

26. Novembre

## CAR-T Cell: linfociti immunogeneticamente modificati

*Non sempre cambiare equivale a migliorare,  
ma per migliorare bisogna cambiare.*  
Winston Churchill

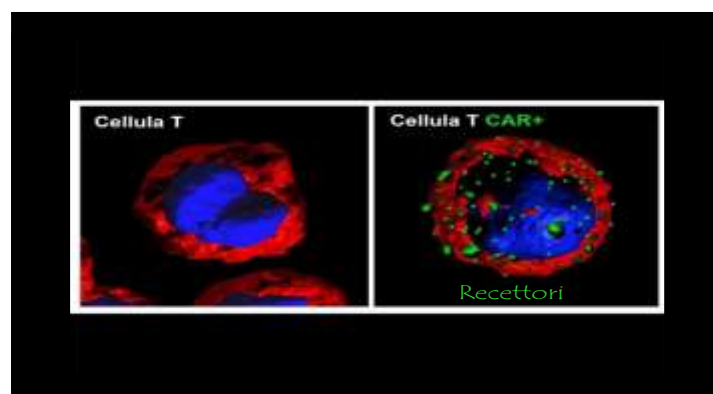


L'uso di globuli bianchi ingegnerizzati (cellule che vengono rimosse dal corpo umano, modificate con recettori che consentono loro di riconoscere le cellule tumorali e quindi restituite al corpo) per combattere ed eliminare le cellule tumorali è stato spesso definito "rivoluzionario" e ha persino permesso ai ricercatori la "rara opportunità" di fare riferimento a una cura per alcuni tipi di cancro.

Sorprendentemente, la tecnologia delle **cellule CAR T** è solo un esempio di una fiorente area di indagine in cui le cellule possono essere "personalizzate" per svolgere funzioni che ci avvicinano alla realizzazione di applicazioni mediche e scientifiche di base a lungo immaginate.

Le **CAR-T** (acronimo dall'inglese "**Chimeric Antigen Receptor T-cell therapies**" ovvero "**Terapie a base di cellule T esprimenti un Recettore Chimerico per antigene**") sono terapie innovative che utilizzano alcune cellule immunitarie del paziente (**linfociti T**), geneticamente modificate per riconoscere e combattere alcuni tipi di malattie onco-ematologiche.

La terapia di trasferimento delle **cellule T** è definita anche come *terapia cellulare adottiva*, *immunoterapia adottiva* o *terapia cellulare immunitaria* e, nel caso delle **CAR-T**, non prevede l'utilizzo delle classiche molecole di sintesi chimica, bensì di geni, cellule e tessuti geneticamente modificati e poi somministrati al paziente.



Le **CAR-T** agiscono direttamente sul sistema immunitario del paziente per aiutarlo a riconoscere e distruggere le cellule tumorali; infatti, la modificazione genetica effettuata in laboratorio sui **linfociti T** permette di far esprimere a queste cellule **una specifica molecola (recettore)** che le

renderà in grado, una volta espansa e reinfusa nel paziente, di riconoscere bersagli (antigeni) presenti sulle cellule tumorali ed eliminarle.

La specificità con cui i **linfociti T** del recettore chimerico dell'antigene (CAR) possono riconoscere e uccidere le cellule tumorali e discriminare le cellule normali rimane limitata

**Wendel Lim** del *Department of Cellular and Molecular Pharmacology, dell' Università di S. Francisco*



ha confermato come le **cellule T del recettore dell'antigene chimerico (CAR)** hanno dimostrato come le cellule immunitarie ingegnerizzate possono fungere da nuova potente classe di terapie contro il cancro.

**Lim WA, et al. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. Cell. 2017 Feb 9;168(4):724-740.**

Tuttavia sono necessarie nuove terapie per i pazienti con **linfomi di Hodgkin o non-Hodgkin resistenti** alle terapie standard. In effetti, la mancata risposta alla chemioterapia standard e la ricaduta dopo il trapianto autologo di cellule staminali sono indicatori di una prognosi particolarmente sfavorevole.

