

Per mettere a punto le terapie basate sul **Dna** ci è voluto più tempo di quanto si pensasse. Ma la **rivoluzione** infine sta per compiersi.

di Elena Meli

I traguardi delle cure genetiche

LA SEQUENZA

Un gel per il sequenziamento del Dna. Nelle barre colorate i biologi leggono il codice della vita.



Le terapie avanzate

Le terapie avanzate (Advanced Therapy Medicinal Product, o ATMP) di cui fanno parte le CAR-T, sono farmaci veri e propri ma non di sintesi chimica bensì basati su geni, cellule e tessuti, geneticamente modificati in laboratorio e poi somministrati al paziente.

Esse comprendono 4 diverse tipologie di prodotti medicinali:

- medicinali di terapia genica
- medicinali di terapia cellulare
- medicinali di ingegneria tissutale
- medicinali di terapia avanzata combinata

I medicinali di terapia genica curano una malattia agendo direttamente sulla componente genetica che l'ha causata. La terapia genica sfrutta la tecnica del DNA ricombinante e funziona andando a supplementare, tramite un virus inattivato e innocuo (vettore virale), un tratto di DNA (gene ricombinante terapeutico) creato in laboratorio nelle cellule dell'organismo per correggere il difetto genetico. Ad oggi, la terapia genica risulta utile soprattutto per la cura di malattie genetiche ereditarie per le quali il gene difettoso è noto (per esempio, la fibrosi cistica), ma in futuro potrebbe essere utilizzata anche per curare tumori, malattie cardiovascolari e neurodegenerative.

I medicinali di terapie cellulari si basano sull'utilizzo di cellule o tessuti che sono stati manipolati per cambiare le loro caratteristiche biologiche, o su cellule e tessuti non destinati ad essere utilizzati per le stesse funzioni originali. La terapia cellulare viene utilizzata per curare ma anche per diagnosticare e prevenire le malattie. Attualmente, la terapia cellulare più utilizzata è il trapianto di cellule staminali del sangue per trattare tumori ematologici come linfomi, leucemie, mielomi, o malattie del sistema immunitario. Inoltre, è ormai comune anche l'utilizzo delle staminali della pelle per trapianti in pazienti con gravi ustioni.

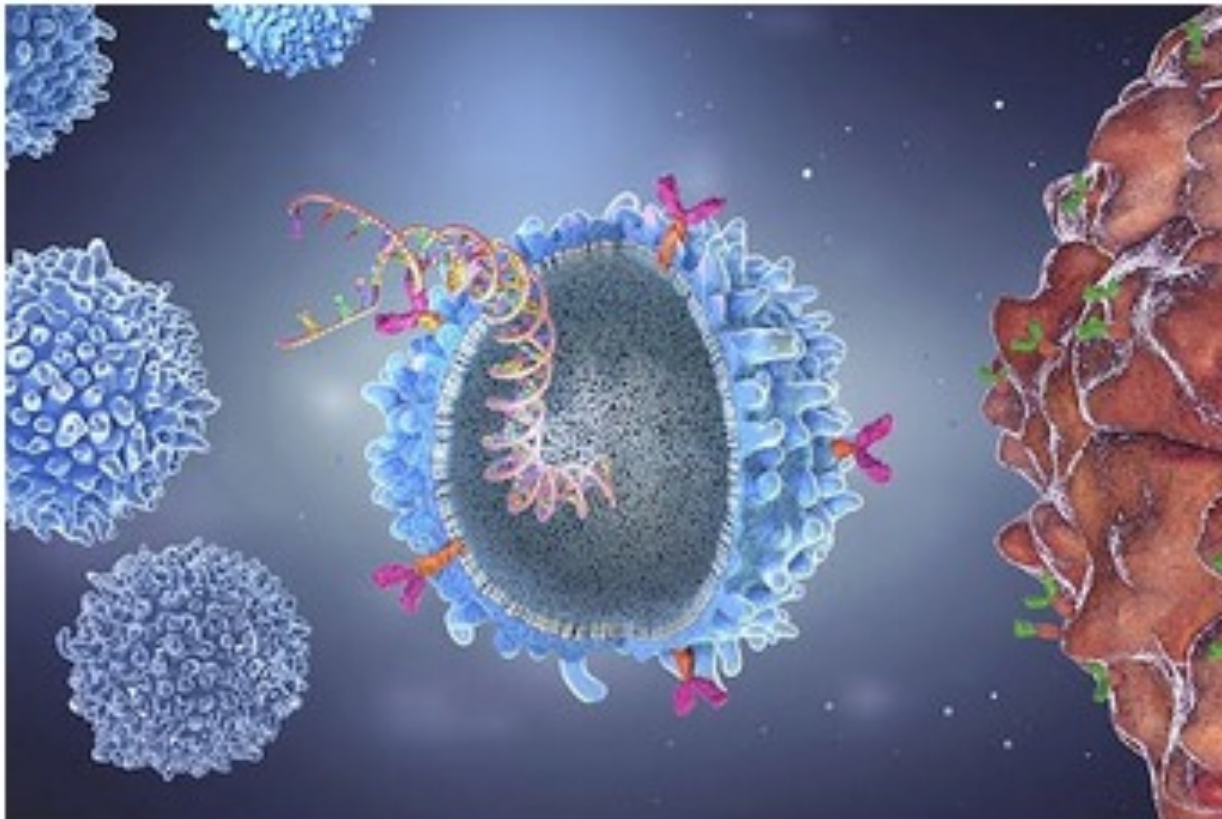
I medicinali di ingegneria tissutale sono costituiti da cellule e tessuti modificati in modo da poter essere impiegati per riparare, rigenerare o sostituire tessuti umani. Si tratta di farmaci estremamente innovativi che negli ultimi anni hanno portato numerosi benefici in diversi ambiti clinici come la reumatologia, l'oncologia, le malattie rare, l'onco-ematologia e l'infettivologia.

I medicinali di terapia avanzata combinati contengono all'interno uno o più dispositivi medici parte integrante del farmaco. Un esempio sono le cellule fatte crescere su matrici biodegradabili o supporti sintetici.

Le CAR-T possono essere considerate in parte terapie cellulari, in quanto utilizzano cellule immunitarie come i linfociti T, in parte terapie geniche, in quanto i linfociti T vengono "ingegnerizzati", ossia modificati geneticamente.

Che cosa sono le terapie cellulari?

- Le terapie cellulari rientrano tra le cosiddette terapie avanzate, in grado di offrire nuove e innovative opportunità di trattamento.
- Utilizzano una preparazione di cellule o tessuti manipolati in laboratorio, in modo che le caratteristiche siano modificate.



**Cellule, i nuovi farmaci
viventi**



“L’unico farmaco contro il cancro è già dentro di noi: è il nostro sistema immunitario”

Prof. Luigi Chieco Bianchi
Professore emerito di Oncologia,
Università di Padova

REVIEW ARTICLE

FRONTIERS IN MEDICINE

Chimeric Antigen Receptor Therapy

Carl H. June, M.D., and Michel Sadelain, M.D., Ph.D.

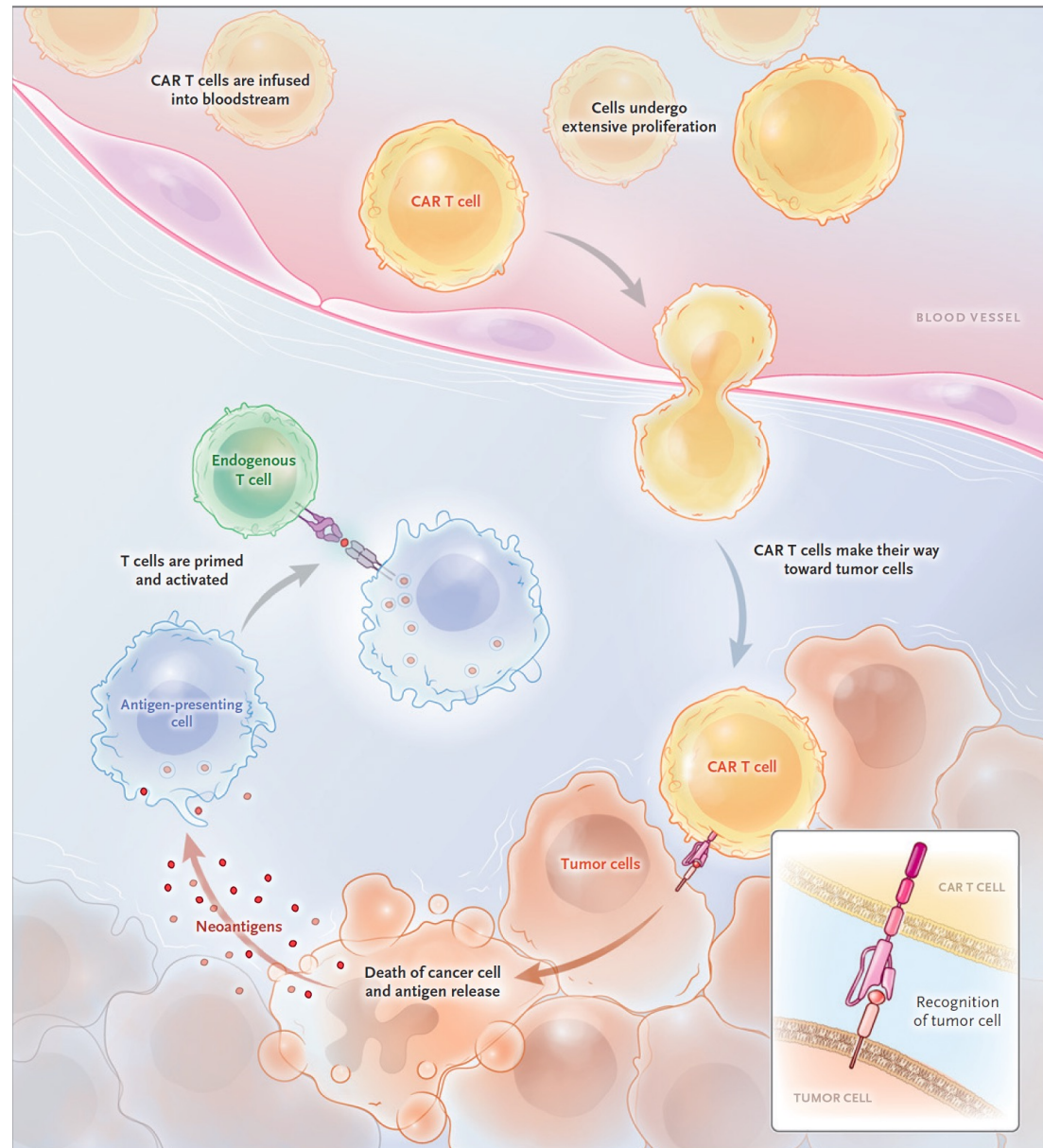


Figure 1. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells Engrafting, Trafficking to Tumor, and Proliferating Extensively after Infusion.

After infusion, CAR T cells leave the blood and travel to sites of tumor, where they identify and kill tumor cells. This can trigger extensive proliferation of CAR T cells and the release of tumor antigens, which activates the immune system to recruit non-CAR T cells, thus eliciting further antitumor responses in a process known as cross priming.

CAR-T cell therapy

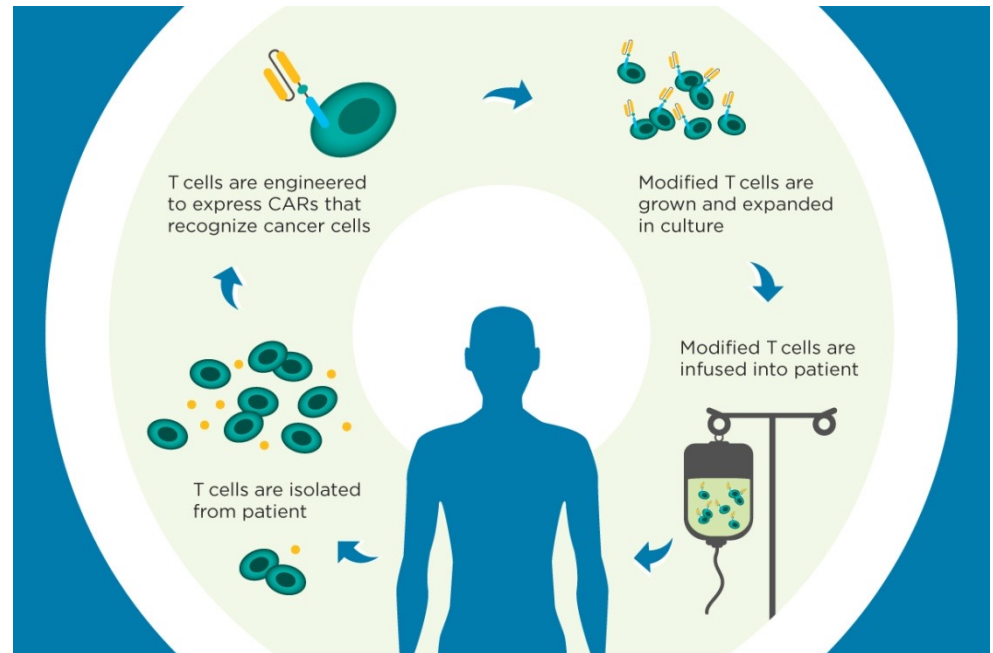
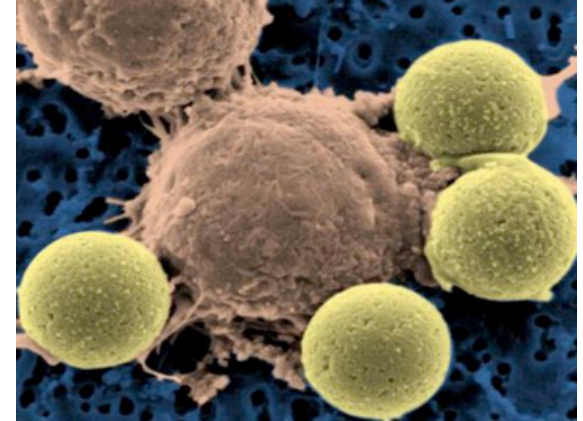
Engineering Patients' Immune Cells to Treat Their Cancers

