossia le cellule deputate alla produzione degli anticorpi. La mutazione presente nelle plasmacellule fa sì che queste producano anticorpi in maniera incontrollata che sono uno la copia dell'altro, anziché produrre anticorpi con caratteristiche diverse uno dall'altro come in condizioni normali.¹¹ Questo si traduce in un funzionamento anomalo del sistema immunitario e ad una mancata produzione corretta degli anticorpi necessari. Oltre a rilevare l'eccesso dell'anticorpo prodotto da parte delle cellule tumorali nel siero del paziente, si osserva la produzione di una grossa quantità di citochine infiammatorie che interferiscono con le fisiologiche attività di osteoblasti e osteoclasti innescando fragilità ossea. In relazione al tipo di anticorpo anomalo prodotto da parte delle cellule tumorali, si riconoscono diversi tipi di mieloma, in particolare il Mieloma Multiplo (MM) risulta essere il più diffuso.¹⁷

2.4 Accesso alla terapia CAR-T

L'accesso a questo tipo di terapia viene consentito solo a pazienti che si trovano in determinate condizioni di malattia e solo all'interno di centri appositamente accreditati. Le Linee Guida diffuse dall'AIFA stabiliscono quali centri possano somministrare le cellule CAR-T, i quali devono essere autorizzati ad effettuare il trapianto allogenico di cellule staminali del sangue e devono possedere l'accreditamento JACIE: acronimo inglese che indica Joint Accreditation Committee of ISCT, International Society for Cellular Therapy, and EBMT, European Group for Blood and Marrow Transplantation. L'accreditamento JACIE nasce dall'unione della Società Scientifica Europea Trapianti Midollo e della Società Internazionale di Terapia Cellulare e stabilisce i requisiti che una struttura sanitaria deve possedere per poter operare con le cellule staminali e nell'ambito del programma di trapianto del midollo. Tale accreditamento stabilisce anche in quale modalità sia necessario rivedere la letteratura scientifica e compararla con la casistica per valutare i risultati ottenuti, definisce i

requisiti strutturali e tecnologici che il centro deve avere e dispone le competenze necessarie del personale medico ed infermieristico. Per il trapianto allogenico il centro deve disporre dell'Unità Clinica, del laboratorio di processazione, dell'unità di raccolta delle cellule e dell'unità di terapia intensiva. Sulla base di queste premesse, spetta alle Regioni stabilire quali centri al loro interno soddisfino i suddetti requisiti. Una volta che la Regione ha ufficialmente individuato ed autorizzato i centri adatti alla somministrazione della terapia, segue un percorso di qualifica e una fase di ispezione da parte delle aziende produttrici di terapie CAR-T che verificano che il centro abbia effettivamente messo in atto tutte le procedure necessarie ad una efficace e sicura somministrazione del trattamento.⁴

Il paziente adatto ad essere sottoposto alla terapia CAR-T viene individuato da un ematologo presente sul territorio in una qualsiasi area del Paese. Infatti, spesso i pazienti candidati a questo tipo di trattamento di trovano in ospedali periferici che non sono provvisti di un centro trapianti. Per questo motivo è necessaria una forma di collaborazione e di comunicazione ottimale tra il centro che individua il paziente, il cosiddetto Centro Spoke, e il centro che somministra la terapia, il Centro Hub.⁴ Il paziente adatto ad essere sottoposto alla terapia cellulare CAR-T normalmente è un soggetto che non ha mai risposto alla chemioterapia oppure è in recidiva dopo il trapianto di cellule staminali o dopo almeno due linee di chemioterapia. L'ematologo che segnala il paziente al centro Hub dovrà valutare anche eventuali comorbidità presenti e lo stato di salute generale in cui si trova il paziente, dal momento che egli si trova di fronte ad una recidiva o ad una ricaduta della malattia a seguito di terapie importanti.¹⁸ I criteri standard utilizzati per misurare l'impatto della malattia sulle capacità di vita quotidiana di un paziente e quindi stabilire se possa essere sottoposto al trattamento con cellule CAR-T, fanno riferimento alla ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Performance Status Scale. Tale scala di numerazione, sviluppata appunto dalla Eastern Cooperative Oncology Group, definisce lo stato delle prestazioni che il paziente è in grado di compiere, considerando la capacità di camminare, lavorare e prendersi cura di sé andando a

classificarle secondo un grado che va da 1 a 5.¹⁹ Questo sistema aiuta l'ematologo del centro Spoke ad individuare correttamente il paziente adatto ad essere sottoposto alla terapia e poi a segnalarlo al centro Hub per la presa in carico. Va inoltre considerato che mediamente il tempo necessario per l'ingegnerizzazione dei linfociti T, dal momento del prelievo fino alla re-infusione del paziente, è di circa un mese. In questo arco temporale le condizioni precarie di salute dei pazienti possono cambiare e l'aggressività della loro patologia può compromettere la somministrazione e l'efficacia della terapia CAR-T.⁴ Per questo motivo si deve ricordare che la precocità della diagnosi e l'individuazione del paziente adatto sono fasi fondamentali per una corretta riuscita del processo e possono contribuire ad ottenere un esito positivo. L'impiego di questo tipo di trattamento non può essere destinato a pazienti che si trovano in condizioni di malattia fortemente debilitanti, in quanto si andrebbe incontro a ad un elevato rischio di complicanze gravi e di recidiva di malattia.⁴

Una volta che questa prima fase di individuazione è avvenuta correttamente e il paziente è pronto a sottoporsi alla terapia, viene avviato l'iter di preparazione del trattamento e il paziente viene indirizzato presso il centro Hub dove effettuerà l'infusione e il monitoraggio.⁴

3. TERAPIE CON CELLULE CAR-T ATTUALMENTE APPROVATE

Secondo la classificazione dell’Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) le cellule CAR-T sono a tutti gli effetti un prodotto medicinale di terapia genica e rientrano quindi nei prodotti medicinali di terapia avanzata, dall’acronimo inglese ATMP che indica “Advanced Therapy Medicinal Product”. All’intero di questa categoria rientrano quattro tipologie di prodotti medicinali: terapia genica, terapia cellulare, ingegneria tissutale e terapie avanzate combinate, le quali comprendono uno o più dispositivi medici come parte integrante del farmaco. Non si parla più in questo caso di prodotti medicinali di sintesi, bensì di “terapie vive” che si basano su DNA e cellule.⁴ Per questo motivo è stato istituito all’EMA il Committee for Advanced Therapies (CAT), ossia il Comitato per le Terapie Avanzate, che ha il compito di valutare qualità, sicurezza ed efficacia dei prodotti medicinali di terapia avanzata per poi sottoporli ad approvazione presso il Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), il Comitato per i medicinali ad uso umano.²⁰

Le terapie con cellule CAR-T attualmente approvate dalla Food and Drug Administration (FDA) sono in totale cinque, queste sono state tutte autorizzate in Europa da parte dell’Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), delle quali solo tre sono disponibili in Italia.²⁰

3.1 Kymriah®

Kimriah® è un medicinale per il trattamento di due tipi di tumori del sangue contenente il principio attivo tisagenlecleucel, costituito da linfociti T del paziente geneticamente modificati per l’espressione del recettore chimerico CAR, indirizzato verso la proteina CD19, presente sulla membrana delle cellule tumorali. Viene somministrato per il trattamento di due tipi di tumori:²¹

- Leucemia linfoblastica acuta (LLA) a cellule B in bambini e giovani adulti fino a 25 anni di età in cui il tumore non ha risposto alla terapia

precedente, si è ripresentato due o più volte o si è ripresentato in seguito a trapianto di cellule staminali;

- Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) negli adulti in cui è avvenuta una recidiva oppure non vi è stata alcuna risposta dopo due o più trattamenti;
- Pazienti adulti con linfoma follicolare (FL) recidivante o refrattario dopo due o più linee di terapia sistemica;

Quest'ultima indicazione, per quanto riguarda il trattamento del linfoma follicolare, è subentrata il 24 marzo 2022 in seguito alla decisione da parte del comitato per i medicinali ad uso umano (CHMP).

Questo trattamento è stato approvato ad agosto 2017 negli Stati Uniti da parte della Food and Drug Administration (FDA), ad agosto 2018 in Europa da parte dell'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) e ad agosto 2019 in Italia da parte dell'AIFA.²⁰

I parametri presi in considerazione durante il processo di valutazione che hanno portato all'approvazione del farmaco fanno riferimento ai risultati degli studi clinici ELIANA per quanto riguarda i pazienti affetti da LLA, e JULIET, per quanto riguarda i pazienti affetti da DLBCL.²⁰

ELIANA è uno studio clinico di fase II realizzato in collaborazione con l'Università della Pennsylvania e il Children's Hospital of Philadelphia, che ha coinvolto 25 centri in Usa, Canada, Australia, Giappone ed Europa e ha arruolato 75 pazienti di età compresa tra i 3 e i 23 anni, affetti da leucemia linfoblastica acuta (LLA).²² Nell'ambito dello studio ELIANA, sponsorizzato da Novartis Farmaceutica, è stata coinvolta la Clinica Pediatrica del San Gerardo di Monza, dove il primo bambino italiano affetto da LLA è stato arruolato nella prima parte dello studio nel 2016. Nel caso in questione la terapia con tisagenlecleucel non ha avuto successo, ma ha consentito al paziente di avere una finestra di remissione di malattia che gli ha permesso di arrivare al trapianto in condizioni migliori.¹ Da questo studio è emerso che a distanza di 3 mesi dall'infusione delle cellule CAR-T il 66% dei pazienti

ha avuto una risposta completa al trattamento, vale a dire che non sono stati evidenziati segni di cancro residuo e a distanza di 12 mesi la probabilità di sopravvivenza era del 70%.²¹

JULIET è uno studio internazionale multicentrico condotto dall'Università della Pennsylvania e sponsorizzato da Novartis Farmaceutica, che ha coinvolto 27 centri in 10 Paesi quali Usa, Canada, Australia, Giappone ed Europa e ha arruolato 93 pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL). In Italia è stato coinvolto l'Istituto Nazionale Tumori di Milano.²² I risultati ottenuti da questo studio a distanza di 3 mesi dal trattamento erano paragonabili a quelli di studi su pazienti che ricevevano trattamenti oncologici standard. Il 24% dei pazienti ha avuto una risposta completa e il 34% ha avuto una risposta parziale. Il dato che è rimasto costante nel tempo è stato il tasso di risposta al trattamento anche a distanza di 19 mesi, dimostrando quindi una durata prolungata della risposta.²¹