**Jennifer Brudno & James Kochenderfer** del *Experimental Transplantation and Immunology Branch del NIH*



stanno dimostrando come le **cellule CAR-T** rappresentino una nuova modalità di trattamento per questi pazienti. I dati degli studi clinici hanno espresso la potente attività delle cellule **CAR-T** anti-**CD19** contro molteplici sottotipi di linfoma a **cellule B**, tra cui linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), linfoma follicolare, linfoma a cellule del mantello e linfoma della zona marginale.

È importante sottolineare che le cellule **CAR-T anti-CD19** hanno un'impressionante attività contro il linfoma refrattario alla chemioterapia, inducendo remissioni complete durature che durano > 2 anni in alcuni pazienti con DLBCL refrattario.

Le terapie con **cellule CAR-T** sono, tuttavia, associate a tossicità potenzialmente fatali, tra cui la sindrome da rilascio di citochine e tossicità neurologiche.

Le **cellule CAR-T** con nuovi antigeni bersaglio, tra cui CD20, CD22 e catena leggera  $\kappa$  per i linfomi a cellule B e CD30 per i linfomi di Hodgkin e a cellule T, sono attualmente oggetto di studi clinici.

Poiché le **CAR-T** prodotte a livello centrale vengono anche testate in studi clinici multicentrici sponsorizzati dall'industria, probabilmente diventeranno presto una terapia standard.

**Brudno JN, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. Nat Rev Clin Oncol. 2018 Jan;15(1):31-46. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.128. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28857075.**

Le cellule **CAR-T** non riescono ad essere efficaci come nei tumori liquidi per l'incapacità di raggiungere e sopravvivere nel microambiente che circonda i focolai neoplastici. L'intricata rete di interazioni incrociate che si verificano tra componenti tumorali, cellule stromali e immunitarie porta ad uno stato anergico inefficace favorendo l'evasione dalle difese dell'ospite.

Un obiettivo è quello di tracciare la strada imposta dai tumori solidi alle cellule **CAR-T**, avendo ben presenti le insidie e le strategie da sviluppare e perfezionare per possibilmente superare questi ostacoli.

Le cellule **CAR-T** sono efficaci nel trattamento dei tumori ematologici ma uccidono indiscriminatamente sia le cellule B cancerose che quelle normali perché prendono di mira la proteina specifica del lignaggio **CD19**.

La perdita di **cellule B** è tollerabile, ma l'uccisione del tessuto normale durante il trattamento di tumori solidi con cellule **CAR-T** rimane una sfida importante che se non adeguatamente risolta può portare a tossicità. In alcuni casi, si è dimostrata letale.

Una sfida importante è trovare *proteine di superficie* che siano assolutamente tumore-specifiche. Ad esempio i recettori dell'antigene come il recettore del fattore di **crescita epidermico (EGFR)** e il **recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2)** sono sovraespressi nei tumori, ma sono anche espressi a densità inferiori nei normali tessuti epiteliali

**Yasui W et al Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. Cancer Res. 1988 Jan 1;48(1):137-41. PMID: 2446740.**

Pertanto, le cellule **CAR-T anti-HER2** hanno mostrato, in alcuni casi, reazioni crociate tossiche con organi normali.

Il team del **Surgery Branch, National Cancer Institute del, NIH** diretto da **Richard Morgan** ha assemblato un **vettore CAR** ottimizzato contenente frazioni di segnalazione **CD28, 4-1BB** e **CD3zeta** che è stato posizionato in un vettore gamma-retrovirale e utilizzato per trasdurre linfociti autologhi del sangue periferico (PBL) da un **paziente con cancro del colon metastatico ai polmoni e al fegato**, refrattario a più trattamenti standard.