Chimeric antigen receptors (CARs)

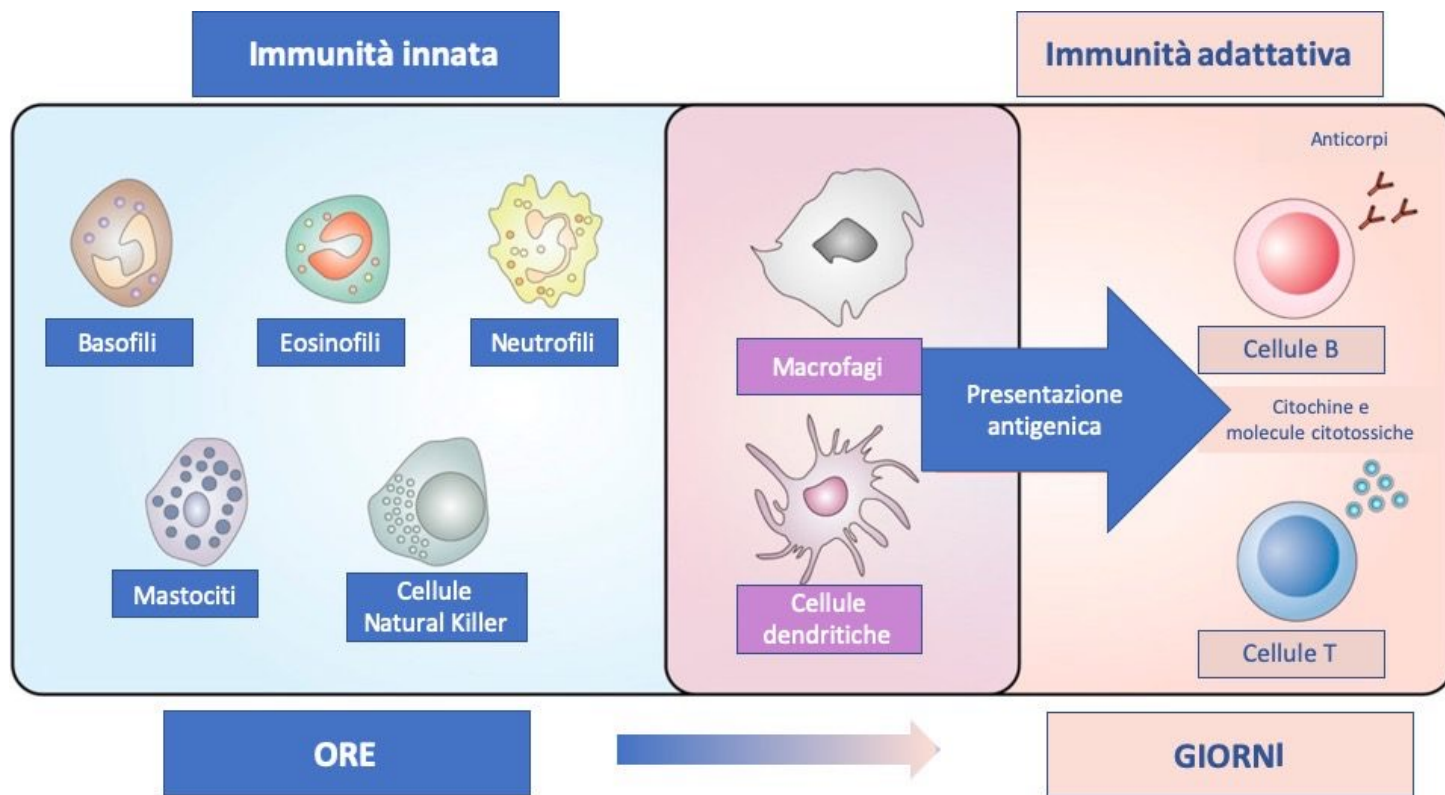
Adoptive cell transfer is like “giving patients a living drug,”

Immunotherapy—therapies that harness the power of a patient's immune system to combat their disease,

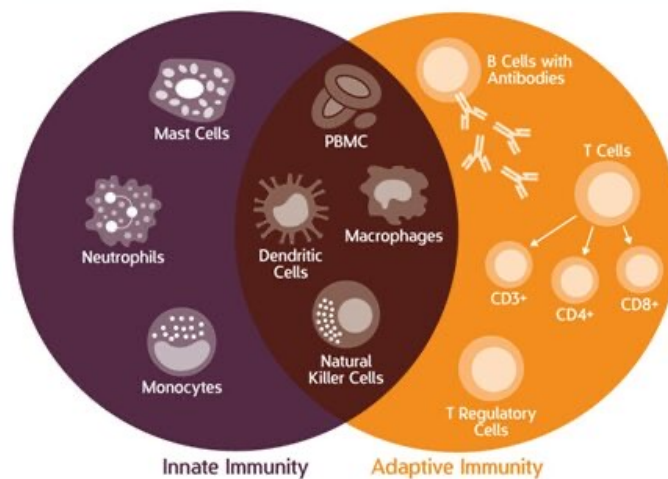
One approach :
immunotherapy involves
engineering patients' own immune
cells to recognize and attack their
tumors-remarkable responses in
patients with advanced cancer.



➤ Facciamo un passo indietro...



Cells of the Innate and Adaptive Immune Systems

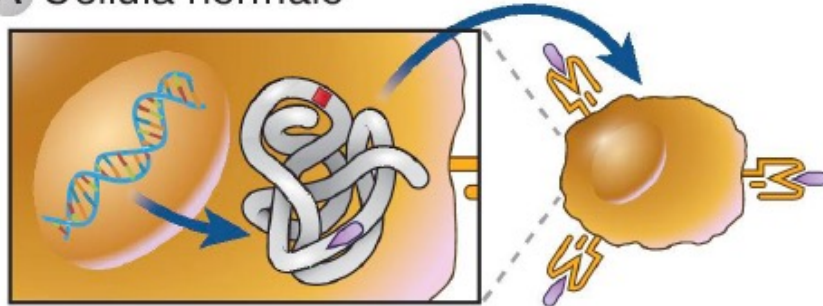


Le cellule tumorali presentano antigeni peculiari:

- **Antigeni tumore-specifici (TSA):**
peculiari delle cellule tumorali
- **Antigeni tumore-associati (TAA)**
Espressi anche sulle cellule normali

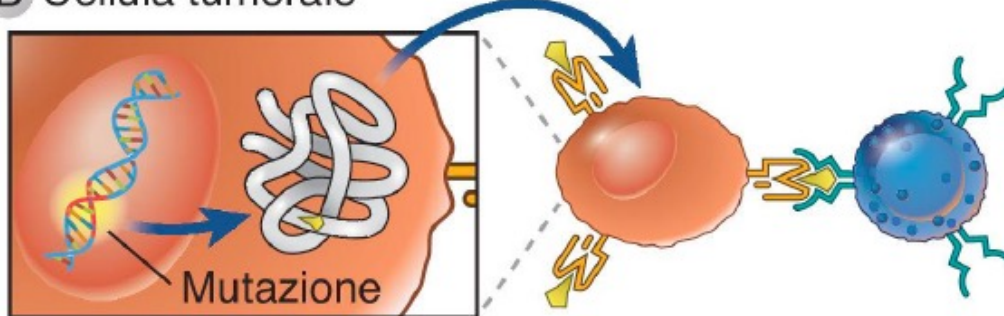
Antigeni tumori specifici

A Cellula normale



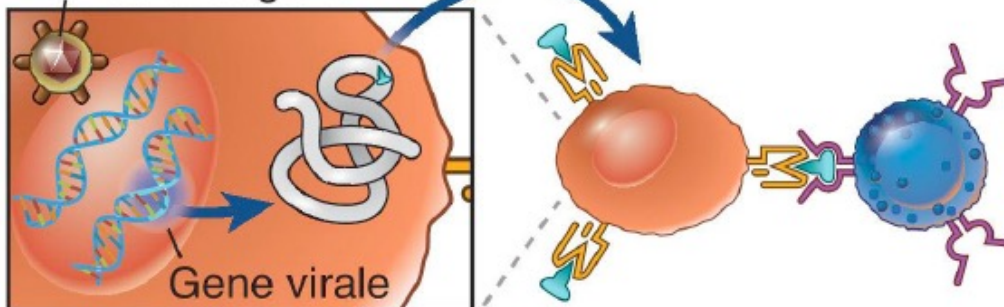
Peptidi self normali presentati su MHC; assenza risposta T dovuta a tolleranza

B Cellula tumorale



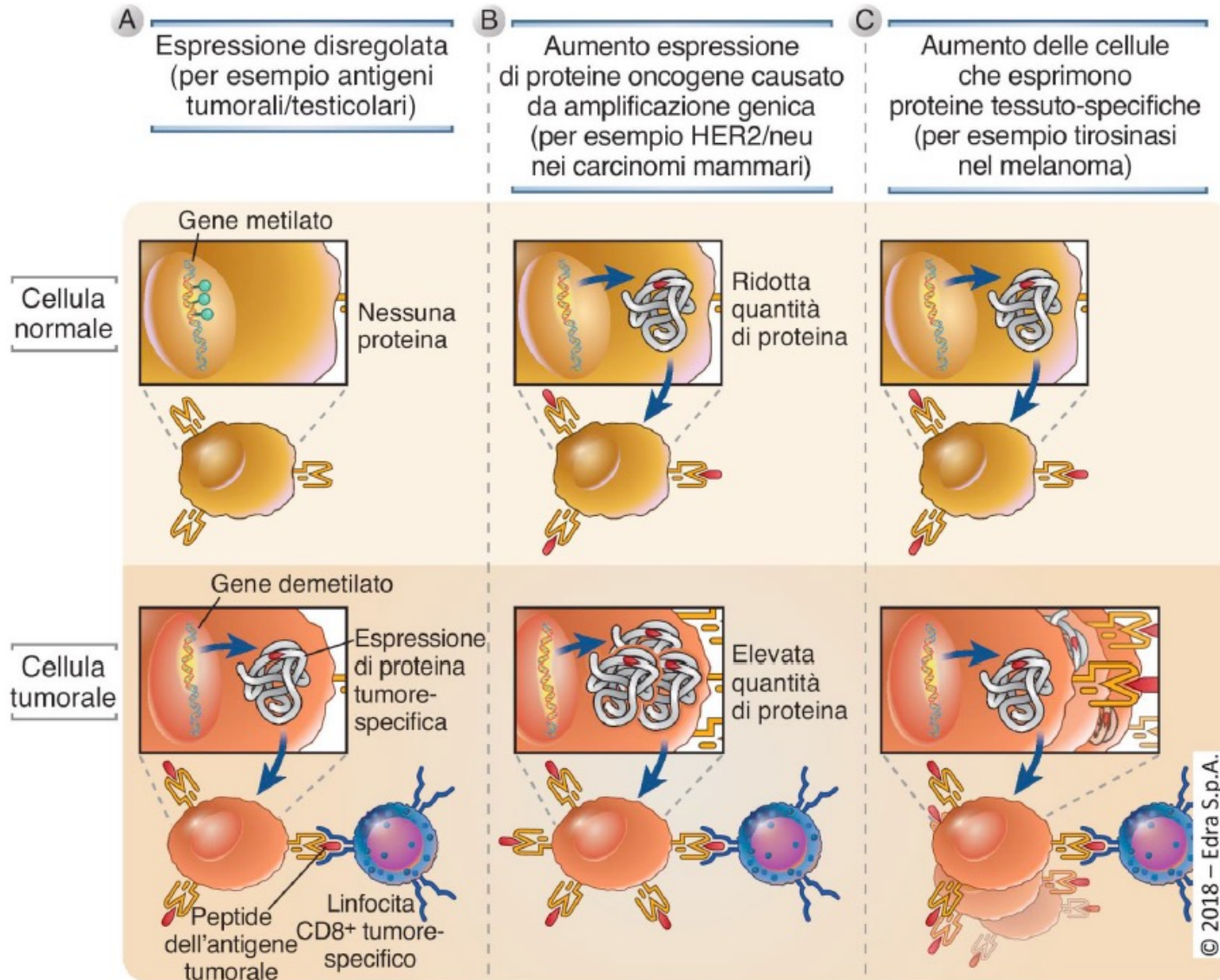
Neopitopi generati da mutazioni $\Rightarrow$ Nuovi residui che legano il TCR: risposta linfociti T