3.2 Yescarta®

Yescarta® è un medicinale per il trattamento di due tipi di tumori del sangue contenente il principio attivo axicabtagene ciloleucel, costituito da linfociti T geneticamente modificati per l'espressione del recettore chimerico CAR, indirizzato verso la proteina CD19, presente sulla membrana delle cellule tumorali. Viene somministrato per il trattamento di due tipi di tumori:²³

- Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL);
- Linfoma primitivo del mediastino a cellule B (PMBCL);

Come nel caso di Kymriah®, anche questo trattamento è stato approvato ad agosto 2017 negli Stati Uniti da parte della Food and Drug Administration (FDA), ad agosto 2018 in Europa da parte dell'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) e a novembre 2019 in Italia da parte dell'AIFA.²⁰

Lo studio di fase II che ha condotto all'approvazione di questa terapia a base di cellule CAR-T è lo studio ZUMA-1, in cui sono stati arruolati 106 pazienti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) e linfoma primitivo del mediastino a cellule B (PMBCL). Da tale studio è emerso che i

pazienti trattati hanno mostrato un tasso di remissione completa dalla malattia pari al 58%, questo dato è sceso al 41% dopo 15 mesi dal trattamento ma dal punto di vista clinico risulta essere rilevante per un sottogruppo di pazienti in cui vi è un possibile controllo della malattia anche a lungo termine.²⁴

3.3 Tecartus®

Tecartus® è un medicinale per il trattamento del linfoma mantellare in adulti in cui il tumore si ripresenta dopo due o più trattamenti oppure non risponde a nessun trattamento. Il principio attivo di Tecartus® è brexucabtagene autoleucel, costituito da linfociti T geneticamente modificati per l'espressione del recettore chimerico CAR, indirizzato verso la proteina CD19, presente sulla membrana delle cellule tumorali.²⁵

Tecartus® è stato approvato in Europa da parte dell'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) a dicembre 2020, con un'autorizzazione all'immissione in commercio condizionata, infatti, questo medicinale viene sottoposto a monitoraggio aggiuntivo in quanto l'azienda che commercializza il medicinale dovrà fornire all'EMA entro la fine del 2022 i rapporti finali dello studio attualmente in corso. Come riportato sul sito ufficiale dall'Agenzia Europea dei Medicinali questa particolare approvazione è stata concessa: *“nell'interesse della salute pubblica perché il medicinale risponde a un'esigenza medica non soddisfatta e il vantaggio della disponibilità immediata supera il rischio derivante da dati meno completi di quelli normalmente richiesti”*.²⁵

I dati che hanno portato all'approvazione di Tecartus® sono forniti da uno studio, attualmente in corso, che coinvolge 74 pazienti in cui il linfoma mantellare è ricomparso dopo almeno due trattamenti precedenti. Nel 59% dei casi si è osservata una risposta completa in seguito al trattamento con cellule CAR-T.²⁵ Questo trattamento è stato approvato di recente, a marzo 2022, da parte dell'AIFA.²⁰

3.4 Abecma®

Abecma® è un medicinale utilizzato per il trattamento negli adulti del mieloma multiplo recidivante e refrattario dopo almeno tre linee di trattamento precedenti. Il principio attivo di Abecma® è idecabtagene vicleucel, costituito da linfociti T geneticamente modificati per l'espressione del recettore chimerico CAR, indirizzato verso la proteina chiamata antigene di maturazione delle cellule B (BCMA), presente sulla superficie delle cellule tumorali.

Abecma® è stato approvato in Europa da parte dell'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) ad agosto 2021 e come nel caso di Tecartus®, ha ottenuto un'autorizzazione all'immissione in commercio condizionata e quindi l'azienda che lo commercializza dovrà fornire all'EMA i dati sul follow-up dei pazienti a 24 mesi dello studio principale. L'azienda dovrà inoltre effettuare uno studio per confrontare Abecma® con il trattamento chemioterapico standard e dovrà fornire ulteriori informazioni per quanto riguarda i dati sulla sicurezza a lungo termine.²⁶

I dati che hanno portato all'approvazione di Abecma® hanno dimostrato che questo trattamento porta a tassi di risposta significativi in pazienti in cui il mieloma multiplo è recidivante o refrattario. Su 140 pazienti si è osservata una risposta completa nel 30% dei casi e almeno una risposta parziale nel 67% dei casi.²⁶

3.5 Breyanzi®

Breyanzi® è un medicinale utilizzato per il trattamento di diversi tumori del sangue nell'adulto in seguito a recidive della malattia o mancata risposta di questa ad uno o più trattamenti. Il principio attivo di Breyanzi® è lisocabtagene maraleucel, costituito da linfociti T (cellule T CD4+ e cellule T CD8+) geneticamente modificati per l'espressione del recettore chimerico CAR, indirizzato verso la proteina CD19, presente sulla membrana delle cellule tumorali. I tumori del sangue che vengono trattati con questo medicinale sono:²⁷

- Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL);
- Linfoma primitivo del mediastino a cellule B (PMBCL);
- Linfoma follicolare (FL);

Breyanzi[®] è la quinta terapia a base di cellule CAR-T ad essere approvata in Europa da parte dell'Agenzia Europea dei Medicinali, ad aprile 2022.²⁰

Gli studi che hanno supportato l'approvazione di Breyanzi[®] ma che sono attualmente ancora in corso sono due. TRANSCEND NHL 001 è uno studio clinico di fase 1 in aperto che valuta la sicurezza, l'attività antitumorale e la farmacocinetica delle cellule T modificate somministrate a pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) recidivato o refrattario, linfoma primario a cellule B mediastinico (PMBCL), linfoma follicolare di grado 3B e linfoma mantellare (MCL). Sono stati arruolati un totale di 314 pazienti che verranno seguiti per 24 mesi dopo l'ultima infusione di cellule CAR-T.²⁸ Il secondo studio in corso è TRANSCEND WORLD, studio di fase II in aperto che coinvolge 188 pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin (NHL) a cellule B indolente ad alto rischio, recidivante o refrattario. Vengono suddivisi tre periodi, la fase pretrattamento con valutazioni di screening iniziali, la fase di trattamento e infine il follow-up che si concluderà a 2 anni dall'infusione delle cellule CAR-T.²⁹

4. EFFETTI COLLATERALI DELLE TERAPIE CON CELLULE CAR-T

Nonostante le terapie con cellule CAR-T rappresentino uno svolta per alcuni pazienti nel trattamento di tumori che non risponde a nessun'altra cura oppure si ripresentano dopo più cicli di chemioterapia, non mancano gli aspetti negativi di questo nuovo approccio, che si traducono talvolta in importanti effetti collaterali. Per tutte le terapie a base di cellule CAR-T che sono state approvate dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) fino ad oggi, viene seguito un protocollo di gestione della terapia comune: il farmaco viene somministrato con un'unica infusione endovena, esclusivamente al paziente le cui cellule sono state utilizzate per produrre la terapia. Prima dell'infusione viene eseguito un breve ciclo di chemioterapia e subito dopo segue un attento monitoraggio del paziente nei 10 giorni successivi. Il paziente, una volta dimesso, viene invitato a rimanere nei pressi dell'ospedale che ha effettuato il trattamento per almeno 4 settimane.^{21, 23, 25-27} Il profilo di tossicità delle terapie a base di cellule CAR-T è soggetto a numerose variabili quali il dosaggio somministrato, l'espansione del tumore nel paziente al momento dell'infusione e le condizioni cliniche del paziente ma è sempre legato all'attivazione del sistema immunitario.³⁰

4.1 Sindrome da rilascio di citochine (CRS)

La sindrome da rilascio di citochine (CRS) è una risposta infiammatoria sistemica che può presentarsi con lievi sintomi simil-influenzali fino a gravi manifestazioni pericolose per la vita.³¹ Si tratta di una forma di tossicità infiammatoria che è stata riscontrata in quasi tutti gli studi clinici effettuati per portare all'approvazione terapie a base di cellule CAR-T quali Kymriah[®], Yescarta[®], Tecartus[®], Breyanzi[®] e Abecma[®].³² I sintomi più lievi comprendono febbre, affaticamento, mal di testa, artralgia e mialgia. Nei casi più gravi si presenta ipotensione, febbre alta che possono sfociare in una risposta infiammatoria sistemica incontrollata con shock cardiocircolatorio, coagulazione intravascolare disseminata e insufficienza multiorgano. La sindrome da rilascio di citochine si presenta spesso in

seguito alla somministrazione di farmaci antitumorali immunoterapici, ma la sua incidenza varia a seconda dell'agente immunoterapico scelto; nel caso di immunoterapie a base di linfociti T e in particolare in seguito a somministrazione di cellule CAR-T, la probabilità di insorgenza di tale sindrome è più elevata e può verificarsi entro pochi giorni dalla somministrazione del trattamento fino a qualche settimana dopo. Il rischio di insorgenza di CRS sembra essere legato alla dose di terapia, alla malattia presente e alle caratteristiche del paziente. Il fattore scatenante sembra essere legato alla forza di attivazione delle cellule T e al loro grado di espansione, inoltre tra le diverse generazioni di CAR si sono osservate differenze nel tasso di CRS. Le CAR caratterizzate dal dominio di co-stimolazione CD28 inducono una rapida espansione dei linfociti mentre le CAR che incorporano il dominio di co-stimolazione 4-1BB promuovono una persistenza più lunga delle cellule CAR-T nel tempo, questa differenza ha suggerito che le cellule CAR-T con dominio di co-stimolazione CD28 siano associate ad un maggiore rischio di insorgenza di CRS. Nonostante l'osservazione di queste differenze non è possibile definire in maniera assoluta, sulla base della struttura di CAR, quale di questi presenti un rischio maggiore di insorgenza di CRS, essendo coinvolti ulteriori fattori concomitanti.