L'efficienza di trasferimento genico nelle **cellule T** autologhe era del **79% CAR(+)** nelle cellule **CD3(+)**, queste cellule hanno dimostrato un'elevata reattività specifica nei test di cocoltura in vitro. Dopo il completamento del condizionamento non mieloablativo, il paziente ha ricevuto 10<sup>(10)</sup> cellule per via endovenosa.

Entro *15 minuti* dall'infusione cellulare il paziente (donna di 36 anni) ha manifestato *distress respiratorio* e ha mostrato i segni di un "drammatico" infiltrato polmonare alla radiografia del torace.

È stata intubata e nonostante, l'intenso intervento medico, la paziente è deceduta 5 giorni dopo il trattamento.

I campioni di siero dopo l'infusione cellulare hanno mostrato marcati aumenti di *interferone-gamma (IFN-gamma)*, *fattore stimolante le colonie di granulociti macrofagi (GM-CSF)*, *fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF-alfa)*, *interleuchina-6 (IL-6)*, e *IL-10*, valori coerenti con una tempesta di citochinica.

E' stato ipotizzato che il gran numero di cellule somministrate si sia localizzato nel polmone immediatamente dopo l'infusione e sia stato attivato per rilasciare citochine dal riconoscimento di bassi livelli di ERBB2 sulle cellule epiteliali polmonari.

**Morgan RA et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. Mol Ther. 2010 Apr;18(4):843-51.**

Tale tossicità sul bersaglio e fuori dal tumore è stata osservata per le **CAR** dirette a diversi altri antigeni associati al tumore sovraespressi.

Sebbene alcuni casi di tossicità possano essere gestiti clinicamente, idealmente, le cellule T ingegnerizzate andrebbero discriminate dalle cellule normali sulla base della densità dell'antigene

Per ampliare la loro finestra terapeutica, **le cellule T ingegnerizzate** devono percepire la densità dell'antigene bersaglio con una risposta sigmoidale e una soglia di uccisione più netta .

I comportamenti dose-risposta in cui piccoli cambiamenti nell'input possono generare grandi cambiamenti non lineari nell'attività di output sono indicati come risposte "ultrasensibili"

Il comportamento ultrasensibile è osservato in molti sistemi regolatori critici e può essere raggiunto attraverso vari meccanismi, che vanno dall'utilizzo di molecole allosteriche (ad esempio, l'emoglobina) a cascate o circuiti regolatori più complessi .

*Il team di Hernandez-Lopez del Cell Design Institute, Department of Cellular and Molecular Pharmacology, University of California San Francisco*



ha prodotto cellule T umane modificate utilizzando un meccanismo in due fasi che ha permesso loro di uccidere le cellule che esprimono grandi quantità di proteina marcatore del cancro ma non le cellule che esprimono una piccola quantità della stessa proteina.

Praticamente ha sintetizzato un recettore sintetico che riconosce l'antigene con bassa affinità.

Quel recettore ha segnalato di aumentare l'espressione di un recettore dell'antigene chimerico (CAR) con elevata affinità per lo stesso antigene.

*Il circuito si è dimostrato efficace nei modelli di cancro in coltura cellulare e nei topi, offrendo la speranza di estendere la strategia delle cellule CAR T contro i tumori solidi.*

Gli antigeni associati al tumore sovraespressi [ad esempio, il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e il recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2)] sono bersagli attraenti per le cellule T terapeutiche, ma la reazione crociata "off-tumorale" è tossica con i tessuti normali che esprimono bassi livelli di antigene bersaglio e possono verificarsi con i linfociti T-recettore chimerico dell'antigene (CAR).