C Cellula tumorale
Virus oncogeno

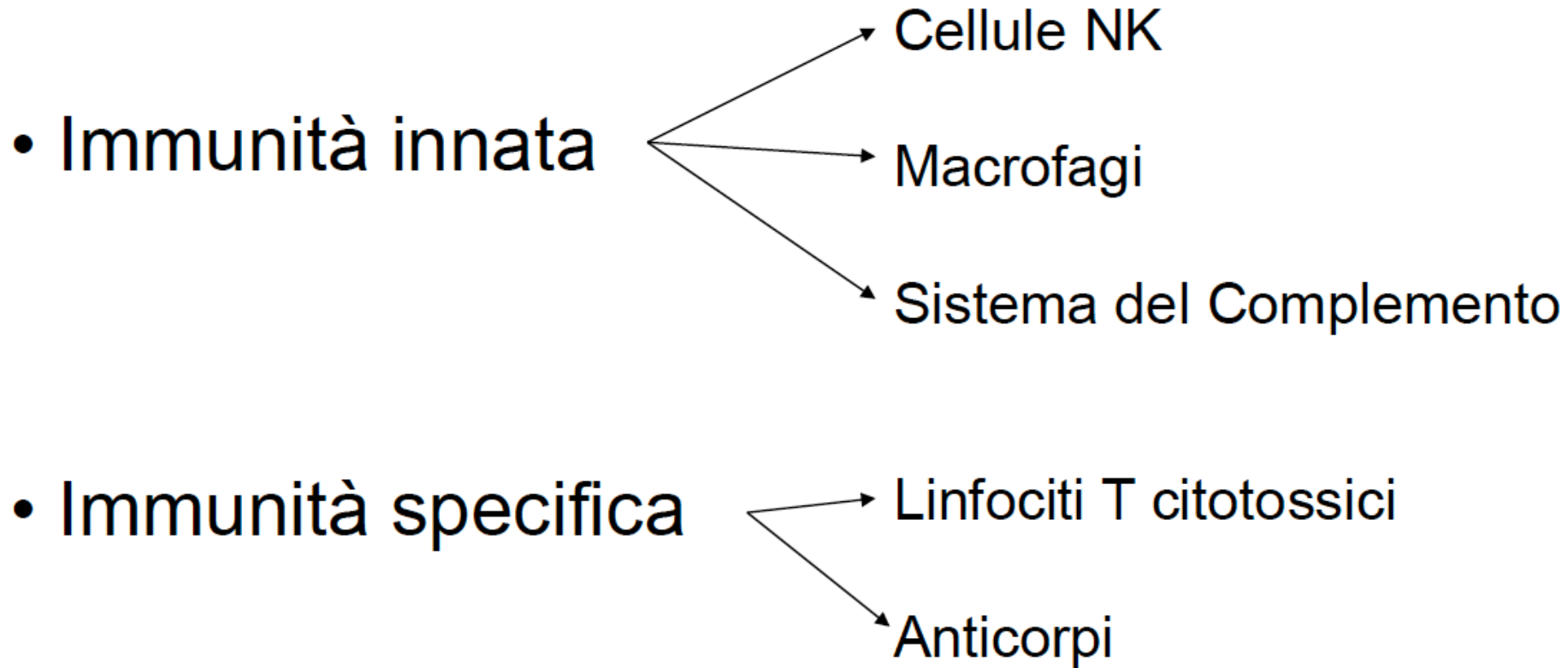


Peptidi da proteine codificate da un virus oncogeno; risposta linfocita T

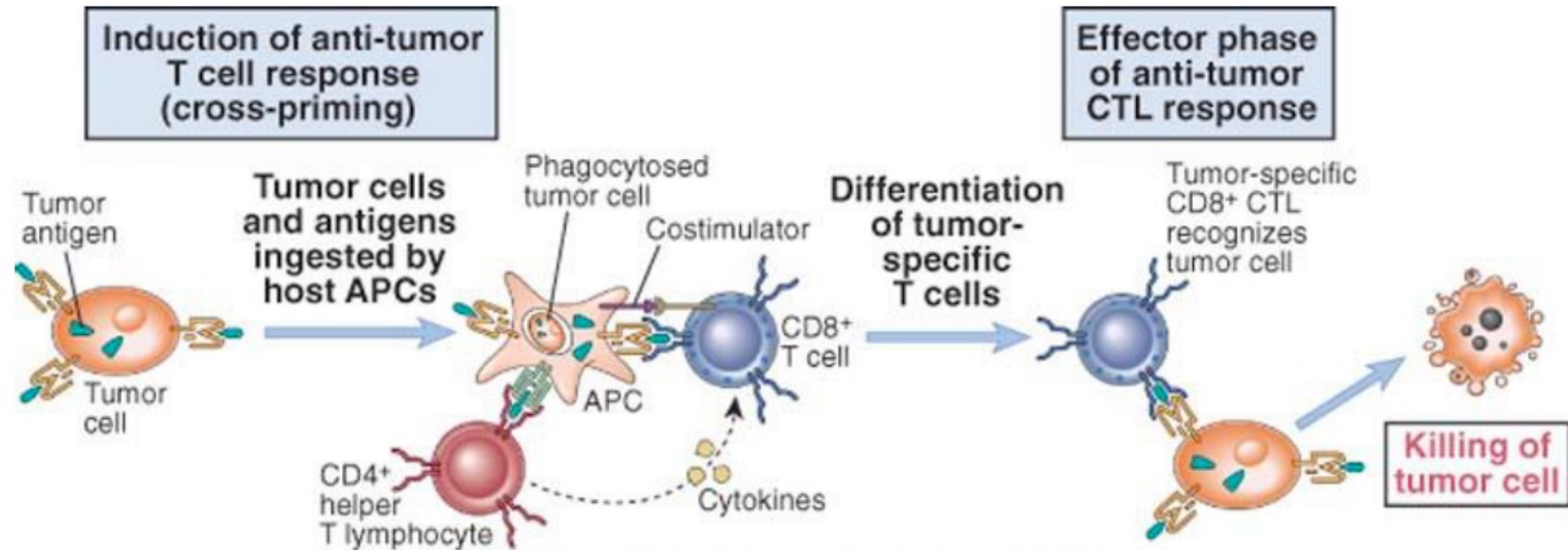
Antigeni tumorali tumore-associati



Risposta immunitaria alle cellule tumorali

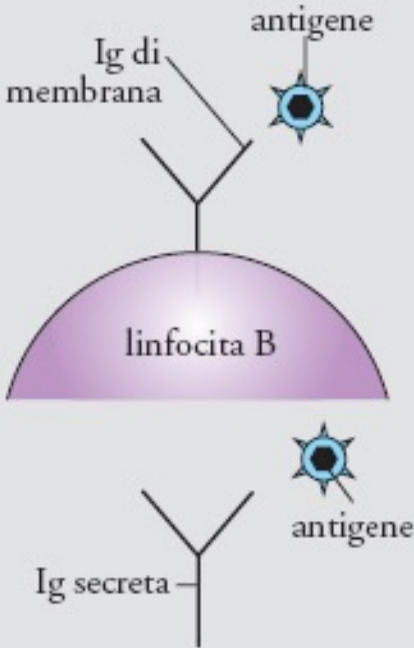
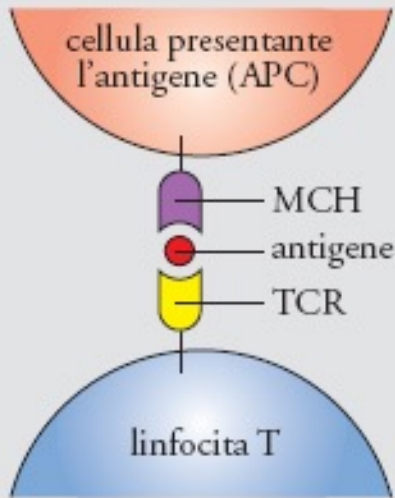


Cross-presentazione dell'antigene



Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, Updated 6th Edition.
Copyright © 2009 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

Tab. I Riconoscimento antigenico

RECETTORI SPECIFICI PER L'ANTIGENE	ANTICORPO (immunoglobulina)	RECETTORE T (TCR)
	 The diagram illustrates the B cell receptor (Ig di membrana) on a B cell (linfocita B) and secreted antibodies (Ig secreta) binding to an antigen (antigene). The antigen is represented as a blue star-like molecule.	 The diagram shows a T cell (linfocita T) interacting with an Antigen Presenting Cell (APC). The APC presents an antigen (antigene) via a Major Histocompatibility Complex (MCH) molecule to the T cell receptor (TCR).
forme di antigene riconosciute	macromolecole (proteine, polisaccaridi, lipidi, acidi nucleici); sostanze chimiche di piccolo peso molecolare	peptidi presentati da molecole MHC espresse sulla APC
riconoscimento dell'antigene mediato da:	regioni V delle catene leggere e pesanti delle Ig	regioni V delle catene α e β del TCR
affinità del legame con l'antigene	alta; l'affinità media delle Ig aumenta nel corso della risposta immunitaria	bassa
diversificazione	ogni clone di linfociti B possiede una specificità unica	ogni clone di linfociti T possiede una specificità unica

Il recettore TCR dei linfociti T

Ogni linfocita esprime il proprio TCR, che è diverso dal TCR di un altro linfocita.

Questa variabilità è fondamentale per il riconoscimento dei diversi antigeni.

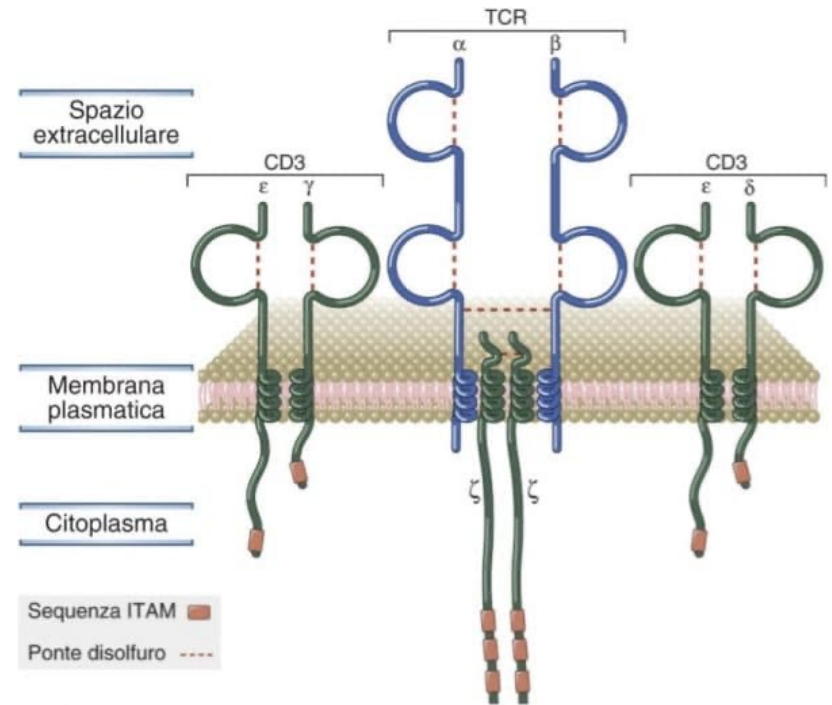
Quando un linfocita avente il TCR lega un antigene, tale linfocita viene attivato e si scatena la risposta immunitaria.

L'attivazione consiste nell'**espansione clonale** del linfocita, che darà origine a milioni di copie che usciranno dall'organo linfoide secondario per dirigersi nel sito dove avrà luogo l'azione.

Struttura di un recettore TCR

IL TCR è simile a un anticorpo. Ci sono due catene polipeptidiche, α e β , caratterizzate dalla presenza di **domini immunoglobulinici** e aventi due regioni l'una: la **regione variabile** e la **regione costante**. Le due regioni variabili insieme costituiscono il sito di legame per l'antigene.

Ciò che cambia quindi tra diversi ricettori è solo la regione variabile. In questo modo, pur avendo tutti una struttura simile, essi sono in grado di riconoscere antigeni diversi.