La fisiopatologia della CRS non è del tutto compresa, essa solitamente è causata dal legame del recettore CAR al suo antigene e dalla successiva attivazione delle cellule immunitarie, le quali producono una risposta citotossica volta ad eliminare le cellule tumorali. L'attivazione delle cellule immunitarie porta ad un massiccio rilascio di citochine, le quali guidano il processo infiammatorio nella direzione del tumore. Talvolta però, questo massiccio rilascio di citochine infiammatorie può tradursi in un processo sregolato che può avere effetti dannosi sul paziente, innescando la sindrome da rilascio di citochine. Tra le principali citochine coinvolte nell'insorgenza della CRS troviamo interleuchina 6 (IL-6), interleuchina 10 (IL-10), interferone γ (IFN- γ) e fattore di necrosi tumorale α (TNF- α). Il massiccio rilascio di IFN- γ da parte delle cellule CAR-T attivate o da parte

delle stesse cellule tumorali andate incontro a lisi porta all'insorgenza dei primi sintomi quali febbre, brividi, affaticamento, mal di testa. IFN- γ induce l'attivazione di altre cellule immunitarie, come i macrofagi, che a loro volta iniziano a produrre elevate quantità di citochine come IL-6, IL-10 e TNF- α le quali aumentano i sintomi di malessere generale, febbre e affaticamento. In particolare, IL-6 sembra giocare un ruolo chiave nell'insorgenza dei sintomi più gravi di CRS come perdita vascolare e attivazione del complemento e della cascata della coagulazione che porta a coagulazione intravascolare disseminata. La cascata di citochine infiammatorie porta inoltre all'attivazione delle cellule endoteliali, che a loro volta producono IL-6, creando così un circolo vizioso. La disfunzione endoteliale comporta perdita capillare, ipotensione e coagulopatia, sintomi che si riscontrano nei casi più gravi di CRS.³¹

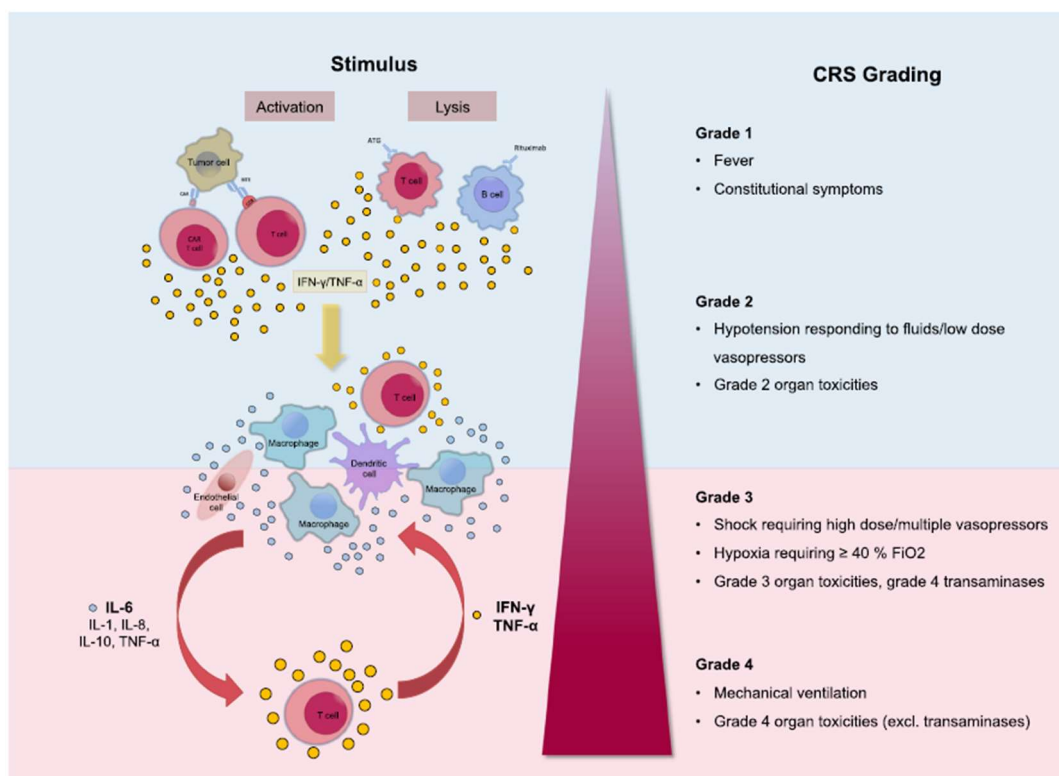


Figura 4 Fisiopatologia della sindrome da rilascio di citochine³¹

Il trattamento della sindrome da rilascio di citochine si basa sulla gravità dei sintomi che dal punto di vista clinico vengono classificati su una scala da 1 a 4. Il trattamento sintomatico con antipiretici viene adottato nei pazienti con

CRS di grado 1, che presentano sintomi lievi come febbre, malessere e mal di testa. Il trattamento di supporto e sintomatico viene utilizzato nei pazienti che presentano un grado 2 di CRS, mentre nei casi più gravi con grado 3 e 4 di CRS oltre al trattamento di supporto si procede con la somministrazione di farmaci immunosoppressori quali glucocorticoidi e Tocilizumab. Tocilizumab è un anticorpo monoclonale approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) come trattamento di prima linea per la sindrome da rilascio di citochine indotta dalla terapia con cellule CAR-T. Esso si lega ai recettori di membrana di IL-6, impedendone così il suo legame e la conseguente trasmissione del segnale da essa mediata, agendo da antagonista del recettore. Tocilizumab agisce rapidamente sui sintomi indotti da CRS senza compromettere la proliferazione e l'attività antitumorale mediata dalle cellule CAR-T. Nei casi più gravi, in cui Tocilizumab non sia sufficiente, si procede con la sua sostituzione con farmaci glucocorticoidi oppure con una terapia combinata con glucocorticoidi e Tocilizumab. Dal momento che i glucocorticoidi presentano un importante effetto immunosoppressivo e influiscono sulla proliferazione e l'attività antitumorale delle cellule CAR-T, il loro dosaggio viene attentamente studiato. In pazienti con grado 3 di CRS viene somministrato metiprednisolone (2mg/Kg/die) oppure desametasone (10mg/6h) mentre nei pazienti con grado 4 di CRS viene somministrato metilprednisolone (1000mg/die per 3 giorni consecutivi).³³

4.2 Sindrome da neurotossicità associata alle cellule effettrici immuni (ICANS)

La neurotossicità, in seguito alla somministrazione di cellule CAR-T, è il secondo effetto collaterale più frequente, dopo la sindrome da rilascio di citochine (CRS). I sintomi più comuni sono confusione, afasia, delirio, sonnolenza, tremori, disturbi del linguaggio, atassia e nei casi più gravi i pazienti possono sviluppare encefalopatia e edema cerebrale.⁹ La neurotossicità può verificarsi anche in assenza di CRS, ma spesso le forme più gravi si presentano in pazienti che hanno precedentemente avuto CRS e mediamente i sintomi si risolvono entro le 3-8 settimane.

Per classificare la neurotossicità, la cui scala varia da grado 1 a grado 4, ci si riferisce alle raccomandazioni pubblicate nel 2018 dal gruppo di lavoro CAR-T cell-therapy-associated TOXicity (CARTOX) e successivamente perfezionate nel 2019 dall'American Society for Transplantation and Cellular Therapy (ASTCT), la quale ha coniato il termine sindrome da neurotossicità associata alle cellule effettrici immuni (ICANS). Nel sistema di classificazione viene assegnato un punteggio da 1 a 4 all'interno di quattro domini e un punteggio da 1 a 10 all'interno di un dominio, per un totale di cinque domini. Nel primo dominio si valuta l'encefalopatia associata alle cellule immunitarie effettrici (ICE) esaminando l'orientamento, la denominazione, la capacità di seguire i comandi, la grafia e l'attenzione assegnando a ciascuna categoria un punteggio, fino ad un massimo totale di 10 per l'intero dominio. Per gli altri quattro domini si assegna un punteggio da 1 a 4 per livello di coscienza, convulsioni, reperti motori ed evidenza di pressione intracranica elevata. Questo sistema consente di includere diverse caratteristiche cliniche, escludendo quelle con scarsa specificità e riconoscere così in maniera corretta la sindrome.³⁴

La fisiopatologia della neurotossicità non è del tutto nota, secondo alcuni studi però sembra essere correlata ai seguenti fattori: livelli elevati nel sangue di citochine infiammatorie quali IL-1, IL-6, IL-15; TNF- α , IFN- γ sono responsabili dell'insorgenza della sindrome da encefalopatia correlata alle cellule CAR-T (CRES); l'attivazione delle cellule endoteliali a livello del sistema nervoso centrale si traduce in un aumento della permeabilità della barriera ematoencefalica che consente l'ingresso delle citochine a livello del fluido cerebrospinale con conseguente sviluppo di ICANS. L'alterazione della barriera ematoencefalica e l'ingresso delle cellule infiammatorie a livello del fluido cerebrospinale portano ad un progressivo danneggiamento del sistema nervoso centrale.³³

Il trattamento d'elezione in caso di ICANS prevede la somministrazione di glucocorticoidi quali desametasone e metilprednisolone, nonostante questi possano influire nell'efficacia del trattamento con cellule CAR-T. La somministrazione degli anticorpi monoclonali Tocilizumab e Siltuximab

viene effettuata in caso di grado 1 di ICANS associata a CRS e nel caso di grado 2 di ICANS. Siltuximab è un anticorpo monoclonale che, a differenza di Tocilizumab, si lega direttamente all'interleuchina 6, bloccando la sua azione pro-infiammatoria. L'utilizzo di Siltuximab sembra essere migliore rispetto a Tocilizumab, il quale agendo da antagonista recettoriale e non riuscendo ad oltrepassare la membrana ematoencefalica, sembrava aumentare i livelli di IL-6 nel fluido cerebrospinale con ulteriore aggravamento della sintomatologia. I pazienti con grado 3 e 4 di ICANS vengono trattati con dosi elevate di glucocorticoidi che vengono progressivamente ridotte man mano che la sintomatologia migliora.³³

4.3 Effetti on-target/off-tumor

Dal punto di vista teorico il bersaglio ideale per la cellula CAR-T dovrebbe trovarsi esclusivamente sulle cellule tumorali, il cosiddetto antigene tumore-specifico (TSA). In realtà gli antigeni tumore-specifici sono molto limitati, più frequentemente si utilizzano bersagli che sono antigeni associati al tumore (TAA), ossia antigeni espressi sia nei tessuti malati che in quelli sani, generando così un certo grado di tossicità "sul bersaglio/fuori dal tumore".³³ Le cellule CAR-T iniettate vanno quindi a colpire sia le cellule tumorali che esprimono gli antigeni bersaglio, sia le cellule sane che esprimono gli antigeni bersaglio. La gravità degli effetti può variare da una gestibile deplezione dei linfociti B, fino a gravi tossicità che possono portare alla morte.