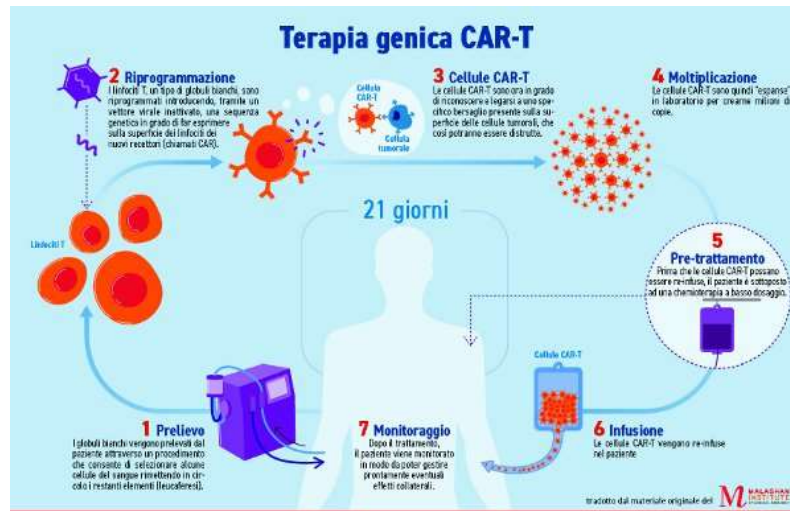
Ispirati dai circuiti di risposta ultrasensibili naturali, il team di San Francisco ha progettato un circuito di feedback positivo in due fasi che consente alle cellule T citotossiche umane di discriminare i bersagli sulla base di una soglia di densità dell'antigene sigmoidale.

In questo circuito, un recettore Notch sintetico a bassa affinità per HER2 controlla l'espressione di un CAR ad alta affinità per HER2. L'aumento della densità di HER2 ha quindi effetti cooperativi sulle cellule T - aumenta sia l'espressione che l'attivazione di CAR – portando così ad una risposta sigmoidea.

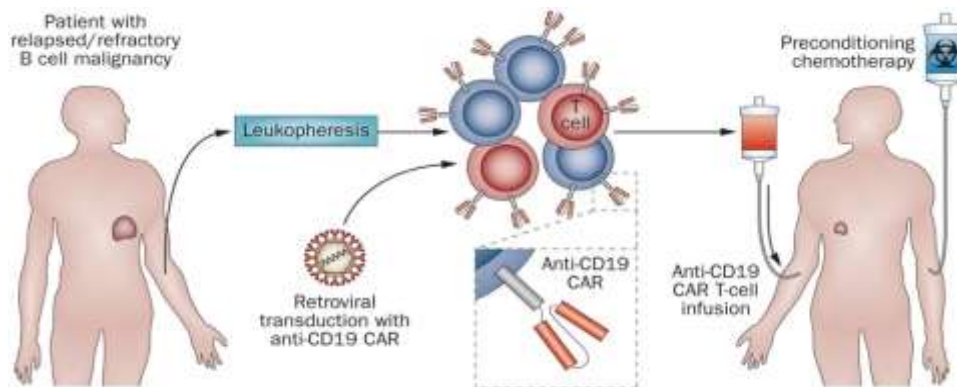
***Hernandez-Lopez RA et al. T cell circuits that sense antigen density with an ultrasensitive threshold. Science. 2021 Mar 12;371(6534):1166-1171.***

## Allegato: la terapia CAR-T

La terapia CAR-T funziona grazie alle **cellule del sistema immunitario** del paziente affetto da linfoma. Al paziente viene infatti prelevato il sangue e, dunque, attraverso un separatore cellulare vengono raccolti i suoi linfociti. Questi vengono poi inviati ad appositi laboratori che vi inseriscono all'interno il **recettore CAR** (Chimeric Antigen Receptor) in grado di riconoscere le cellule del linfoma. Dopo circa 3-4 settimane i linfociti CAR-T ritornano presso il centro che li ha richiesti e possono essere somministrati al paziente tramite infusione.



In questo modo è possibile sfruttare la capacità acquisita dai linfociti T di riconoscere e uccidere selettivamente le cellule del linfoma ed evitare gli effetti collaterali della chemioterapia, che oltre al tumore va a colpire anche le cellule sane del paziente.