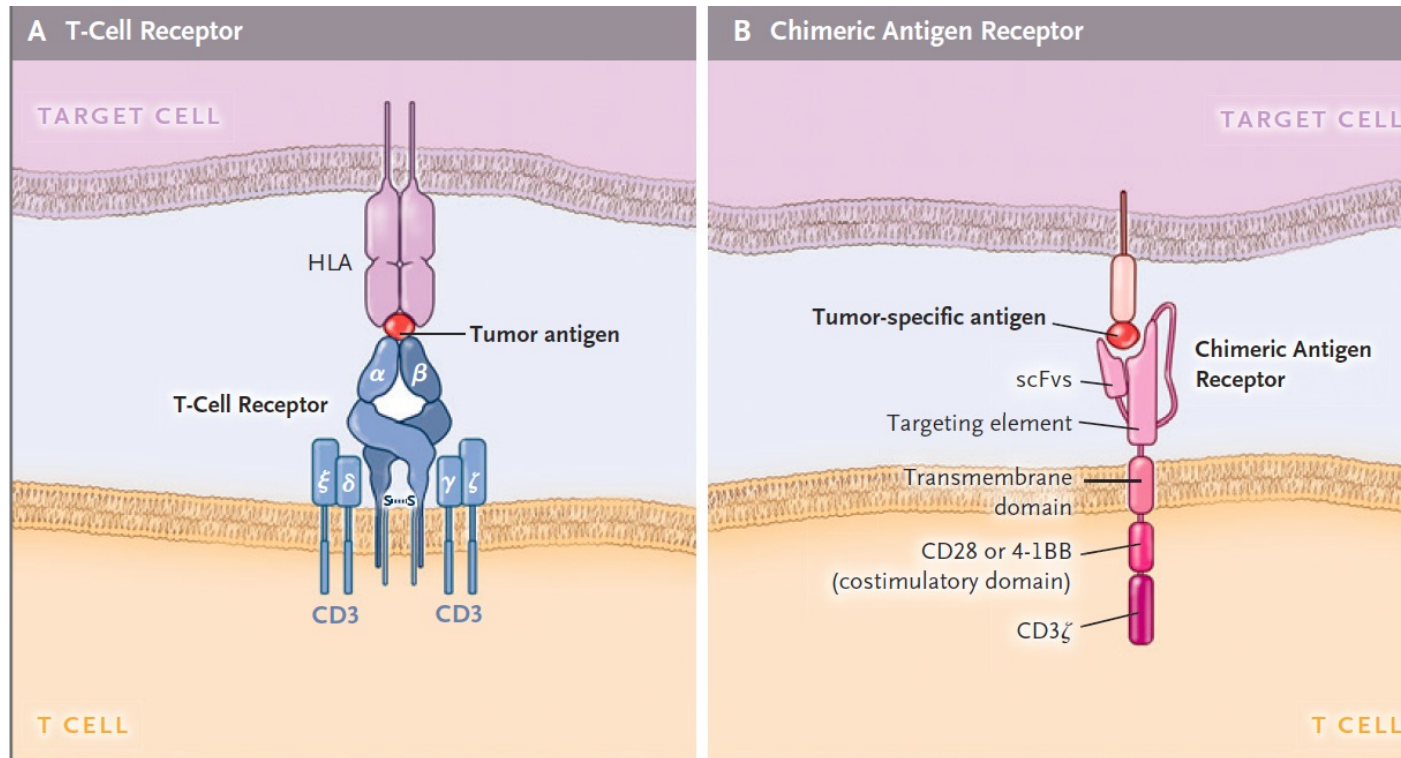
I segnali biochimici che vengono innescati dopo il riconoscimento di un antigene, non sono trasmessi dal recettore stesso, ma da proteine invarianti chiamate CD3 e proteine zeta, che sono legate non covalentemente al recettore per l'antigene a formare il COMPLESSO TCR.

REVIEW ARTICLE

FRONTIERS IN MEDICINE

Chimeric Antigen Receptor Therapy

Carl H. June, M.D., and Michel Sadelain, M.D., Ph.D.

**Figure 2. Structure of CARs and T-Cell Receptors.**

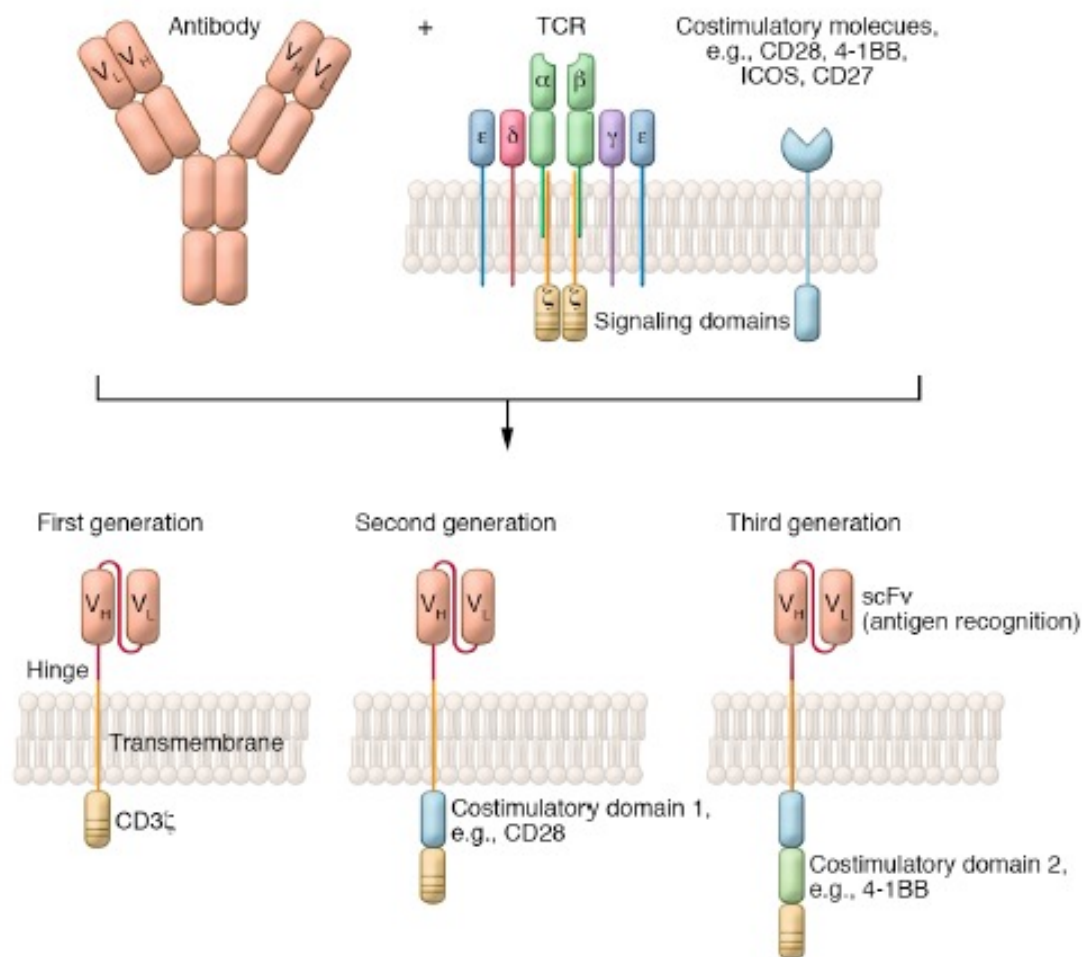
Panel A shows the structure of a T-cell receptor, which consists of heterodimeric and antigen-specific α and β chains that closely associate with the invariant ϵ , δ , γ , and ζ chains of the CD3 complex. The T-cell receptor binds to the HLA allele that has a bound peptide derived from a tumor antigen on the target cell. Panel B shows the CAR, which includes the single-chain variable fragment (scFv) that binds to tumor antigens, fused to a spacer and transmembrane domain. The intracellular domain contains costimulatory domains, such as CD28 and 4-1BB and the CD3 ζ chain, which drive signal activation and amplification of CAR T cells. S–S denotes disulfide bond.

Insight into next-generation CAR therapeutics: designing CAR T cells to improve clinical outcomes

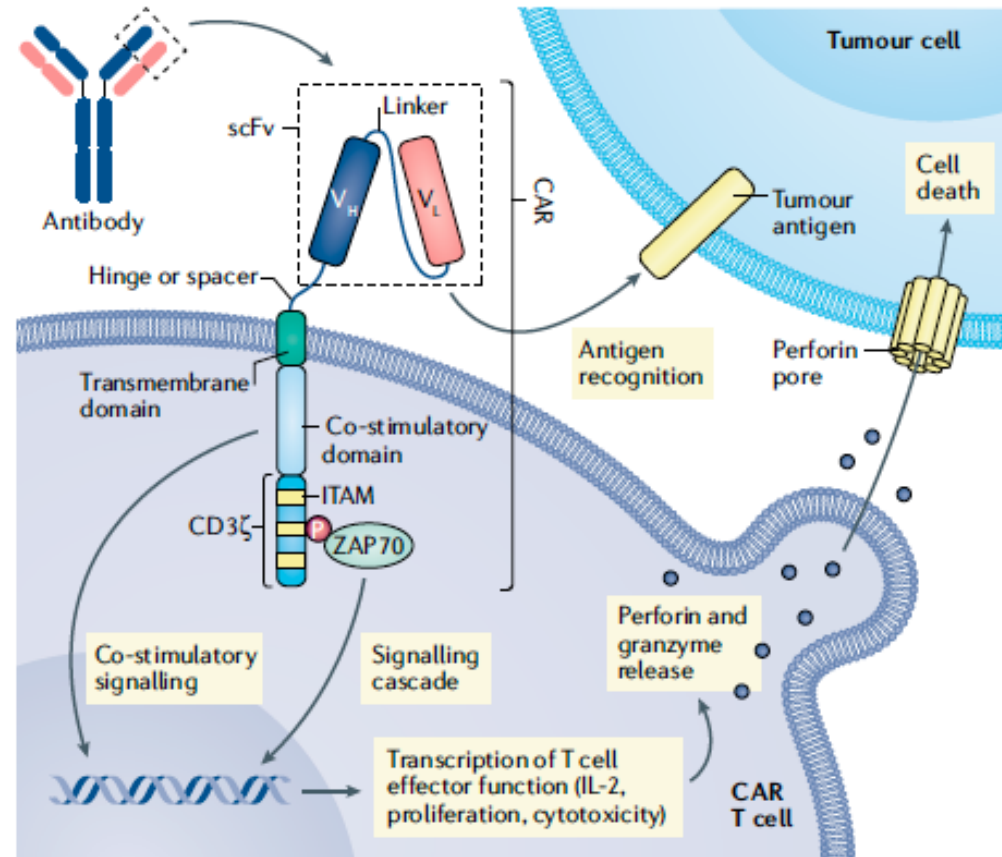
Emiliano Roselli,¹ Rawan Faramand,² and Marco L. Davila^{1,2,3,4}

Figure 1. Structure and evolution of CARs.

CARs are composed of an antigen-recognition domain (mainly scFv of monoclonal antibodies) fused to a hinge/transmembrane domain and intracellular signaling domains able to transduce activation signals to CAR T cells. Modification in the intracellular domains gave rise to a different generation of CAR T cells from the first generation, which included a CD3 ζ motif, to the second and third generations, which included one or two costimulatory domains, respectively. V_H, variable such as CD28, CD137 (4-1BB) and CD134 (OX-40). These additional signaling domains promote both the persistence and antitumor activity of CAR T cells following adoptive transfer, and were essential to avoid the anergy observed with first-generation CAR



The chimeric antigen receptor (CAR)



The extracellular portion of the chimeric antigen receptor (CAR) molecule is generated from a monoclonal antibody against the target.

The variable heavy (V_H) and variable light (V_L) chains, also known as the single-chain variable fragment (scFv), from the antibody sequence are connected by a linker to form the antigen-specific region of the CAR molecule.

The hinge or spacer region anchors the scFv to the transmembrane region that traverses the cell membrane.

Intracellularly, the co-stimulatory domain and CD3ζ chain signal once the scFv portion of the CAR recognizes and binds tumour antigen.

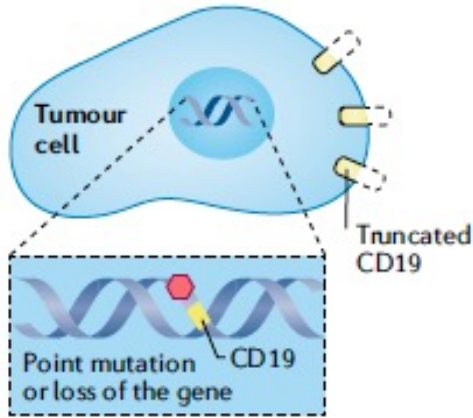
Co-stimulatory signals are dependent on the co-stimulation domain used: CD28 is dependent on PI3K, whereas 4-1BB requires tumour necrosis factor (TNF) receptor-associated factors (TRAFs) and nuclear factor-κB (NF-κB).

Downstream signalling leads to T cell effector functions including release of perforin and granzyme, leading to cell death of the target tumour cell.

Resistance to CAR-T Cell Therapy

Antigen-dependent resistance

Genetic loss of antigen

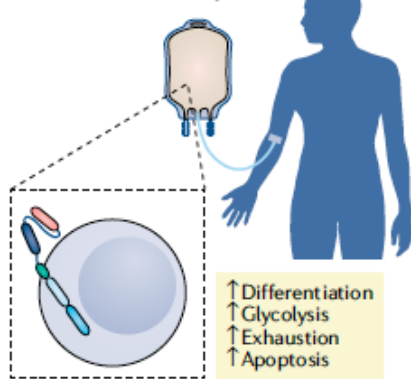


Resistance to chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy can be categorized according to the context of antigen loss or retention.

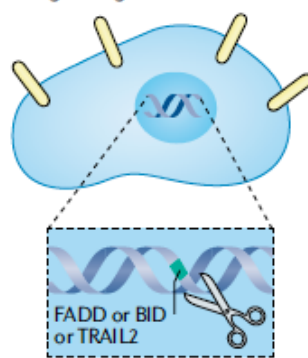
Antigen loss is most commonly due to mutations in the gene encoding the antigen itself.