4.4 Anafilassi

La principale causa di anafilassi è dovuta al fatto che attualmente la maggior parte delle cellule CAR-T utilizzate negli studi clinici contengono domini di riconoscimento dell'antigene che derivano da anticorpi monoclonali murini. Questo causa la produzione da parte del paziente di anticorpi umani anti-topo causando un evento anafilattico IgE-mediato. Per ridurre la probabilità di insorgenza di tale evento si deve cercare di ridurre l'immunogenicità delle cellule CAR-T, questo implica due strategie: l'utilizzo di sequenze umane complete durante la costruzione di CAR; la semplificazione della struttura

di CAR attraverso la progettazione di un solo dominio variabile a catena pesante umana, senza una regione a catena leggera o un linker in modo da ridurre le dimensioni dei domini di legame.³³

4.5 Infezioni associate all'infusione di cellule CAR-T

Le infezioni associate all'infusione di cellule CAR-T sono relativamente comuni e sono principalmente infezioni batteriche, con infezioni del sangue e infezioni virali, in particolare con virus respiratori più frequenti. Il meccanismo di insorgenza di tali infezioni non è del tutto chiaro ma ci sono delle circostanze e dei pazienti che possono trovarsi in situazioni più a rischio rispetto ad altri. Pazienti che presentano la sindrome da rilascio di citochine o neurotossicità acuta, i quali necessitano del ricovero in terapia intensiva sono esposti ad un rischio maggiore di contrarre infezioni nosocomiali. La somministrazione a lungo termine di glucocorticoidi per il trattamento della sindrome da rilascio di citochine o della neurotossicità può progressivamente portare ad una riduzione delle difese immunitarie del paziente, che è così più incline a contrarre infezioni batteriche. Infine, l'infusione di cellule CD19-CAR-T può causare displasia delle cellule B e ipogammaglobulinemia, aumentando il rischio di infezione.³³

4.6 Sindrome da lisi tumorale (TLS)

La sindrome da lisi tumorale è una condizione clinica dovuta ad un massiccio rilascio in circolo di metaboliti intracellulari, causata dalla rapida lisi delle cellule tumorali andate in necrosi in seguito alla somministrazione di cellule CAR-T. I reni non eliminano completamente queste sostanze causando una serie di manifestazioni cliniche quali iperkaliemia, iperfosfatemia, iperuricemia e ipocalcemia e nei casi più gravi si manifesta insufficienza renale acuta e aritmia.³³

4.7 Displasia delle cellule B

La displasia delle cellule B è comune nella terapia con cellule CAR-T mirate al CD19, antigene espresso sia sulle cellule B maligne che benigne. Il fatto che le cellule CAR-T vadano ad attaccare sia le cellule malate che quelle

sane, fa sì che queste ultime subiscano progressivamente dei danni fino ad arrivare alla displasia delle cellule B. Questa condizione può durare un anno o anche più a lungo e porta il paziente a ipogammaglobulinemia e maggiore suscettibilità alle infezioni.³³

4.8 Disturbi della coagulazione

I disturbi della coagulazione si verificano in circa il 51%-56,6% dei pazienti con neoplasie ematologiche in seguito all'infusione con cellule CAR-T, questi disturbi si verificano entro 6-20 giorni dal trattamento. I meccanismi coinvolti nell'alterazione dei processi di coagulazione non sono del tutto noti ma possono essere collegati ai seguenti fattori: il sangue dei pazienti affetti da tumori maligni si trova in uno stato di ipercoagulabilità; gli elevati livelli di citochine infiammatorie nel sangue causano delle lesioni a livello delle cellule endoteliali vascolari inducendo un aumento del rilascio del fattore tissutale (TF), il quale combinandosi con il fattore VII della coagulazione attiva la via estrinseca della coagulazione; le fibre di collagene esposte in seguito al danno delle cellule endoteliali vascolari si combinano al fattore XII della coagulazione portando successivamente all'attivazione della via intrinseca della coagulazione; al contempo, in presenza di CRS, le cellule endoteliali vengono attivate dagli elevati livelli di citochine infiammatorie, portando al rilascio del fattore di von Willebrand, il quale favorisce la coagulazione del sangue. Nella maggior parte dei casi, quando la sindrome da rilascio di citochine viene mantenuta sotto controllo, i disturbi della coagulazione regrediscono lentamente senza la necessità di intervento. Nei casi più gravi, quando i disturbi della coagulazione peggiorano velocemente, possono causare coagulazione intravascolare disseminata (DIC) che necessita di un tempestivo intervento.³³

5. MECCANISMI DI RESISTENZA ALLA TERAPIA CON CELLULE CAR-T

I meccanismi più comuni di resistenza nelle neoplasie delle cellule B nei confronti di questa nuova immunoterapia che sfrutta i linfociti T geneticamente modificati comprendono la fuga dell'antigene e la downregulation dell'antigene bersaglio. Sebbene in molti studi clinici sia stato evidenziato un elevato tasso di risposta nei confronti della terapia con cellule CAR-T dirette contro l'antigene CD19, è altrettanto vero che la durata di queste risposte talvolta sia stata limitata dalla crescita della leucemia CD19-negativa o parzialmente negativa.³⁵

Il possibile meccanismo d'azione che porta alla perdita dell'antigene deriva dalla vasta esperienza clinica degli studi effettuati con cellule CAR-T CD19 nella leucemia linfoblastica acuta a cellule B pediatrica. Sono stati così individuati due meccanismi distinti: la fuga dell'antigene e il cambio di lignaggio. Nella fuga dell'antigene si osserva una ricaduta della malattia con fenotipo simile ma con mancata espressione superficiale dell'antigene CD19 sulle cellule bersaglio oppure con sottoregolazione dell'antigene stesso a livelli inferiori a quelli necessari per attivare i linfociti CAR. Nel cambio di lignaggio invece si osserva una ricaduta della malattia geneticamente correlata ma con fenotipo diverso, ossia in risposta all'immunoterapia diretta all'antigene CD19 il fenotipo leucemico passa da linfoide a mieloide.³⁵

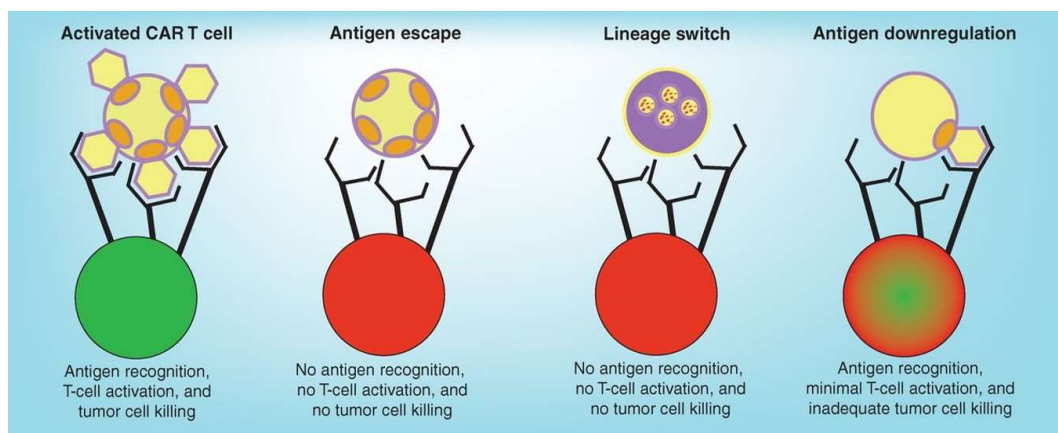


Figura 5 Meccanismi di resistenza³⁵

I dati finora raccolti suggeriscono che l'ingegnerizzazione di CAR diretto verso nuovi antigeni, che differiscano da CD19, potrebbe rivelarsi una strategia poco efficace, in quanto i meccanismi che portano alla fuga dell'antigene potrebbero portare in poco tempo ad una mancata risposta nei confronti della terapia. Per questo motivo si deve pensare a come realizzare prodotti cellulari CAR-T multispecifici, ossia in grado di essere indirizzati simultaneamente su più di un antigene. Questo può essere realizzato andando a produrre le cosiddette "cellule CAR-T tandem" oppure "cellule CAR-T bicistroniche".³⁵

Nelle cellule CAR-T tandem il recettore CAR in questione contiene due domini di legame per due diversi antigeni, portando così ad una funzionalità migliorata quando entrambi gli antigeni sono coinvolti. Le cellule CAR-T bicistroniche sono ingegnerizzate con due diversi recettori CAR espressi nella stessa cellula T; le cellule CAR-T tricistroniche, similmente alle precedenti, esprimono tre diversi recettori CAR sulla loro superficie, arrivando a colpire tre antigeni diversi. Per regolare più finemente l'attivazione del segnale nelle cellule CAR-T viene considerata l'introduzione delle porte logiche di precisione, le quali includono i circuiti AND, OR e NOT.⁶

5.1 Cellule CAR-T con porta OR

Le cellule CAR-T ingegnerizzate con una porta logica OR hanno due o tre diversi recettori per l'antigene e possono essere attivate da uno di essi. Si può trattare di cellule CAR-T tandem, bicistroniche o tricistroniche. Questo tipo di approccio può essere sfruttato per superare il problema della perdita dell'antigene che porta alle ricadute della malattia nei pazienti.

5.2 Cellule CAR-T con porta AND

Il cancello logico con porta AND può essere realizzato andando ad operare su due diversi recettori espressi sulla stessa cellula T: un recettore viene progettato con il dominio citoplasmatico di trasmissione del segnale CD3z, mentre il secondo recettore viene progettato con il dominio di co-

stimolazione CD28 o 4-1BB. Questo consente un'attivazione completa della cellula T solo nel momento in cui entrambi i recettori siano stati occupati dal rispettivo antigene; infatti, quando il primo recettore si lega all'antigene corrispondente viene attivato il segnale primario, il quale però non è sufficiente per portare a completa attivazione la cellula T, finché non viene legato anche il secondo antigene.