## Un anno fa... Baedeker/Replay del 26. Novembre *Il futuro oltre i vaccini: i nanobodies neutralizzanti*

**Premessa** Il futuro è, ovviamente, meno conoscibile del passato, ma non è sotto tutti gli aspetti inconoscibile. Il tempo continuerà a passare, la legge di gravità si applicherà ancora e nessuno di noi sopravviverà ai propri limiti fisiologici. Nell'immediato futuro, gli attuali vaccini profilattici per la malattia causata da SARS-CoV-2, molto probabilmente diventeranno la pietra angolare nella gestione della prossima, inevitabile, endemia (COVID-22). Purtroppo, questi vaccini stanno mostrando la loro efficacia relativa, essendo immunizzanti ma non sterilizzanti possono lasciare una parte della popolazione vaccinata (fortunatamente minima) non protetta; l'immunità può essere di breve durata e la loro efficacia può essere inferiore negli anziani, la fascia di età più a rischio di sviluppare un COVID-19 grave. Inoltre la disponibilità limitata del vaccino nei paesi poveri, l'esitazione al vaccino e la continua formazione di varianti rende improbabile che questi vaccini possano dare una immunità stabile nel tempo. In base a queste

considerazioni è auspicabile che l'immunoterapia passiva attraverso l'impiego di anticorpi neutralizzanti capaci di prevenire o sopprimere la replicazione virale nelle vie aeree inferiori (in particolare) trovi una sua collocazione terapeutica nel salvataggio dei pazienti con COVID-19. Negli ultimi mesi lo sviluppo precoce di anticorpi neutralizzanti per impedire la progressione della malattia grave e la somministrazione precoce di anticorpi neutralizzanti ricombinanti da plasma di convalescenti ha dimostrato la potenziale capacità di ostacolare la progressione dell'infezione. **Dagli anticorpi neutralizzanti ai nanobodies** Tuttavia la maggior parte degli anticorpi neutralizzanti umani convenzionali valutati negli studi clinici sono stati selezionati da pazienti convalescenti ed avevano come bersaglio l'RBM nell'RBD e nei siti sul dominio N-terminale, siti particolarmente esposti alla pressione selettiva mediata dall'anticorpo. Presumibilmente l'efficacia di questi anticorpi è attenuata nei nuovi nei nuovi VOC SARS-CoV-2 emergenti come nei ceppi classificati nelle linee B.1.1.7, B.1.351 e P.1 che consentono la fuga dalla neutralizzazione anticorpale acquisita naturalmente o indotta dal vaccino. Pochi giorni fa il VIR-7831 (anticorpi REGN10933/REGN10987) della Regeneron Pharmaceuticals Inc., Tarrytown, ha ottenuto l'approvazione per l'uso di emergenza dalla Food and Drug Administration per il trattamento di COVID-19 da lieve a moderato in pazienti non ospedalizzati che sono a rischio di sviluppare una malattia grave (Baum A 2021). Anticorpi ultra potenti sono da circa un anno in sperimentazione clinica da un team internazionale coordinato da Alejandra Tortorici del Department of Biochemistry, University of Washington. (Tortorici A 2020) Michael Diamond della Washington University School of Medicine è impegnato nella ottimizzazione di anticorpi monoclonali derivati da plasma convalescente specifici per virus con mutazioni acquisite nel motivo di legame del recettore immunodominante (RBM) ed in particolare per le varianti di preoccupazione (COV) (Diamond M et al 2021). I Nanobodies Sono anticorpi a dominio singolo (sdAb), di fatto sono un frammento di anticorpo costituito da un singolo dominio di anticorpo monomero variabile. Come un intero anticorpo, sono in grado di legarsi selettivamente a uno specifico antigene. Con un peso molecolare di soli 12-15 kDa, i nanobodies sono molto più piccoli degli anticorpi comuni (150-160 kDa) che sono composti da due catene proteiche pesanti e due catene leggere, e anche più piccoli dei frammenti Fab (~ 50 kDa, una catena leggera e mezza catena pesante) e frammenti variabili a catena singola (~ 25 kDa, due domini variabili, uno da una catena leggera e uno da una catena pesante). Sebbene la maggior parte della ricerca sui nanobodies sia attualmente basata sui domini variabili della catena pesante, è stato anche dimostrato che i nanobodies derivati dalle catene leggere si legano specificamente agli epitopi bersaglio, quelli a dominio singolo sono specifici quanto un normale anticorpo e in alcuni casi sono più robusti. **Nanobodies neutralizzanti** Da circa un anno il Department of Molecular Biosciences, The University of Texas coordinato da Daniel Wrapp sta mettendo a punto il VHH72, una molecola composta dal dominio variabile di un anticorpo formato da una sola catena pesante che ha la capacità di neutralizzare sia SARS-CoV-1 che SARS-CoV-2 (Wrapp D 2020) Il VHH72 fa parte della classe molecolare dei nanobodies, ha la capacità di legarsi ad un epitopo nel dominio di legame del recettore (RBD) della proteina spike che è altamente conservata nei membri del sottogenere Sarbecovirus dei betacoronavirus, impedisce l'interazione del SARS-CoV-1 e del SARS-CoV-2 RBD con l'angiotensina conversione dell'enzima 2 (ACE2) presumibilmente destabilizzando la proteina spike. I ricercatori del Laboratory of Virology and Chemotherapy, Rega Institute, KU Leuven Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, 3000, di Leuven (Belgio) hanno dimostrato che la somministrazione profilattica di un prototipo di fusione del dominio Fc VHH72- immunoglobulina umana G1 (IgG1) (VHH72-Fc) è capace di limitare la replicazione di SARS-CoV-2 nei polmoni di criceti infettati sperimentalmente. Rispetto agli anticorpi monoclonali umani convenzionali, il costrutto di fusione VHH-Fc è più piccolo (80 kDa contro 150 kDa) è codificato da un singolo gene, ed offre vantaggi rispetto al dosaggio e alla producibilità. Tuttavia Anche se sono stati testati altri nanobodies neutralizzanti contro la spike del SARS-CoV-2, nessuno, ad oggi, ha raggiunto uno sviluppo clinico avanzato