Antigen-independent resistance

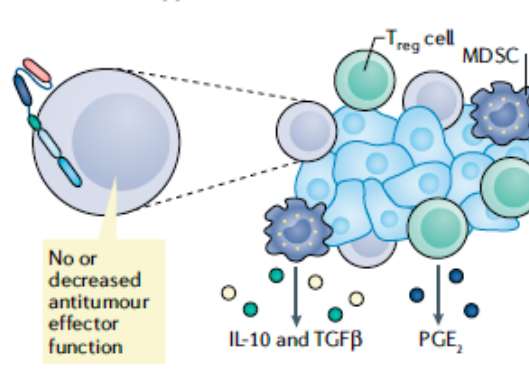
Effector-like infusion product



Loss of death receptor signalling on tumour cells

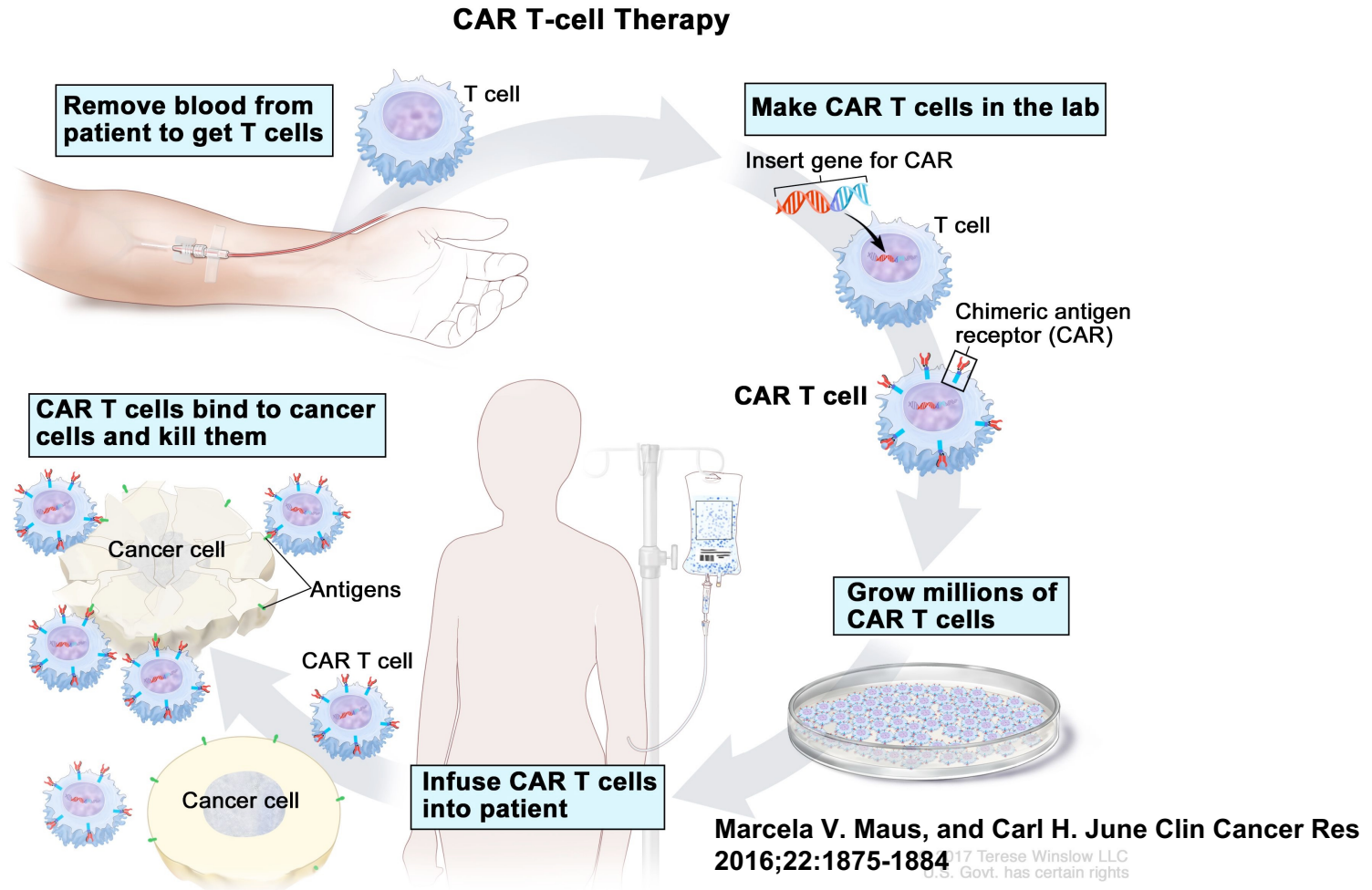


Immunosuppressive tumour microenvironment



Antigen-independent resistance is due to exhausted T cells. This can result from a suboptimal infusion product with a terminal effector phenotype, loss of death receptor signalling on tumour cells making them resistant to CAR T cell killing, or an immunosuppressive tumour microenvironment due to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg cells) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and their respective soluble factors.

Overview of CAR T-cell therapy in the clinic.



Cellule modificate.

Le Car-T si ottengono in laboratorio a partire da linfociti T del paziente, estratti con un prelievo e modificati geneticamente. La modifica, attuata tramite un vettore virale, inserisce in questi linfociti il gene del recettore [Car \(Chimeric Antigen Receptor\)](#), una proteina in grado di riconoscere specifiche strutture presenti sulla superficie del tumore. Le cellule modificate, ottenute in questo modo, vengono quindi fatte moltiplicare in vitro e reinfuse nel paziente, pronte ad attaccare e a eliminare il tumore



Come funzionano

Il meccanismo d'azione delle CAR-T si basa su un concetto semplice e rivoluzionario al tempo stesso: combattere i tumori come se fossero un agente estraneo al corpo, una sorta di infezione, "armando" il sistema immunitario del paziente in modo da risvegliare la risposta immunitaria e attivarla per riconoscere le cellule maligne e ucciderle.

I linfociti T e la sorveglianza immunologica

I **linfociti T** sono un particolare tipo di globuli bianchi responsabili della difesa del nostro organismo dalle malattie, e sono in grado di riconoscere e sopprimere le cellule tumorali svolgendo un'azione di "sorveglianza immunologica". Tuttavia, nei pazienti onco-ematologici i linfociti T non sono in grado di garantire una difesa immunitaria ottimale.

L'"evasione" delle cellule tumorali

Parallelamente, le cellule tumorali sviluppano strategie che permettono loro di non essere riconosciute dal sistema di sorveglianza. In generale, lo fanno camuffandosi, apparendo cioè come cellule "sane", nascondendo i recettori di superficie tipici del tumore. Ma sono anche in grado di esprimere in superficie tanti recettori che impediscono l'azione dei linfociti T, o ancora creando un contesto di aumentata infiammazione che favorisce lo sviluppo del tumore e confonde la risposta immunitaria.

L'attivazione del recettore CAR

Le CAR-T possono contrastare questa evasione, permettendo al sistema immunitario di individuare il tumore. I linfociti T prelevati dal paziente vengono manipolati in laboratorio in modo da esprimere uno specifico recettore (CAR) per l'antigene di membrana (per esempio, CD19) espresso sulla superficie della cellula maligna. In questo modo, il linfocita T è in grado di riconoscere e aggredire le cellule tumorali esprimenti questo antigene, provocandone la morte.

Contro quali tipi di tumore sono dirette?

Le terapie cellulari che utilizzano linfociti ingegnerizzati sono state inizialmente sviluppate per la cura dei tumori ematologici, dando risultati nel trattamento di **leucemie e linfomi di tipo B**, mentre **proseguono le sperimentazioni per altri tumori del sangue** come la leucemia linfatica cronica e il mieloma multiplo. Molte ricerche sono ancora in corso per studiarne l'efficacia anche nei tumori solidi come per esempio quelli dell'ovaio, del seno, del polmone, del pancreas, il neuroblastoma e il glioblastoma.

Quali sono le terapie cellulari approvate in Italia?

La prima terapia cellulare approvata in Italia dall'AIFA nell'agosto 2019 è quella con CAR-T denominata tisagenlecleucel, indicata per pazienti fino a 25 anni di età con leucemia linfoblastica acuta (LLA) a cellule B e per pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), resistenti alle altre terapie o nei quali la malattia sia ricomparsa dopo una risposta ai trattamenti standard. Può essere prescritta e utilizzata presso i Centri specialistici selezionati dalle Regioni.

Le sperimentazioni in corso

In Italia, grazie anche al sostegno di AIRC, l'uso di terapie CAR-T nella leucemia linfoblastica del bambino ha già dato risultati in fase sperimentale all'Ospedale Bambino Gesù di Roma, con il gruppo guidato da Franco Locatelli, e all'Ospedale San Gerardo di Monza, con a capo della ricerca Andrea Biondi, dove nel 2016, nell'ambito dello studio per la registrazione del tisagenlecleucel, è stata trattata in via sperimentale la prima bambina italiana.

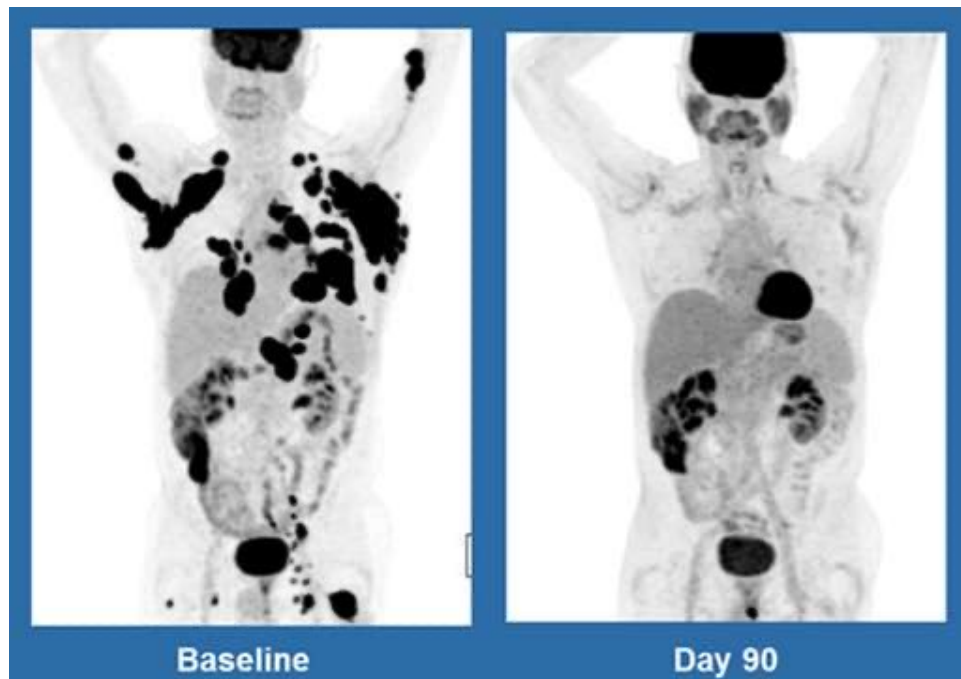
Lo stesso Locatelli ha condotto uno studio, sostenuto da AIRC, Ministero della salute e Regione Lazio, in cui l'editing genetico prevede anche l'inserimento della **Caspasi 9** (in sigla iC9), una sorta di gene "suicida" in grado di bloccare i **linfociti T modificati**, attivabile qualora si presentassero degli effetti collaterali a causa dei trattamenti con CAR-T. Il primo paziente trattato all'inizio del 2018 è stato un bambino di 4 anni affetto da leucemia linfoblastica acuta di tipo B cellulare che aveva già avuto due ricadute della malattia; nel giro di poco tempo dall'infusione la malattia del bambino è andata in remissione, ovvero non c'erano più tracce di cellule leucemiche nel suo midollo osseo. Il team di Locatelli sta lavorando per utilizzare questa tecnica anche contro il neuroblastoma, il tumore solido più frequente in età pediatrica; altre possibili applicazioni potrebbero essere le terapie contro il mieloma multiplo e il linfoma non Hodgkin a cellule B.

Il progetto INCAR (*Innovative CAR Therapy Platform*), guidato da Andrea Biondi dell'Università degli Studi di Milano Bicocca e Ospedale San Gerardo di Monza, si pone invece l'obiettivo di rendere i trattamenti con CAR-T più accessibili ed economici, elaborando metodi di produzione che permettano di sviluppare ulteriormente questa terapia per poterla applicare anche ad altri tipi di tumori. INCAR è sostenuto da Accelerator Award, il programma internazionale nato nel 2018 da tre organizzazioni non profit: la britannica Cancer Research UK (CRUK), la spagnola Fundación Científica - Asociación Española Contra el Cáncer (FC AECC) e l'italiana Fondazione AIRC.

Amily Whitehead ha scritto la storia della medicina.

*Nel 2012 aveva sette anni, da due lottava contro una **leucemia linfoblastica acuta** contro cui nulla sembrava funzionare. Arrivò al Children's Hospital di Philadelphia il giorno dopo l'approvazione all'uso delle cellule Car-T in uno studio clinico umano: è stata la prima paziente a riceverle e il 10 maggio 2022 ha festeggiato dieci anni liberi dal cancro.*

- ✓ Le terapie con Car-T hanno registrato il 30-40% di remissioni complete nei casi più complessi.
- ✓ Sono terapie iperpersonalizzate, perché il principio attivo si costruisce di volta in volta con le cellule del malato.
- ✓ Dal punto di vista dell'approvazione, sono gestite come i farmaci: nel 2019 la prima Car-T ha ricevuto il via libera in Italia e oggi le terapie rimborsate dal Servizio sanitario nazionale sono tre, per specifiche tipologie di leucemia linfoblastica acuta e linfoma e per pazienti in cui i trattamenti standard, come chemioterapia o trapianto, abbiano fallito.
- ✓ I centri autorizzati a somministrarle sono una trentina e devono garantire precisi requisiti
- ✓ La terapia con Car-T non è una strada per tutti: i linfociti T del paziente, per esempio, potrebbero essere poco efficienti o in numero non adeguato.
- ✓ Inoltre fra la raccolta delle cellule T e la loro reinfusione passano tre, quattro settimane: per alcuni la progressione della malattia può essere così rapida da non consentire una simile attesa.