Un particolare tipo di recettore progettato con cancello logico con porta AND è rappresentato dal recettore "SynNotch". Quando il recettore SynNotch lega l'antigene bersaglio, attraverso il dominio extracellulare, subito viene innescata una scissione proteolitica del dominio intracellulare. Questo, essendo un fattore di trascrizione sintetico, una volta rilasciato entra nel nucleo e si lega a specifici fattori di trascrizione, portando all'espressione di un secondo recettore per un altro antigene. In questo modo viene garantito un profilo di sicurezza migliore, in quanto il secondo recettore viene espresso solo in prossimità delle cellule tumorali, nel momento in cui è stato legato il primo antigene.⁶

5.3 Cellule CAR-T con porta NOT

Il cancello logico con porta NOT è stato ideato per prevenire la tossicità nei tessuti sani. Anche in questo caso si opera su due diversi recettori CAR espressi sulla stessa cellula T: il primo recettore una volta legatosi al suo antigene corrispondente attiva le cellule T, il secondo recettore invece inibisce fortemente l'attivazione delle cellule T nel momento in cui lega il suo antigene. Questo consente di bloccare l'attivazione delle cellule T nel momento in cui queste siano andate a legarsi ad un antigene presente nei tessuti sani.⁶

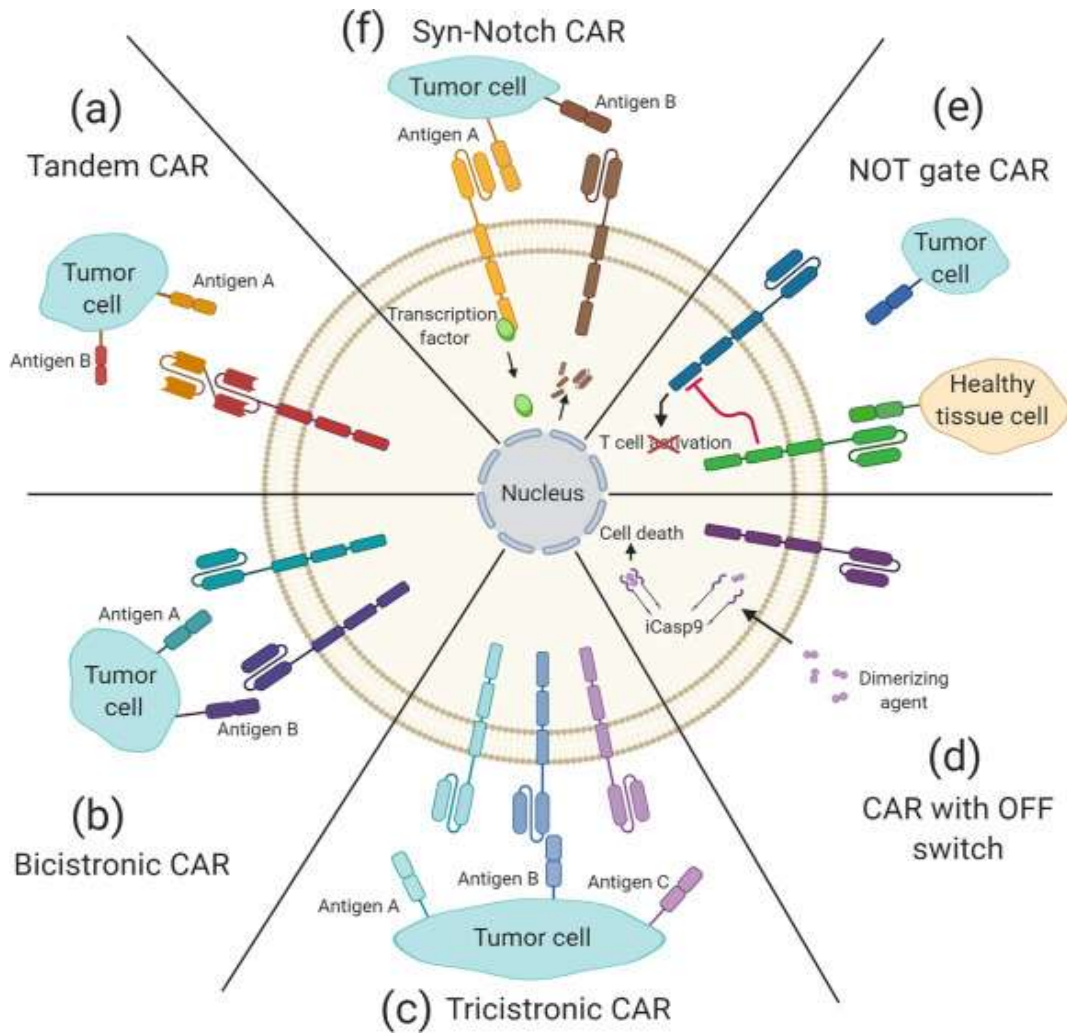


Figura 6 Cellule CAR-T multispecifiche⁶

6. LA TERAPIA CON CELLULE CAR-T IN ITALIA

La strada percorsa dalle terapie a base di cellule CAR-T fino ad oggi è stata molto lunga, ma sarà altrettanto lunga e complessa quella che dovrà essere percorsa in futuro. Oltre ai limiti dal punto di vista clinico che dovranno essere approfonditi e superati subentra il problema dei costi della terapia, delle risorse da impiegare per mettere in atto tutto l'iter terapeutico, delle modalità di accesso alla terapia per i pazienti e delle modalità di formazione e di informazione per quanto riguarda queste terapie avanzate.

Delle tre terapie a base di cellule CAR-T approvate in Italia, Kymriah[®], Yescarta[®] e Tecartus[®] è stato messo in atto un modello di pagamento particolare, detto “payment at results”, per due di esse. Questo modello di pagamento dipende dall'outcome dei pazienti in seguito al trattamento e consente un maggiore frazionamento dei costi con più momenti di rivalutazione della terapia. Nel caso di Kymriah[®] il pagamento viene suddiviso in tre momenti: il primo al momento dell'infusione, il secondo a distanza di 6 mesi e il terzo dopo 12 mesi. Per quanto riguarda Yescarta[®] invece viene effettuato il primo pagamento a 180 giorni dalla prima infusione, il secondo a 270 e infine il terzo a 365 giorni. Questa modalità di pagamento differisce leggermente da quella adottata normalmente per i farmaci oncologici detta “payment by result”, che prevede un pagamento da parte del Servizio Sanitario Nazionale e una rivalutazione del trattamento a distanza di 3 o 6 mesi con un eventuale rimborso da parte dell'industria nel caso sia emersa l'inefficacia del trattamento. L'approccio “payment at result” consente di valutare in maniera più accurata i dati nella fase post-marketing, che nel caso delle terapie a base di cellule CAR-T non coinvolgono un esiguo numero di pazienti, limitando quindi alcune valutazioni. Inoltre, trattandosi di seconde o terze linee di trattamento va considerato che spesso le previsioni effettuate su alcuni pazienti possono cambiare in corso d'opera, andando a modificare la numerosità dei pazienti da sottoporre alla terapia e di conseguenza le risorse stanziare.⁴

Dal punto di vista pratico, dalla prima terapia approvata fino ad oggi, si osserva come ciascuna Regione abbia messo in atto dei modelli organizzativi propri, sulla base dei propri centri e delle proprie risorse. Questo si traduce in una organizzazione disomogenea sul piano Nazionale, che si ripercuote inevitabilmente sui pazienti. Per ricevere queste terapie, infatti, spesso il paziente deve recarsi in un'altra regione, accompagnato da un familiare che deve farsi carico di tutti gli aspetti logistici che un trasferimento lontano da casa, seppur temporaneo, comporta. Per questo motivo ciò che si auspica in futuro, sia da parte di chi somministra le terapie, sia da parte di chi le riceve, è una rete di organizzazione e di informazione a livello Nazionale. In questo modo si consentirebbe una corretta individuazione del paziente adatto ad essere sottoposto alla terapia, a livello dei centri periferici e un corretto avviamento dell'iter di preparazione presso il centro che prende in carico il paziente.⁴

Facendo riferimento al secondo volume, pubblicato ad aprile 2022, del progetto "Cell Therapy Open Source" dal titolo "Le terapie CAR-T: l'accesso ai pazienti", scaricabile dal sito di Osservatorio Terapie Avanzate, si possono considerare alcuni dati per quanto riguarda il numero di pazienti trattati finora con questo tipo di terapie. Con le terapie a base di cellule CAR-T disponibili in commercio, a giugno 2021, sono stati trattati un totale di 151 pazienti, escludendo le terapie infuse durante le sperimentazioni cliniche. Per quanto riguarda le terapie a base di cellule CAR-T erogate in ambito pediatrico e giovane adulto, fino a 25 anni, sono stati trattati un totale di 27 giovani pazienti. Se si considerano i centri in cui sono state erogate le terapie, ci si concentra in poche regioni, quali Lombardia, Lazio, Toscana, Liguria, Sicilia, Piemonte e Abruzzo, e in particolare in pochi centri come l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, l'Ospedale San Gerardo di Monza, l'Istituto Clinico Humanitas, l'Ospedale San Raffaele di Milano, l'Ospedale Papa Giovanni XXIII di Bergamo, l'Ospedale Regina Margherita di Roma e il Meyer di Firenze.⁴ Da questi dati emerge quanto i centri specializzati nella somministrazione di queste terapie siano scarsamente numerosi, quanto il numero di pazienti che possono ricevere la terapia sia

ristretto e quanto sia necessario istituire una rete di comunicazione e di informazione che colleghi l'intero territorio italiano a questi centri.³⁶

6.1 Istituzione di un diagnosis related group (DRG)

Per definire un modello di lavoro più omogeneo e garantire la presenza di una prestazione in maniera più sistematica si dovrà istituire il cosiddetto Diagnosis Related Group (DRG), ossia un gruppo di lavoro specifico per le terapie a base di cellule CAR-T con cui assicurare un percorso di cura adeguato al paziente. Questo deve iniziare dal giusto processo di informazione: l'arrivo di queste terapie in Italia ha suscitato grande interesse ed entusiasmo ma allo stesso tempo può aver creato confusione, illudendo alcune persone che questo tipo di trattamento fosse adatto ad ogni forma di malattia. In realtà solo alcuni pazienti, con determinate caratteristiche di malattia sono adatti ad essere candidati a questo tipo di trattamento. Per tale ragione è necessario promuovere una corretta informazione che metta al corrente i pazienti del reale scenario terapeutico. In questo compito possono prestare il loro aiuto le associazioni che accompagnano i pazienti nel loro percorso, esse infatti facendo da tramite tra il medico e il paziente, se adeguatamente formate, possono essere un punto di riferimento per entrambe le parti e possono colmare quel vuoto che esiste tra la realtà ospedaliera e la vita quotidiana del malato. Così facendo, l'associazione non risulterà solo utile dal punto di vista assistenziale, ma potrà rispondere alle vere esigenze del paziente in un contesto più ampio e completo. L'informazione non riguarda solo il paziente, ma anche il medico, infatti, per questo tipo di terapia sono coinvolte diverse figure quali l'ematologo, l'esperto in trapianti, il neurologo, il rianimatore, il medico di medicina trasfusionale e il medico di laboratorio. Tutte queste figure devono operare in sinergia e collaborazione tra loro in modo da garantire una corretta valutazione del paziente e una corretta esecuzione della terapia. Si parla infatti di team multidisciplinare, caratterizzato dalla presenza di diverse figure, ciascuna altamente specializzata in una particolare tematica ma tutte capaci di operare in un contesto più ampio, collaborando tra professionisti e offrendo così una preparazione completa al servizio del paziente.³⁶