**Le aspettative del XVR011....**

**(per continuare vai all'originale)**

### **Avviso ai lettori di Baedeker:**

Da circa un anno (Gennaio 2021) su Baedeker sono riportate riflessioni periodiche sull'efficacia dei vaccini in base ai dati pubblicati "probabilmente" attendibili. Riporto quelle più indicative. La rilettura può essere illuminante

18.01.21: Immunità sterilizzanti e non sterilizzanti.

19.01.21: Illusioni immunitarie

21.01.21 : Avviso ai lettori di Baedeker: sono in arrivo le "varianti"

16.02.21: Perché le varianti mi preoccupano

21.02.21: Il futuro del COVID-19 sarà l'endemia?

23.03.21: Quando non puoi avere quello che ami...

03.04.21: La fiducia nei vaccini: una porta aperta in una stanza senza muri.

09.05.21: Le conseguenze delle convinzioni errate sui vaccini

01.07.21: La grande fuga: le varianti che eludono le risposte neutralizzanti

03.08.21: La vaccinazione impedirà di diffondere il virus?

20.08.21: Finalmente ! : durata degli anticorpi indotti dal vaccino mRNA-1273 contro le varianti SARS-CoV-2

28.08.21: E' vero che la protezione dei vaccini sta progressivamente calando?: le cinque domande senza risposta che tutti si fanno.

08.10.21 14.09.21: L'obbligo vaccinale non cura ma tiene la stragrande maggioranza dei vaccinati, fuori dall'ospedale e dall'obitorio modo le persone vaccinate diffondono la variante delta: i test di trasmissibilità

11.10.21: Lo sapevo...solo il 25 % dei vaccini promessi e stanziati verrà donato ai paesi poveri

08.10.21: Le caratteristiche immunologiche che regolano la transizione del COVID-19 all'endemia

Era già tutto scritto...