These scans show a 62-year-old man with **non-Hodgkin lymphoma**, at left in **December 2015**, and **three months after treatment with Kite Pharma's experimental gene therapy at MD Anderson Cancer Center in Houston**. The treatment, called CAR-T cell therapy, turns a patient's own blood cells into specialized cancer killers. It worked in a study, with more than one third of very sick lymphoma patients showing no sign of disease six months after a single treatment, its maker said Tuesday, Feb. 28, 2017. The scans are from a presentation by Drs. Fred Locke and Sattva Neelapu, provided by the American Society for Blood and Marrow Transplantation and Kite. (ASBMT/Kite Pharma via AP)

<https://medicalxpress.com/news/2017-02-gene-therapy-blood-cancer-major.html#jCp>

Le CAR-T autorizzate.

Le terapie CAR-T rappresentano la prima forma di terapia genica approvata per il trattamento della **leucemia linfoblastica B** e di alcune forme aggressive di **linfoma non-Hodgkin**. Finora l'EMA (European Medicines Agency) ha autorizzato due terapie con le cellule CAR-T (axicabtagene ciloleucel e tisagenlecleucel) che in entrambi i casi riconoscono l'[antigene](#) CD19, presente in diversi tumori del sangue.

- **Kymriah** (tisagenlecleucel), autorizzato il 22 agosto 2018
- **Yescarta** (axicabtagene ciloleucel), autorizzato il 23 agosto 2018,

indicate per il trattamento di:

- pazienti pediatrici e giovani adulti fino a 25 anni di età affetti da **leucemia linfoblastica acuta** a cellule B che non abbiano mai risposto alla chemioterapia, o che siano in recidiva dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche o dopo almeno 2 linee di chemioterapia (Kymriah);
- pazienti con **linfoma diffuso a grandi cellule B** o DLBCL (Kymriah e Yescarta) /linfoma primitivo del mediastino a cellule B o PMBCL (Yescarta) già sottoposti ad almeno 2 linee di terapia sistemica.

CAR-T: efficacia e sicurezza del trattamento

Rispetto alle terapie “convenzionali”, le CAR-T permettono di ottenere remissioni complete anche in fasi di malattia molto avanzate. Inoltre, a un anno dall’infusione di CAR-T, la maggior parte dei pazienti che ha ottenuto una remissione è ancora viva e libera da malattia.

Table 1. Responses to CAR T-Cell Therapy.*

Disease	Response Rate <i>percent</i>	Comments	Reference
Leukemia			
B-cell acute lymphoblastic leukemia (in adults)	83–93	High initial remission rates; unresolved issue is whether CAR T-cell therapy is definitive therapy or should be followed by allogeneic hematopoietic stem-cell therapy	Park et al., ³⁵ Davila et al., ³⁶ Turtle et al. ³⁷
B-cell acute lymphoblastic leukemia (in children)	68–90	Approximately 25% of patients reported to have a relapse with CD19-negative or CD19-low leukemia; CD22 CAR T cells may improve survival among some patients with CD19 relapses	Maude et al., ³⁴ Maude et al., ³⁸ Fry et al., ³⁹ Lee et al. ⁴⁰
Chronic lymphocytic leukemia	57–71	Relapse is rare in patients who have a complete response; ibrutinib appears to increase response rates	Porter et al., ⁴¹ Turtle et al. ⁴²
Lymphoma			
Diffuse large B-cell lymphoma	64–86	Approximately 40–50% of patients reported to have a durable complete response	Turtle et al., ⁴³ Kochenderfer et al., ⁴⁴ Schuster et al., ⁴⁵ Neelapu et al. ⁴⁶
Follicular lymphoma	71	At a median follow-up of 28.6 mo, the response was maintained in 89% of patients who had a response	Schuster et al. ⁴⁵
Transformed follicular lymphoma	70–83	A total of 3 of 3 patients with transformed follicular lymphoma had a complete response	Turtle et al., ⁴³ Schuster et al., ⁴⁵ Neelapu et al. ⁴⁶
Refractory multiple myeloma	25–100	B-cell maturation antigen CAR T cells; stringent complete response in approximately 25% of patients	Ali et al., ⁴⁷ Fan et al., ⁴⁸ Berdeja et al. ⁴⁹
Solid tumors			
Glioblastoma	ND	In case report from phase 2 study, complete response on magnetic resonance imaging after intravenous and cerebrospinal fluid administration of CAR T cells; response lasted 7.5 mo	Brown et al. ⁵⁰
Pancreatic ductal adenocarcinoma	17	In one patient with liver metastasis, CAR T-cell treatment produced a complete metabolic response in the liver but was ineffective against the primary pancreatic tumor	Beatty et al. ⁵¹

What is the difference between Yescarta and Kymriah?

- Kymriah™ is for the treatment of pediatric patients and young adults with refractory or relapse (R/R) B cell precursor acute lymphoblastic leukemia
- Yescarta™ is for the treatment of adult patients with R/R large B cell lymphoma.

In common, both are CD19-specific CAR T cell therapies lysing CD19-positive targets.

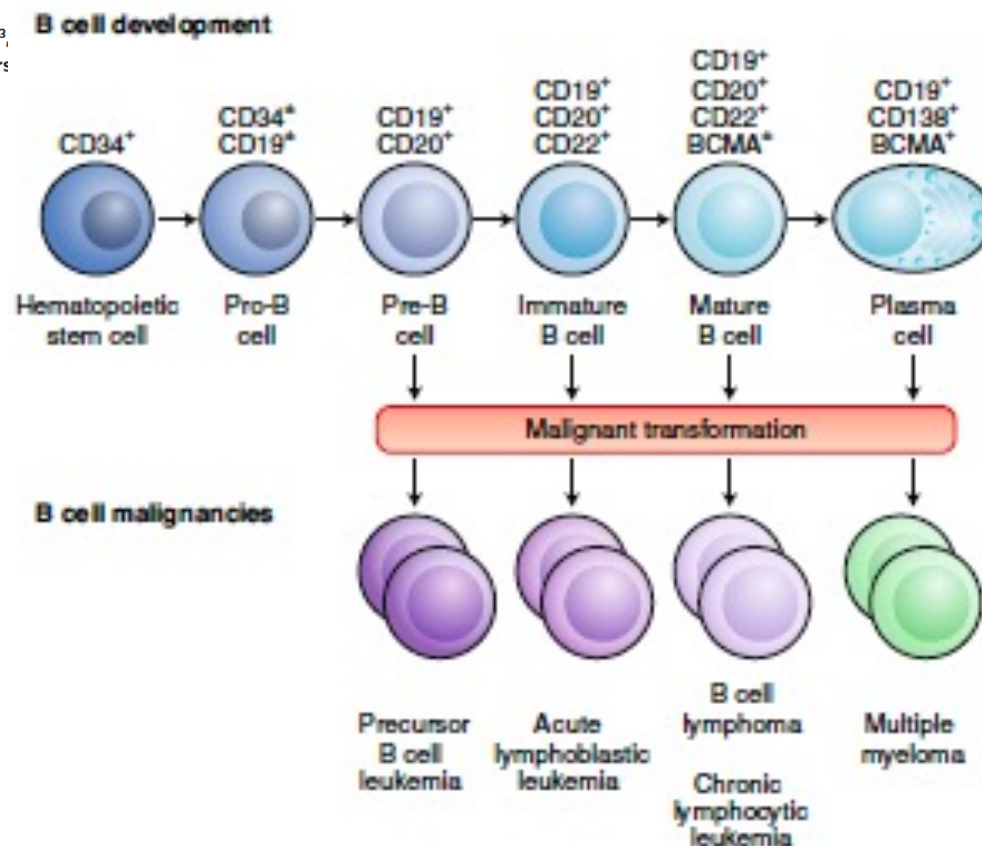
CAR-T: efficacia e sicurezza del trattamento

Rispetto alle terapie “convenzionali”, le CAR-T permettono di ottenere remissioni complete anche in fasi di malattia molto avanzate. Inoltre, a un anno dall’infusione di CAR-T, la maggior parte dei pazienti che ha ottenuto una remissione è ancora viva e libera da malattia.



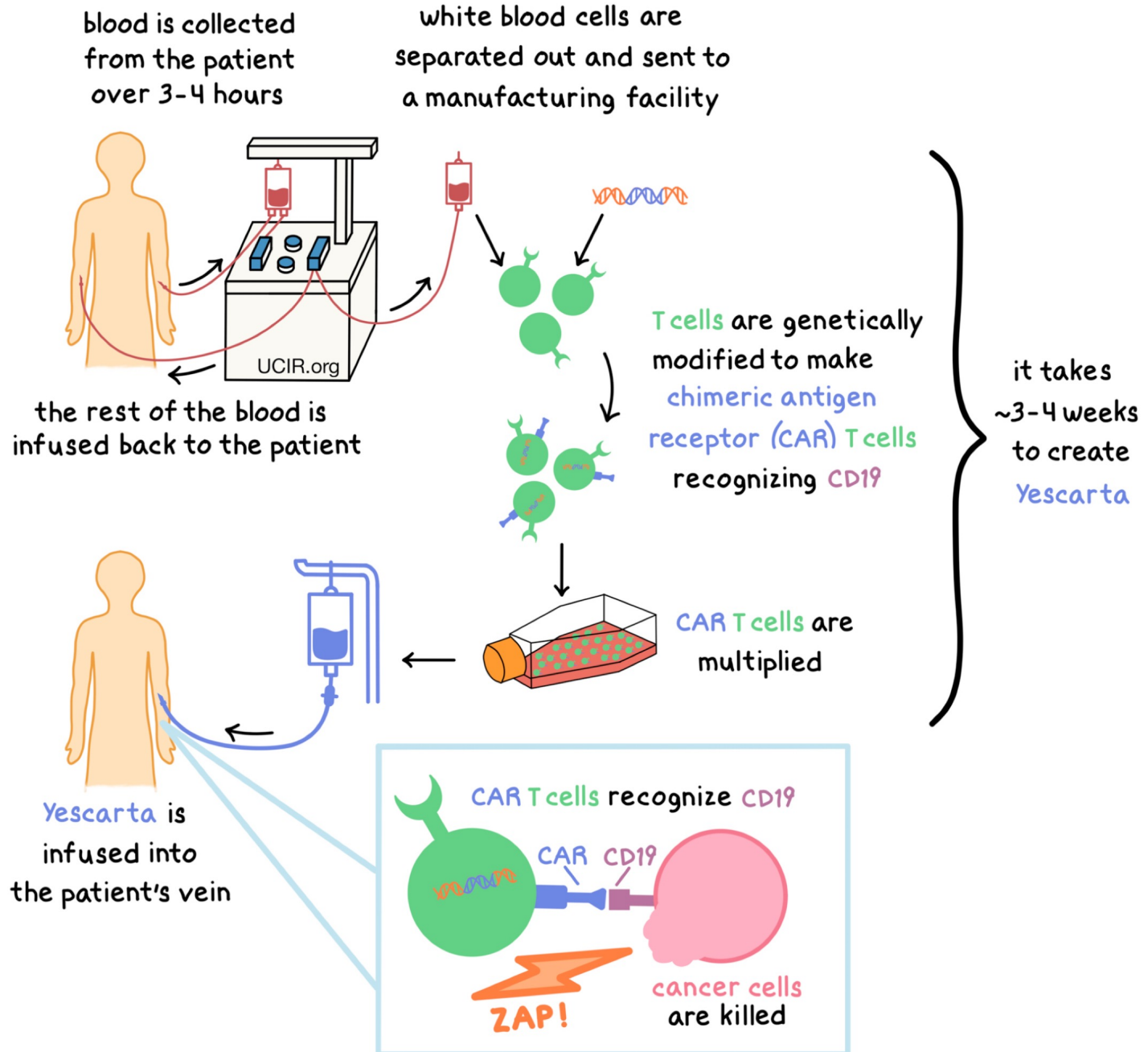
Engineering-enhanced CAR T cells for improved cancer therapy

Michael C. Milone^{1,2}, Jie Xu^{1,2,3}, Sai-Juan Chen³,
Daniel J. Powell Jr^{1,2} and J. Joseph Melenhorst



Normal and malignant B cells uniformly and exclusively express CD19, which modulates B cell receptor signaling and mediates immunoglobulin-induced B cell activation. Given CD19's broad expression within the B cell lineage from early pro-B cells to subsets of plasma cells, as well as its generally uniform expression on B cell malignancies, this molecule became a prime target of CAR T cell approaches.

How is Yescarta made?



In another clinical trial, 101 patients with advanced, previously treated large B-cell non-Hodgkin lymphoma, were treated with Yescarta. At a [median follow-up](#) of 15 months:



Follicular Lymphoma:

In a clinical trial, 120 adult patients with advanced, previously treated follicular lymphoma, were treated with Yescarta. At a minimum follow-up of 9 months for the first 81 patients:



• • •

What are the side effects?

Yescarta can lead to side effects, some of which could be long-lasting. The CAR T cells in Yescarta kill cancer cells that have the molecule CD19 on their surface; however, CD19 is also found on the surface of healthy B cells, which can also be killed by Yescarta. The decrease in healthy B cells

What are the observed clinical results?

It is important to keep in mind that each patient's actual outcome is individual and may be different from the results found in the clinical studies. In addition, with immunotherapy, sometimes it takes several months for responses to be observed.