Un ulteriore aspetto di criticità viene rappresentato dal fatto che il paziente a cui sono destinate le terapie a base di cellule CAR-T è una persona in attesa della terza linea di trattamento, parliamo quindi di persone che hanno già affrontato un percorso difficile e sono di fronte a più insuccessi, con una malattia che a quello stadio può già essere fuori controllo. La prontezza e l'organizzazione nel mettere in atto la procedura per le cellule CAR-T è quindi fondamentale, considerando che si sta parlando di terapie per cui sono necessari dei tempi di preparazione piuttosto lunghi. Questo viene reso possibile mettendo in atto una stretta collaborazione tra i Centri Spoke, che individuano il paziente, e i centri Hub che somministrano la terapia e rendendo facilmente fruibile una piattaforma nazionale, comodamente accessibile, che tenga in costante aggiornamento i protocolli scientifici e le corrette procedure di selezione dei pazienti. Oltre ai protocolli scientifici e agli aspetti strettamente clinici è importante velocizzare anche il processo dal punto di vista burocratico, istruendo all'interno del gruppo di lavoro per le cellule CAR-T anche il personale amministrativo.³⁶

Nasce così l'idea di realizzare un software o un algoritmo che consenta di individuare con una certa tempestività il possibile paziente adatto ad essere sottoposto alla terapia CAR-T. Lo si potrebbe realizzare definendo i criteri nei quali un paziente deve rientrare già dalla diagnosi e nelle fasi iniziali di malattia per poter essere indirizzato alla terapia con cellule CAR-T. Se all'esordio della malattia, il paziente presenta caratteristiche molecolari o cliniche che comportano un'elevata probabilità di fallimento della prima linea terapeutica, con il software o l'algoritmo dovrebbe essere rilevato, in modo tale da poter segnalare tale paziente al centro Hub per l'eventuale presa in carico. Nel caso in cui tale previsione si sia rilevata errata, non ci sarà la necessità di inviare il paziente al centro Hub, ma nel caso di fallimento della prima linea terapeutica si procederà alla seconda, considerando una elevata probabilità di fallimento e la possibilità di avviare il paziente al trattamento con cellule CAR-T. In questo caso il paziente si troverebbe in una sorta di lista d'attesa per il trattamento, la quale gli consentirebbe di accedere nelle condizioni di salute più idonee, senza dover attendere troppo

tempo e rischiare di avere un peggioramento che non consenta l'accesso alla terapia. Tutto questo avverrebbe previa valutazione dell'esito della seconda linea di trattamento e delle condizioni cliniche in cui il paziente si trova al termine di questa. Con l'utilizzo dell'algoritmo, oltre a garantire una corretta individuazione del paziente, si consentirebbe anche agli ematologi del centro Spoke di comunicare tempestivamente con il centro Hub, ottimizzando le tempistiche di attivazione della procedura nel caso in cui questa si riveli necessaria.³⁶

7. NUOVE PROSPETTIVE

I successi raggiunti con le cellule CAR-T dirette contro l'antigene CD19 nelle neoplasie ematologiche hanno aumentato l'interesse nei confronti di questo approccio, nonostante il suo utilizzo clinico risulti ancora per certi aspetti limitato. I costi della terapia, la complessità dell'iter di produzione, il profilo di sicurezza e la persistenza talvolta non ottimale stanno indirizzando la ricerca verso nuove frontiere. Si parla di sviluppare terapie con cellule CAR-T allogeniche, si studia un possibile impiego di questa terapia nei confronti dei tumori solidi e si ipotizza di combinare la terapia con cellule CAR-T con altri trattamenti, nell'ottica di migliorare l'esito da parte dei pazienti.⁷

7.1 Cellule CAR-T allogeniche

Tutti i prodotti a base di cellule CAR-T esistenti oggi sul mercato sono autologhi, ossia sono realizzati a partire dagli stessi linfociti T prelevati dal paziente, si tratta infatti di una vera e propria terapia personalizzata. Per aumentare l'accessibilità a questo tipo di trattamento si sta pensando alla possibilità di mettere in atto la terapia cellulare universale CAR-T (UCAR-T), sfruttando linfociti T prelevati da donatori sani.³⁷ La possibilità di utilizzare cellule CAR-T allogeniche, derivanti da donatori sani, porterebbe a notevoli vantaggi: le cellule sarebbero pronte da utilizzare al momento del bisogno, senza la necessità di attendere il tempo necessario a tutto l'iter produttivo; l'accesso a questa terapia verrebbe esteso a più pazienti, i costi di produzione verrebbero ridotti e in alcuni casi le cellule ingegnerizzate risulterebbero più funzionali. Talvolta, infatti, diverse forme di leucemie causano una disfunzione delle cellule T che si ripercuote sulla loro funzionalità in seguito all'ingegnerizzazione.

Se viene presa in considerazione la possibilità di utilizzare le cellule T di un donatore sano subentra il problema della compatibilità tra donatore e ricevente, cioè ci si deve assicurare che le cellule dell'uno e dell'altro siano HLA compatibili, ovvero presentino gli stessi antigeni di istocompatibilità. Questo riduce notevolmente la possibilità di una condizione nota come Graft versus Host Disease (GvHD), la Malattia del Trapianto contro l'ospite, nella

quale i linfociti del donatore non riconoscendo come propri i tessuti del ricevente iniziano a colpirli e viene ridotta anche la probabilità di andare incontro a rigetto delle cellule CAR-T da parte del ricevente.³⁸ Esistono due strade percorribili per lo sviluppo di cellule CAR-T allogeniche: l'utilizzo di cellule T che derivano dal donatore del trapianto allogenico e l'utilizzo di cellule T che derivano da donatori sani e vengono sottoposte a editing genetico. Il primo approccio rappresenta una possibilità ma allo stesso tempo è una strada poco praticabile; questo perché il trapianto allogenico di cellule staminali rappresenta uno standard di cura nel caso di ricaduta dopo la prima linea terapeutica, ma non risolve il problema della necessità di avere i linfociti T già pronti per essere utilizzati. In questo caso si valuta la possibilità di utilizzare le cellule T dello stesso donatore che ha fornito le cellule staminali per il trapianto allogenico precedente, essendo così certi che donatore e paziente siano HLA-compatibili. Il secondo approccio invece sfrutta il fatto di prelevare i linfociti T da pazienti sani, indipendentemente dalla compatibilità con i riceventi, e sottoporli a tecniche di editing genomico che evitino l'espressione del recettore delle cellule T (TCR) in modo tale che una volta ingegnerizzate con il recettore CAR e infuse nel paziente non portino a fenomeni di rigetto o malattia da trapianto contro l'ospite. In questo caso qualsiasi soggetto sano potrebbe diventare un potenziale donatore, ma si deve anche considerare che le tecniche di editing genetico potrebbero comunque comportare dei rischi che sono ancora oggetto di studio e valutazione. In questo senso ci sono delle buone premesse ma sono necessari ancora dei progressi.⁷

7.2 Cellule CAR-T contro i tumori solidi

Il successo della terapia con cellule CAR-T nei confronti delle neoplasie ematologiche ha sicuramente spinto oltre l'interesse, iniziando a pensare ad una possibile applicazione anche in altri campi, come ad esempio i tumori solidi. Anche in questo ambito sono stati compiuti molti sforzi, esaminando ostacoli e opportunità ma soprattutto considerando le diversità che caratterizzano i tumori solidi.³⁹

In primo luogo, i tumori solidi sono caratterizzati da un'ampia eterogeneità per quanto riguarda gli antigeni bersaglio: a differenza delle neoplasie ematologiche si è osservata una scarsa presenza di marcatori di superficie cellulare specifici. Di conseguenza, la ricerca di antigeni tumore-specifici (TSA) risulta particolarmente difficile e si utilizzano come target bersaglio gli antigeni associati al tumore (TAA), i quali non sono espressi soltanto dalle cellule tumorali ma anche dai tessuti sani, comportando dei problemi di sicurezza. Inoltre, questa diversità antigenica viene riscontrata anche in diversi pazienti che hanno lo stesso tipo di tumore, rendendo la progettazione di CAR ancora più complessa. In questo caso, per aumentare la capacità delle cellule CAR-T di colpire gli antigeni appropriati, si pensa ad una progettazione del recettore chimerico che prenda di mira contemporaneamente più bersagli. Si parla, come anticipato precedentemente, di prodotti CAR-T "multispecifici" come le cellule CAR-T tandem o le cellule CAR-T bicistrioniche e tricistrioniche. Questi sistemi offrono una maggiore flessibilità e una maggiore capacità di riconoscimento dell'antigene, inoltre possono essere progettati anche per ridurre i fenomeni di tossicità fuori bersaglio.³⁹

In secondo luogo, nei tumori solidi bisogna considerare la capacità delle cellule CAR-T di raggiungere il sito tumorale dove agire. Questo può sembrare un concetto banale, ma in realtà l'ambiente tumorale che si viene a creare risulta essere molto ostile e l'infiltrazione di cellule CAR-T non è così immediata. Il microambiente tumorale, dall'acronimo inglese TME che indica "Tumor Microenvironment", presenta una serie di peculiarità che lo rendono in grado di costruire una sorta di barriera che impedisce l'ingresso delle cellule immunitarie dall'esterno e garantisce una crescita incontrollata del tumore. La matrice extracellulare è composta da diverse macromolecole quali proteine fibrose, glicosaminoglicani e proteoglicani; viene prodotta dalle cellule tumorali stesse e dai fibroblasti associati al cancro e svolge un ruolo fondamentale nella progressione della malattia, fornendo una barriera fisica all'ingresso di varie terapie antitumorali. L'ipossia tumorale, definita come una carenza di disponibilità di ossigeno, è una caratteristica

importante dei tumori solidi che porta ad un adattamento metabolico delle cellule tumorali. Quando la disponibilità di ossigeno diminuisce, a livello nucleare si attivano dei promotori di diversi geni che codificano per proteine che mediano l'adattamento cellulare all'ipossia, come gli enzimi glicolitici e il fattore di crescita vascolare endoteliale. In questo modo le cellule tumorali sono in grado di proliferare anche in un ambiente sfavorevole e al contempo rendono difficile la sopravvivenza delle cellule immunitarie, tra cui i linfociti T, che tentano di penetrare nella massa tumorale. L'ipossia viene causata da un'eccessiva vascolarizzazione del tumore, la quale costituisce una vera e propria barriera fisica per l'infiltrazione nel tumore, e da una rapida proliferazione delle cellule tumorali.⁴⁰ Un altro aspetto che caratterizza il microambiente tumorale è la presenza di cellule immunitarie come i macrofagi associati al tumore, le cellule T regolatorie e le cellule soppressive di derivazione mieloide che creano un ambiente immunosoppressivo e ostacolano la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule CAR-T.⁴⁰ Inoltre, le stesse cellule CAR-T, una volta attivate esprimono recettori, come PD-1, la cui interazione con dei ligandi secreti dalle cellule tumorali provoca l'inattivazione della cellula T e il blocco della risposta antitumorale. Questa scoperta ha evidenziato il potere dei linfociti T nel controllo dei tumori solidi e ha portato così ad un nuovo approccio terapeutico con i cosiddetti inibitori del checkpoint immunitario. Si tratta di anticorpi monoclonali che bloccano l'interazione tra i recettori inibitori presenti sulle cellule T e i loro ligandi, andando ad impedire il blocco dell'immunità antitumorale.⁴⁰

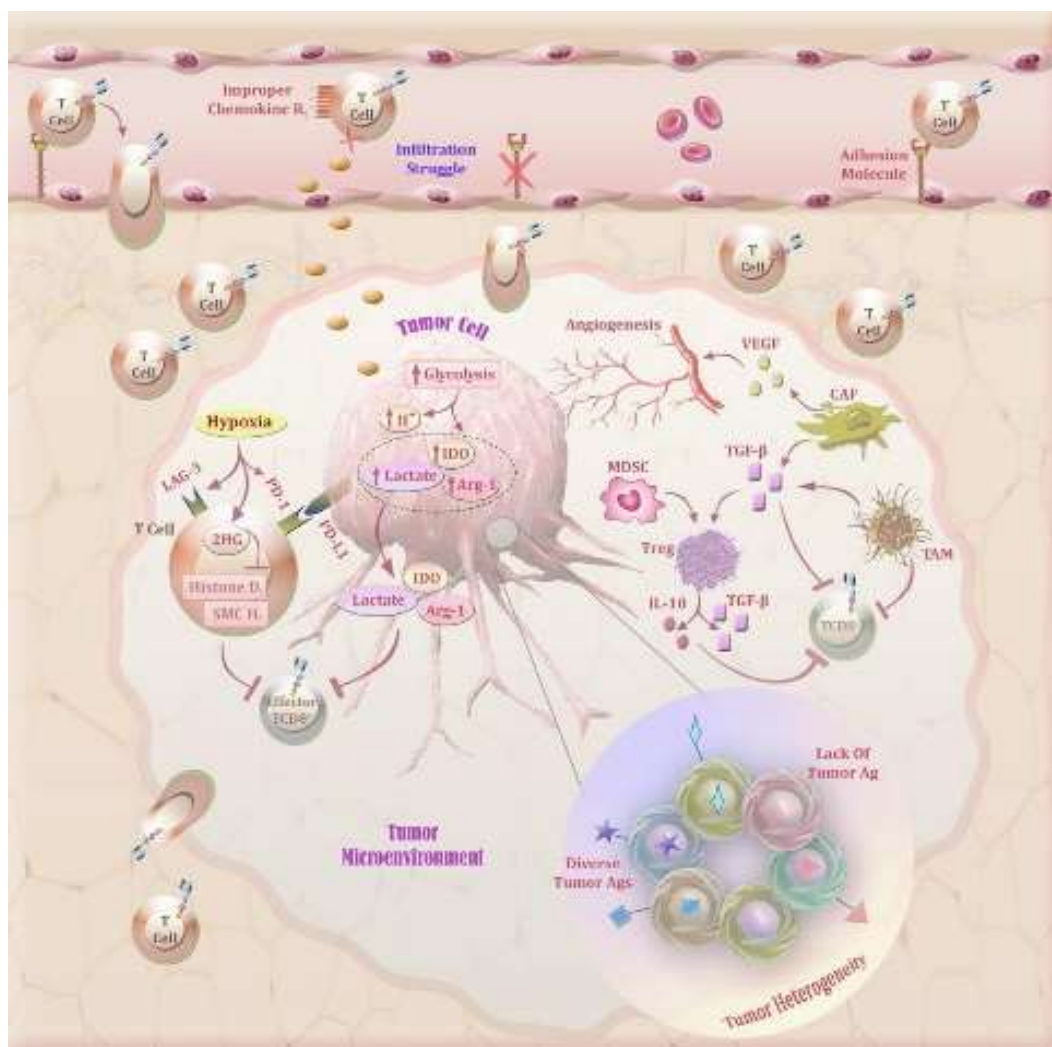


Figura 7 Microambiente tumorale³⁹

Nonostante le numerose difficoltà incontrate finora nel tentativo di estendere l'utilizzo delle cellule CAR-T nei tumori solidi, gli studi stanno proseguendo. Avendo compreso le caratteristiche che contraddistinguono l'ambiente tumorale come le barriere fisiche, le cellule immunitarie, l'ipossia e in generale la capacità di immunosoppressione si sta volgendo l'attenzione verso strategie sinergiche, in grado di rimodellare il microambiente tumorale e conferire maggior resistenza intrinseca delle cellule CAR-T, puntando su più aspetti contemporaneamente.⁴⁰

7.3 Combinazione di terapie

Nei tumori solidi si è visto che il successo della terapia con cellule CAR-T è legato a diversi fattori, in quanto l'ambiente tumorale risulta essere molto

diverso rispetto alle neoplasie ematologiche. Questo limita molto l'efficacia delle cellule CAR-T, tanto che la ricerca si è spinta a trovare soluzioni alternative; oltre alla progettazione di CAR multispecifici, che in parte potrebbero risolvere il problema dell'eterogeneità degli antigeni, si sta pensando alla combinazione di diverse terapie nel tentativo di sfruttare la sinergia di più approcci.² Alcune possibili strategie vedono la combinazione delle cellule CAR-T con i virus oncolitici, con trattamenti chemioterapici e radioterapici e con gli inibitori del checkpoint immunitario.

I virus oncolitici sono agenti antitumorali che infettano selettivamente le cellule tumorali portandole alla morte. Presentano due diversi meccanismi d'azione, il primo prevede la lisi diretta delle cellule tumorali infette e il secondo porta allo sviluppo dell'immunità adattativa antitumorale. L'unico virus oncolitico approvato dalla Food and Drug Administration è il Talimogene laherparepvec (T-VEC), prodotto dal virus dell'Herpes Simplex di tipo 1 (HSV-1), per pazienti affetti da melanoma. I virus oncolitici sono in grado di aiutare le cellule CAR-T nel tentativo di superare gli ostacoli messi in atto dai tumori solidi nei seguenti modi: promuovono il processo oncolitico delle cellule tumorali una volta che le hanno infettate, questo genera la liberazione di antigeni associati al tumore che innescano la risposta immunitaria adattativa riducendo il processo di fuga dell'antigene; promuovono il traffico di cellule CAR-T e l'invasione del tumore emettendo dei segnali che attivano l'immunità antitumorale; queste azioni nel complesso migliorano l'attività effettrice delle cellule CAR-T, prolungando la loro sopravvivenza.² La potenzialità dell'associazione di queste potenti immunoterapie è stata osservata in studi preclinici, i quali hanno portato all'autorizzazione del primo studio clinico nell'uomo. Si tratta di uno studio dal titolo *“Un primo studio di fase I sull'uomo sull'adenovirus oncolitico binario in combinazione con cellule T CAR autologhe specifiche per HER2 in pazienti con tumori solidi HER2 positivi avanzati”*. Sono stati arruolati, su base volontaria, un totale di 45 pazienti affetti da un tipo di cancro chiamato positivo per HER2, acronimo inglese che indica il recettore 2 del fattore di crescita epidermico, “Human Epidermal Growth Factor Receptor 2”. Lo

studio è attualmente in corso e mira a valutare l'efficacia dell'associazione di cellule CAR-T autologhe dirette verso il recettore HER2 e un adenovirus oncolitico e il dosaggio migliore dei due trattamenti.⁴¹

Un secondo approccio mira alla combinazione delle cellule CAR-T con agenti chemioterapici come ciclofosfamide, doxorubicina, fluorouracile, i quali sarebbero in grado di aumentare l'infiltrazione delle cellule T nel sito tumorale attraverso due meccanismi. Il primo è quello di aumentare la produzione di chemochine nel sito del tumore, le quali legandosi ai recettori presenti sui linfociti CAR-T promuovono il loro ingresso nel tumore attraverso la formazione di un gradiente chemiotattico. Il secondo è quello di rendere le cellule tumorali più sensibili al granzima B secreto dalle cellule CAR-T.²

Anche la radioterapia, associata alle cellule CAR-T, mostra un effetto sinergico. Dal momento che la radioterapia può aumentare il rilascio di antigeni tumorali in seguito alla radiazione, la sua associazione con le cellule CAR-T aiuta a prevenire il fenomeno della fuga dell'antigene. In questo modo l'azione delle cellule CAR-T viene facilitata grazie alla presenza di un quantitativo sufficiente di bersagli tale da attivare le cellule T.²

Infine, un ulteriore approccio in grado di prevenire l'esaurimento delle cellule CAR-T e mantenere le loro funzioni effettrici, è la combinazione con gli inibitori di checkpoint immunitario. La presenza di un ambiente tumorale particolarmente immunosoppressivo rende la capacità di sopravvivenza delle cellule CAR-T molto difficile; l'utilizzo di questi anticorpi monoclonali in grado di bloccare il tentativo di soppressione della risposta antitumorale, interponendosi tra i ligandi rilasciati dalle cellule tumorali e recettori inibitori presenti sulle cellule T, fornisce un valido aiuto all'efficacia terapeutica delle cellule CAR-T.²