Large B-cell non-Hodgkin lymphoma:

In a clinical trial, 359 patients with large B-cell lymphoma whose cancer either did not respond to treatment with chemoimmunotherapy (anthracycline and rituximab), or came back within 12 months after treatment, were treated with either Yescarta or standard second-line therapy (chemoimmunotherapy and stem cell transplant). At a [median follow-up](#) of 25 months:

Yescarta

41% of patients experienced some benefit. The remaining patients experienced no change, worsening or return of the disease, or death from any cause

The disease did not get worse for a median of 15 months

83% of patients had a response (including 65% of patients whose cancer went away completely)

Standard therapy

16% of patients experienced some benefit. The remaining patients experienced no change, worsening or return of the disease, or death from any cause

The disease did not get worse for a median of 5 months

50% of patients had a response (including 32% of patients whose cancer went away completely)

Results after treatment with Yescarta vs standard therapy

Costi eccessivi.

Per un trattamento con Car-T si possono spendere anche 300.000 euro (se la terapia ha successo e la malattia è eradicata, si risparmia l'uso di altri farmaci che, per i tumori per cui sono approvate le Car-T, sono anch'essi molto costosi)

Produrre le Car-T "in casa"

oggi i linfociti T vanno congelati e spediti altrove, spesso negli Stati Uniti, per essere modificati in laboratori certificati.

Si stanno studiando vie alternative che prevedano l'uso di linfociti T freschi, trattati sul posto.

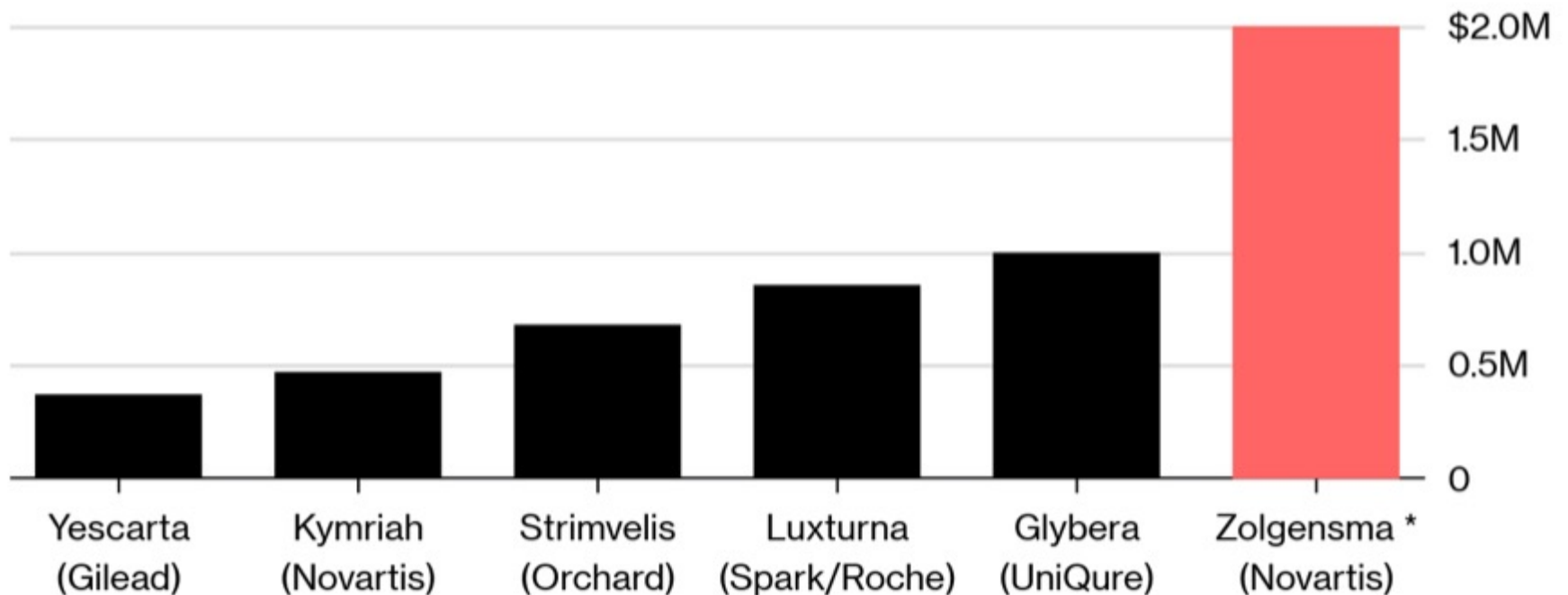
Al Bambino Gesù lo si sta facendo presso l'Officina farmaceutica dell'ospedale e nella sperimentazione clinica di fase I/II in corso sono stati già coinvolti undici bimbi. «Evitare il congelamento dei linfociti è un fattore positivo, inoltre la procedura è più rapida e per alcuni pazienti il tempo può essere un fattore decisivo.

Le strutture sanitarie abilitate alla somministrazione delle terapie avanzate sono 111, distribuite in tutte le regioni, ma quelle attive sono il 60% (65). Per quanto riguarda **i tempi medi di accesso**, a livello nazionale si parla di circa 300 giorni, con un divario tra le regioni del Centro-Nord (281) e quelle del Sud (333).

Pricing a Cure

The question for health systems: how much are one-time therapies worth?

■ Price in U.S. dollars



Zolgensma price is UBS assumption and hasn't been decided

Source: Bloomberg

Bloomberg

Obiettivo tumori solidi

L'obiettivo dei ricercatori è puntare le Car-T non solo contro i tumori del sangue – come leucemie, linfomi e mieloma – ma anche contro i tumori solidi. Dal cancro alla prostata al carcinoma mammario, gli studi fervono ma sono ancora in fase iniziale perché, come spiega Franco Locatelli, «oltre a dover identificare il bersaglio giusto per ogni tipo di cancro, far arrivare i linfociti T in una massa solida è complicato. In più, il micro-ambiente attorno al tumore produce sostanze che depotenziano la risposta immune». Nonostante queste difficoltà qualche risultato è incoraggiante: al Bambino Gesù di Roma, per esempio, è in corso uno studio su bimbi con neuroblastoma, un tumore che nella metà dei casi è già metastatico alla diagnosi, o ha lesioni molecolari indicative di un decorso negativo. «Abbiamo realizzato Car-T dirette contro GD2, una proteina presente sulla superficie delle cellule di neuroblastoma, e abbiamo ottenuto una remissione a lungo termine nel 30-35% dei bimbi che avevano fallito tre, perfino cinque linee di terapia. In quelli con una patologia più limitata la probabilità di essere liberi da malattia a due anni dalla cura sale al 60%», conclude Locatelli.

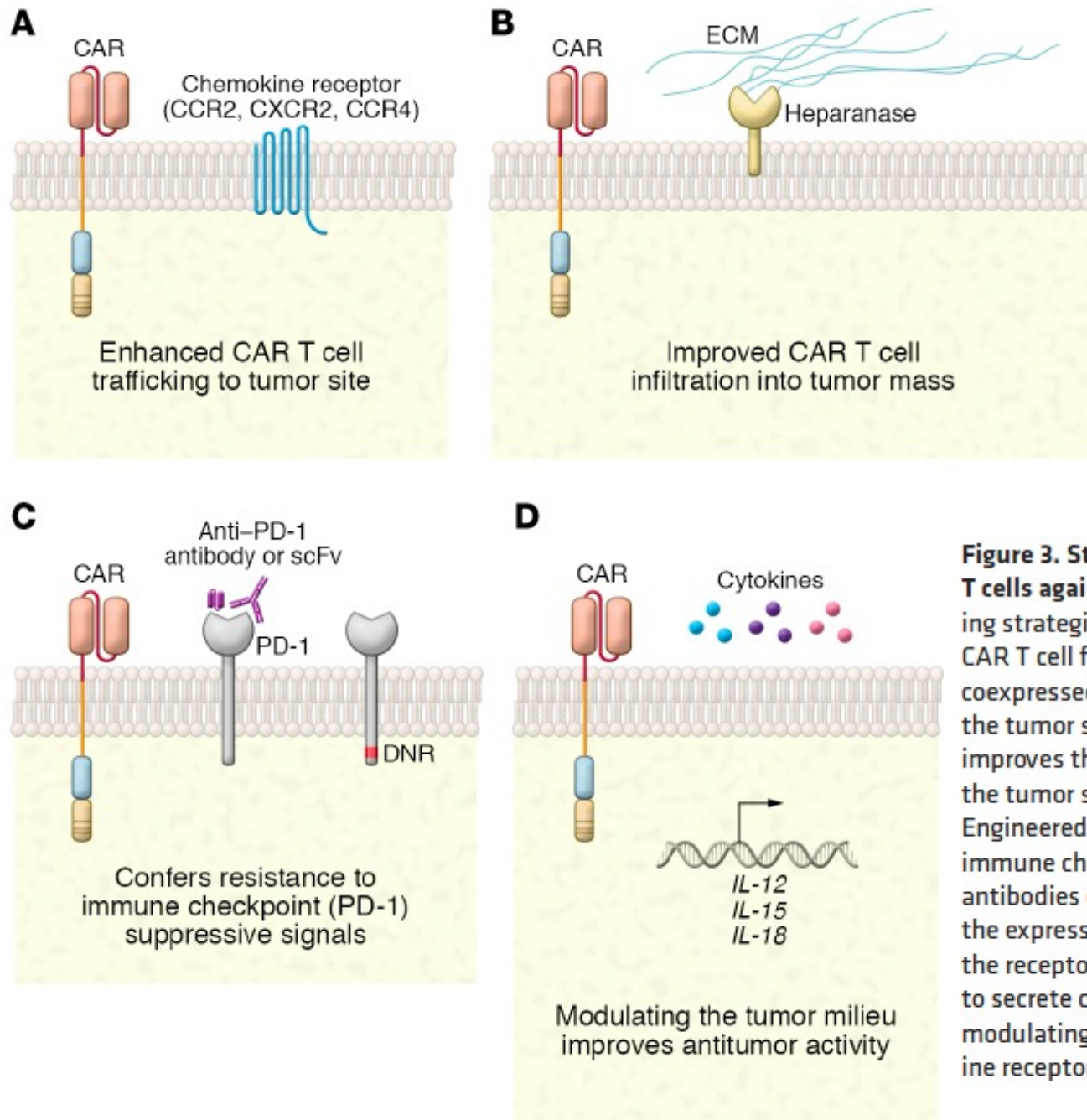


Figure 3. Strategies to enhance efficacy of CAR T cells against solid tumors. Several engineering strategies have been developed to improve CAR T cell function (A). Chemokine receptors coexpressed on CAR T cells enhance traffic to the tumor site (B). Expression of heparanase improves the ability of CAR T cells to penetrate the tumor stroma by degrading the ECM (C). Engineered CAR T cells can overcome inhibitory immune checkpoints by secreting anti-PD-1 antibodies or scFvs; another strategy includes the expression of dominant-negative forms of the receptors (DN-PD-1) (D). CAR T cells modified to secrete cytokines have improved function by modulating the tumor milieu. CCR4, CC-chemokine receptor 4; DNR, dominant-negative receptor.

Salute Le cellule CAR T sono efficaci contro i neuroblastomi, tumori solidi che colpiscono i bambini

Per la prima volta una terapia genica con cellule CAR T si è dimostrata in grado di trattare con successo i neuroblastomi, tumori solidi che possono manifestarsi in età pediatrica.



Neuroblastoma: che cos'è?

Il neuroblastoma è un tumore del sistema nervoso simpatico che ha origine dai neuroblasti, e può insorgere in diversi distretti corporei tra cui il più frequente è il surrene.

Si tratta del più comune tumore solido extra cranico nei bambini, responsabile dell'11% del totale delle morti per cancro in età pediatrica, e colpisce soprattutto i bambini di età inferiore ai 5 anni.

Quasi la metà dei pazienti presenta una malattia ad alto rischio già al momento della diagnosi e la sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi è del 40-50%.

I risultati.

- Lo studio ha valutato sia sicurezza e tollerabilità delle CAR T in vari dosaggi (fase 1), sia l'efficacia nella cura dei tumori e la permanenza delle cellule nell'organismo (fase 2).
- La terapia si è dimostrata sicura ed efficace.
- Il 63% dei pazienti (17 bambini e ragazzi) ha mostrato una risposta alla terapia e tra questi 9 sono andati in remissione completa.
- Cresce inoltre la probabilità di sopravvivenza fino a 3 anni (60% dei casi) e di sopravvivere senza evidenza di malattia (36%).
- Le CAR T persistono nell'organismo sino a 2-3 anni dall'infusione sostenendo l'efficacia della terapia.

A breve inizierà una sperimentazione in cui lo stesso tipo di cellule CAR T dirette contro la molecola target GD2 verrà utilizzato in pazienti pediatrici e giovani adulti affetti da vari tipi di tumore cerebrale.

GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma

F. Del Bufalo, B. De Angelis, I. Caruana, G. Del Baldo, M.A. De Ioris, A. Serra, A. Mastronuzzi, M.G. Cefalo, D. Pagliara, M. Amicucci, G. Li Pira, G. Leone, V. Bertaina, M. Sinibaldi, S. Di Cecca, M. Guercio, Z. Abbaszadeh, L. Iaffaldano, M. Gunetti, S. Iacovelli, R. Bugianesi, S. Macchia, M. Algeri, P. Merli, F. Galaverna, R. Abbas, M.C. Garganese, M.F. Villani, G.S. Colafati, F. Bonetti, M. Rabusin, K. Perruccio, V. Folsi, C. Quintarelli, and F. Locatelli, for the Precision Medicine Team—IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù*

ABSTRACT

BACKGROUND

Immunotherapy with chimeric antigen receptor (CAR)—expressing T cells that target the disialoganglioside GD2 expressed on tumor cells may be a therapeutic option for patients with high-risk neuroblastoma.

METHODS

In an academic, phase 1–2 clinical trial, we enrolled patients (1 to 25 years of age) with relapsed or refractory, high-risk neuroblastoma in order to test autologous, third-generation GD2-CAR T cells expressing the inducible caspase 9 suicide gene (GD2-CART01).

RESULTS

A total of 27 children with heavily pretreated neuroblastoma (12 with refractory disease, 14 with relapsed disease, and 1 with a complete response at the end of first-line therapy) were enrolled and received GD2-CART01. No failure to generate GD2-CART01 was observed. Three dose levels were tested (3-, 6-, and 10×10⁶ CAR-positive T cells per kilogram of body weight) in the phase 1 portion of the trial, and no dose-limiting toxic effects were recorded; the recommended dose for the phase 2 portion of the trial was 10×10⁶ CAR-positive T cells per kilogram. Cytokine release syndrome occurred in 20 of 27 patients (74%) and was mild in 19 of 20 (95%). In 1 patient, the suicide gene was activated, with rapid elimination of GD2-CART01. GD2-targeted CAR T cells expanded in vivo and were detectable in peripheral blood in 26 of 27 patients up to 30 months after infusion (median persistence, 3 months; range, 1 to 30). Seventeen children had a response to the treatment (overall response, 63%); 9 patients had a complete response, and 8 had a partial response. Among the patients who received the recommended dose, the 3-year overall survival and event-free survival were 60% and 36%, respectively.

CONCLUSIONS

The use of GD2-CART01 was feasible and safe in treating high-risk neuroblastoma. Treatment-related toxic effects developed, and the activation of the suicide gene controlled side effects. GD2-CART01 may have a sustained antitumor effect. (Funded by the Italian Medicines Agency and others; ClinicalTrials.gov number, NCT03373097.)

Quelle usate nello studio sono CAR T di terza generazione: le cellule ingegnerizzate contenevano una sorta di "interruttore di sicurezza", un gene suicida che blocca l'azione dei linfociti T in caso di effetti avversi gravi dell'immunoterapia. Siccome un comune è possibile effetto collaterale delle terapie a base di CAR-T è la sindrome da rilascio di citochine (febbre, ipotensione, ipossia) questo escamotage permette di eliminare rapidamente le CAR T infuse nel giro di qualche ora.

The authors' full names, academic degrees, and affiliations are listed in the Appendix. Dr. Locatelli can be contacted at franco.locatelli@opbg.net or at the Department of Pediatric Hematology and Oncology and of Cell and Gene Therapy, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Piazza Sant'Onofrio, 4, 00165 Rome, Italy.

*The members of the Precision Medicine Team are listed in the Supplementary Appendix, available at NEJM.org.

Drs. Quintarelli and Locatelli contributed equally to this article.

N Engl J Med 2023;388:1284–95.

DOI: 10.1056/NEJMoa2210859

Copyright © 2023 Massachusetts Medical Society.

Neuroblastoma: che cos'è?

Il neuroblastoma è un tumore del sistema nervoso simpatico che ha origine dai neuroblasti, e può insorgere in diversi distretti corporei tra cui il più frequente è il surrene.

Si tratta del più comune tumore solido extra cranico nei bambini, responsabile dell'11% del totale delle morti per cancro in età pediatrica, e colpisce soprattutto i bambini di età inferiore ai 5 anni.

Quasi la metà dei pazienti presenta una malattia ad alto rischio già al momento della diagnosi e la sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi è del 40-50%.

I risultati.

- Lo studio ha valutato sia sicurezza e tollerabilità delle CAR T in vari dosaggi (fase 1), sia l'efficacia nella cura dei tumori e la permanenza delle cellule nell'organismo (fase 2).
- La terapia si è dimostrata sicura ed efficace.
- Il 63% dei pazienti (17 bambini e ragazzi) ha mostrato una risposta alla terapia e tra questi 9 sono andati in remissione completa.
- Cresce inoltre la probabilità di sopravvivenza fino a 3 anni (60% dei casi) e di sopravvivere senza evidenza di malattia (36%).
- Le CAR T persistono nell'organismo sino a 2-3 anni dall'infusione sostenendo l'efficacia della terapia.

A breve inizierà una sperimentazione in cui lo stesso tipo di cellule CAR T dirette contro la molecola target GD2 verrà utilizzato in pazienti pediatrici e giovani adulti affetti da vari tipi di tumore cerebrale.

CAR-T, il percorso del paziente

La terapia con cellule CAR-T è un esempio avanzato di medicina personalizzata. Come accedere a queste terapie



Qual è il percorso di un paziente per arrivare a ricevere un trattamento con cellule CAR-T?

In generale, i pazienti che hanno i requisiti di idoneità per il trattamento vengono indirizzati da uno specialista a un centro di trattamento CAR-T certificato. Il team degli esperti del centro valuta quindi la candidabilità del paziente alla terapia CAR-T. Nel caso specifico del mieloma multiplo, la recente indicazione dell'agenzia regolatoria europea EMA (European Medicinal Agency), definisce che la terapia CAR-T è indicata in pazienti che hanno già ricevuto almeno tre linee di trattamento (comprendenti un inibitore del proteosoma, un immunomodulante e un anticorpo monoclonale anti-CD38), nei quali la malattia sia andata in progressione durante l'ultimo trattamento.

A partire dalla sua esperienza, come avviene "l'arruolamento" del paziente?

In Regione Veneto esiste dal 2016 la Rete Ematologica Veneta (REV), che raggruppa tutte le strutture cliniche in Poli ematologici, ciascuno coordinato da centri ematologici di primo livello ("hub") che interagiscono con centri di secondo e terzo livello ("spoke"). L'UOC di Ematologia dell'AOUI Verona è il centro coordinatore del Polo Ematologico di Verona e Rovigo. Per il reclutamento dei pazienti candidati al trattamento con CAR-T ci avvaliamo di questa rete, ed i centri di secondo e terzo livello fungono così da centri *referral*. Ogni settimana abbiamo una riunione telematica di tutto il CAR-T Cell Team, preceduta da una riunione telematica sui casi clinici a cui possono partecipare anche i centri di secondo e terzo livello, ognuno dei quali porta in discussione eventuali pazienti che potrebbero beneficiare di un trattamento CAR-T. Questo consente di identificare precocemente i pazienti candidabili, evitando così potenziali ritardi nell'arruolamento dei pazienti.

Unanswered questions following reports of secondary malignancies after CAR-T cell therapy

Bruce L. Levine, Marcelo C. Pasquini, John E. Connolly, David L. Porter, Michael P. Gustafson, Jaap J. Boelens, Edwin M. Horwitz, Stephan A. Grupp, Marcela V. Maus, Frederick L. Locke, Fabio Ciceri, Annalisa Ruggeri, John Snowden, Helen E. Heslop, Crystal L. Mackall, Carl H. June, Anna M. Sureda & Miguel-Angel Perales

Reports of T cell malignancies after CAR-T cell therapy should be investigated, but existing data from follow-up studies suggest a low risk compared with other cancer treatments.

- si tratta di **un'evenienza** assai rara
- per i malati **gli attuali benefici superano di gran lunga il pericolo.**

A fine novembre 2023, dopo oltre dieci anni di utilizzo e con **oltre 34.400 persone trattate in tutto il mondo** sono stati registrati **23 pazienti** che, anni dopo aver ricevuto le CAR-T, hanno sviluppato tumori secondari, di tumori maligni secondari correlati alle cellule T, inclusi **il linfoma e la leucemia a cellule T**.

Table 2. Reported Toxic Effects of CAR T Cells.

CAR Specificity and Adverse Effect	Reference
CD19 CAR	
B-cell aplasia and hypogammaglobulinemia	Kochenderfer et al., ⁵² Kalos et al. ⁵³
Cytokine release syndrome	Davila et al., ³⁶ Lee et al., ⁵⁴ Teachey et al. ⁵⁵
Dermatitis	Rubin et al. ⁵⁶
Hematophagocytic lymphohistiocytosis and macrophage activation syndrome	Grupp et al., ³² Porter et al., ⁴¹ Teachey et al. ⁵⁵
Neurologic effects such as ataxia and aphasia	Brudno and Kochenderfer ⁵⁷
Cerebral edema	Gust et al. ⁵⁸
B-cell maturation antigen CAR: the cytokine release syndrome	Riches et al. ⁵⁹
Mesothelin CAR: anaphylaxis (antibody to murine single-chain variable fragments)	Maus et al. ⁶⁰
Carbonic anhydrase IX CAR: cholangitis (on-target)	Lamers et al. ⁶¹
HER2/neu CAR: lethal cytokine release syndrome	Morgan et al. ⁶²
Carcinoembryonic antigen–related cell-adhesion molecule 5 (CEACAM5) CAR: hemorrhagic colitis (on-target)	Thistlethwaite et al. ⁶³

Sfide future per le CAR-T

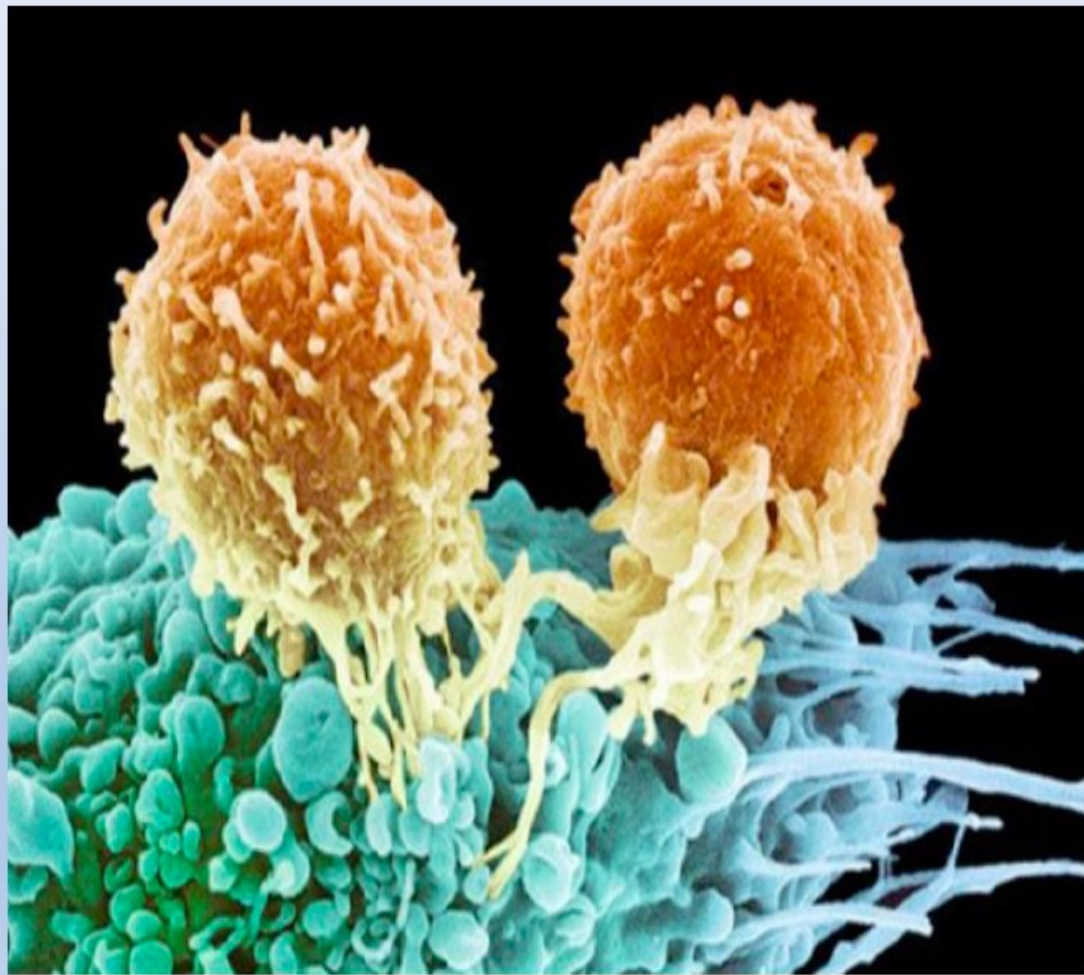


Immagine al microscopio dei CAR (chimeric antigen receptor) Fonte:
<https://www.pharmastar.it/news/business/car-t-cell-chi-vincer-nella-corsa-fra-novartis-juno-e-kite-22652>

- **Selezione del target:** una volta caratterizzata la proteina espressa solo dalle cellule tumorali, è possibile sviluppare un buon TCR chimerico;
- **Ottimizzazione del segnale costimolatorio:** induzione della proliferazione delle cellule T;
- **Tossicità:** l'incapacità delle cellule T ingegnerizzate di distinguere tra cellule normali e cellule tumorali che esprimono l'Ag mirato => utilizzo di *CAR-T bispecifiche* in grado di identificare coppie di Ag entrambi espressi solo dalle cellule tumorali