CONCLUSIONI

A conclusione di questo elaborato si può ribadire quanto l'immunoterapia nella lotta contro il cancro rappresenti una branca della ricerca in costante evoluzione. In particolare, la possibilità di prelevare i linfociti T dal paziente ed "armarli" nei confronti delle cellule tumorali, in un'ottica di terapia mirata verso uno specifico bersaglio, ha reso possibile il trattamento di alcune neoplasie ematologiche considerate incurabili. Ciò che cambia in queste nuove terapie è la concezione stessa di farmaco, che non viene più inteso come molecola di sintesi, bensì come terapia cellulare viva che viene prodotta a partire dalle cellule stesse del paziente, per questo motivo è nata l'espressione: "living therapy". L'evoluzione dell'ingegneria genetica ha permesso di sviluppare nuove generazioni del recettore chimerico antigenico CAR, portando ad un progressivo miglioramento del recettore e di conseguenza ad una migliore risposta effettrice da parte dei linfociti T. Le terapie a base di cellule CAR-T che hanno ricevuto l'approvazione e sono attualmente disponibili in commercio sono indicate come terza linea di trattamento in pazienti che hanno avuto una recidiva di malattia o non hanno risposto ad una o due linee di trattamento precedenti, rappresentano quindi una sorta di ultima possibilità nei confronti di una malattia che si ripresenta e sembra non dare scampo. I limiti che ancora rendono la terapia con cellule CAR-T non facilmente accessibile sono gli eventi avversi, che in alcuni casi possono portare ad esiti infausti. Per questo motivo, la comprensione dei meccanismi alla base di importanti effetti collaterali risulta fondamentale per consentire un intervento tempestivo ed evitare gli esiti peggiori. La complessità del processo produttivo delle cellule CAR-T e il loro elevato costo hanno evidenziato quanto ancora ci sia da lavorare per consentire di migliorare non solo l'accesso alla terapia, ma anche la corretta individuazione e presa in carico del paziente. La ricerca si sta muovendo anche per estendere il campo di applicazione delle cellule CAR-T nei confronti dei tumori solidi, dimostrando quanto l'interesse nei confronti di questo approccio antitumorale sia elevato. Per concludere, si può affermare che la terapia con cellule CAR-T abbia cambiato le prospettive di cura per

alcuni pazienti; essa rappresenta un punto di partenza per dei possibili sviluppi futuri, ha aperto la strada verso un cambio di paradigma per quanto riguarda la lotta contro i tumori, pur dovendo mantenere alta l'attenzione verso i possibili effetti collaterali.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- (1) Corbellini, G.; Biondi, A.; Bonini, C.; Fagioli, F.; Vitolo, U.; Foà, R.; Bombaci, F.; Ricci, A.; Fabio, C.; Andrea, U.; et al. Alleanza per il CAR-T. *Quotidiano sanità* **2019**.
- (2) Mehrabadi, A. Z.; Ranjbar, R.; Farzanehpour, M.; Shahriary, A.; Dorostkar, R.; Hamidinejad, M. A.; Ghaleh, H. E. G. Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: A scoping review. *Biomed Pharmacother* **2022**, *146*, 112512. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112512.
- (3) Ahmad, U., Zafran Ualiyeva, DaniyaAmisshah, Obed Boadi Noor, ZohaibKhan, AsafZaman, Nasib Khan, MarwaKhan, Ayub Ali, Babar. Chimeric antigen receptor T cell structure, its manufacturing, and related toxicities; A comprehensive review. *Advances in Cancer Biology - Metastasis* **2022**, *4*, Review. DOI: 10.1016/j.adcanc.2022.100035.
- (4) Armeni, P.; Ceradini, F.; Corradini, P.; Fagioli, F.; Iannelli, E.; Jommi, C.; Locatelli, F.; Mantovani, A.; Nardi, S.; Nolli, M. L.; et al. *Le terapie CAR-T: dal laboratorio al paziente*; srl, R., Ed.; Osservatorio Terapie Avanzate, 2020.
- (5) Vishwasrao, P.; Li, G.; Boucher, J. C.; Smith, D. L.; Hui, S. K. Emerging CAR T Cell Strategies for the Treatment of AML. *Cancers (Basel)* **2022**, *14* (5). DOI: 10.3390/cancers14051241.
- (6) Uboldi, I.; Poduval, P.; Jai Prakash. Chapter One - Engineering solutions to design CAR-T cells. In *Engineering Technologies and Clinical Translation*, Mansoor M. Amiji, L. S. M., Engineering Technologies and Clinical Translation, Press, A. Eds.; Vol. 3; Elsevier, 2022; pp 1-31.
- (7) Terzaghi, A.; Norata, D.; Spelta, E. The science of CAR-T cells. In *Pharmastar*, MedicalStar: 2020.
- (8) Benmebarek, M. R.; Karches, C. H.; Cadilha, B. L.; Lesch, S.; Endres, S.; Kobold, S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (6). DOI: 10.3390/ijms20061283.
- (9) Abreu, T. R.; Fonseca, N. A.; Gonçalves, N.; Moreira, J. N. Current challenges and emerging opportunities of CAR-T cell therapies. *J Control Release* **2020**, *319*, 246-261. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.12.047.
- (10) Wei, F.; Cheng, X. X.; Xue, J. Z.; Xue, S. A. Emerging Strategies in TCR-Engineered T Cells. *Front Immunol* **2022**, *13*, 850358. DOI: 10.3389/fimmu.2022.850358.
- (11) Dalboni, A. *Nuove terapie per i tumori del sangue*, *Notiziario Chimico Farmaceutico* (NCF). <https://www.notiziariochimicofarmaceutico.it/2019/10/21/nuove-terapie-per-i-tumori-del-sangue/> (accessed).

- (12) *Leucemia*, Associazione italiano contro leucemie linfomi e mieloma (AIL). <https://www.ail.it/patologie-e-terapie/patologie-ematologiche/leucemia> (accessed).
- (13) *Leucemia linfoblastica acuta del bambino*, Associazione italiana per la ricerca sul Cancro (AIRC). <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori-pediatrici/leucemia-linfoblastica-acuta-bambino> (accessed).
- (14) *Linfomi*, Associazione italiana contro leucemie linfomi e mieloma (AIL). <https://www.ail.it/patologie-e-terapie/patologie-ematologiche/linfomi> (accessed).
- (15) Marchesi, F.; Avvisati, G. *Linfomi non Hodgkin*, Associazione italiana contro leucemie linfomi e mieloma (AIL). <https://www.ail.it/eventi-e-manifestazioni/uova-di-pasqua/26-ail-area-medica/patologie-ematologiche/112-linfomi-non-hodgkin> (accessed).
- (16) Lees, C.; Keane, C.; Gandhi, M. K.; Gunawardana, J. Biology and therapy of primary mediastinal B-cell lymphoma: current status and future directions. *Br J Haematol* **2019**, *185* (1), 25-41. DOI: 10.1111/bjh.15778.
- (17) *Mieloma Multiplo (MM): che cos'è*, Osservatorio delle Malattie Rare. <https://www.osservatoriomalattierare.it/38-descrizioni/sezioni/1646-mieloma-multiplo-mm-che-cose> (accessed).
- (18) *Per quali pazienti sono indicate*, Associazione italiana contro leucemie linfomi e mieloma (AIL). <https://www.ail.it/patologie-e-terapie/terapie/car-t/l-accesso-alle-car-t/per-quali-pazienti-sono-indicate> (accessed).
- (19) *Scala dello stato delle prestazioni ECOG*, ECOG-ACRIN research cancer group. <https://ecog-acrin.org/resources/ecog-performance-status/> (accessed).
- (20) *Terapie Approvate*, Osservatorio Terapie Avanzate. <https://www.osservatorioterapieavanzate.it/terapie-approvate> (accessed).
- (21) *Kymriah*, European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah> (accessed).
- (22) *Esattamente, a cosa serve la terapia CAR-T?* Associazione italiana contro leucemie linfomi e mieloma Milano (AIL Milano). <https://ailmilano.it/esattamente-a-cosa-serve-la-terapia-car-t/#:~:text=Juliet%20C3%A8%20il%20pi%C3%B9%20grande,difuso%20a%20grandi%20cellule%20B> (accessed).
- (23) *Yescarta*, European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yescarta> (accessed).

- (24) *Report Tecnico Yescarta, Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)*. https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1307543/Yescarta_Report_Tecnico_28.07.2021.pdf (accessed).
- (25) *Tecartus, European Medicines Agency (EMA)*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tecartus> (accessed).
- (26) *Abecma, European Medicines Agency (EMA)*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/abecma#assessment-history-section> (accessed).
- (27) *Breyanzi, European Medicines Agency (EMA)*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/breyanzi> (accessed).
- (28) *Transcend NHL 001, ClinicalTrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02631044?term=TRANSCEND+NHL+001&draw=2&rank=1> (accessed).
- (29) *Transcend FL, ClinicalTrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04245839?term=JCAR017&draw=2&rank=1> (accessed).
- (30) Lei, W.; Xie, M.; Jiang, Q.; Xu, N.; Li, P.; Liang, A.; Young, K. H.; Qian, W. Treatment-Related Adverse Events of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR T) in Clinical Trials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)* **2021**, *13* (15). DOI: 10.3390/cancers13153912.
- (31) Shimabukuro-Vornhagen, A.; Gödel, P.; Subklewe, M.; Stemmler, H. J.; Schläpfer, H. A.; Schlaak, M.; Kochanek, M.; Böll, B.; von Bergwelt-Baildon, M. S. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* **2018**, *6* (1), 56. DOI: 10.1186/s40425-018-0343-9.
- (32) Fischer, J. W.; Bhattarai, N. CAR-T Cell Therapy: Mechanism, Management, and Mitigation of Inflammatory Toxicities. *Front Immunol* **2021**, *12*, 693016. DOI: 10.3389/fimmu.2021.693016.
- (33) Miao, L.; Zhang, Z.; Ren, Z.; Li, Y. Reactions Related to CAR-T Cell Therapy. *Front Immunol* **2021**, *12*, 663201. DOI: 10.3389/fimmu.2021.663201.
- (34) Tallantyre, E. C.; Evans, N. A.; Parry-Jones, J.; Morgan, M. P. G.; Jones, C. H.; Ingram, W. Neurological updates: neurological complications of CAR-T therapy. *J Neurol* **2021**, *268* (4), 1544-1554. DOI: 10.1007/s00415-020-10237-3.
- (35) Majzner, R. G.; Mackall, C. L. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov* **2018**, *8* (10), 1219-1226. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0442.
- (36) Angelucci, E.; Cairoli, R.; Maria, R. D.; Manfredi, S.; Orzes, E.; Petruzzelli, D.; Saccardi, R. *Le terapie CAR-T: l'accesso ai pazienti*; srl, R., Ed.; Osservatorio Terapie Avanzate, 2022.

- (37) Lin, H.; Cheng, J.; Mu, W.; Zhou, J.; Zhu, L. Advances in Universal CAR-T Cell Therapy. *Front Immunol* **2021**, *12*, 744823. DOI: 10.3389/fimmu.2021.744823.
- (38) *Compatibilità e sistema HLA, Associazione italiana contro leucemie linfomi e mieloma (AIL)*. <https://www.ail.it/patologie-e-terapie/patologie-ematologiche/linfomi/11-ail-area-medica/215-compatibilita-e-sistema-hla> (accessed).
- (39) Khorasani, A. B. S.; Sanaei, M. J.; Pourbagheri-Sigaroodi, A.; Ghaffari, S. H.; Bashash, D. CAR T cell therapy in solid tumors; with an extensive focus on obstacles and strategies to overcome the challenges. *Int Immunopharmacol* **2021**, *101* (Pt B), 108260. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108260.
- (40) Rodriguez-Garcia, A.; Palazon, A.; Noguera-Ortega, E.; Powell, D. J.; Guedan, S. CAR-T Cells Hit the Tumor Microenvironment: Strategies to Overcome Tumor Escape. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1109. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01109.
- (41) *Adenovirus oncolitico binario in combinazione con CAR autologo specifico per HER2*, *ClinicalTrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03740256?term=NCT03740256&draw=2&rank=1> (accessed).

