

*Medicina  
Traslazionale e  
Trapianto :  
Le cellule CAR-T*

*Cristina Rabascio  
Istituto Europeo di Oncologia (MI)*

# (CAR-T)

Chimeric antigen receptor T cell therapy rappresenta attualmente la frontiera più avanzata della ricerca ematologica

CAR è l'acronimo di Chimeric Antigenic Receptor: un recettore chimerico proteico trans-membrana sintetizzato in laboratorio

il primo farmaco di questa nuova classe di terapie cellulari – Kymriah™ (tisagenlecleucel, CTL019) è stato approvato agosto 2017 dall'FDA ed è per il momento disponibile solo negli Stati Uniti.

La nuova terapia cellulare trova indicazione nel trattamento di pazienti fino a 25 anni d'età affetti da leucemia linfoblastica acuta (ALL) refrattaria al trattamento o alla seconda ricaduta.

[N Engl J Med. 2017 Oct 5;377\(14\):1313-1315.](#)  
**Tragedy, Perseverance, and Chance -  
The Story of CAR-T Therapy.**  
[Rosenbaum L.](#)

The screenshot shows the top portion of the New England Journal of Medicine website. At the top left is the journal's logo, a red circular emblem with a white cross and the text 'The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE'. To the right of the logo, the journal's name is displayed in a serif font. Further right, there is a 'SUBSCRIBE OR RENEW' button with a right-pointing arrow. Below the logo and name is a navigation bar with links for 'HOME', 'ARTICLES & MULTIMEDIA', 'ISSUES', 'SPECIALTIES & TOPICS', 'FOR AUTHORS', and 'CME'. A search bar is located on the right side of the navigation bar, with the text 'Keyword, Title, Author, or Citation' and a magnifying glass icon. Below the navigation bar is a horizontal banner image showing various medical and scientific scenes. The main content area features the word 'Perspective' in a large, bold font, followed by the article title 'Tragedy, Perseverance, and Chance — The Story of CAR-T Therapy' and the author's name 'Lisa Rosenbaum, M.D.'. Below the author's name is the publication information: 'N Engl J Med 2017; 377:1313-1315 | October 5, 2017 | DOI: 10.1056/NEJMp1711896'. To the right of the article title is a 'Share' button with icons for Facebook, Twitter, LinkedIn, and YouTube. Below the article title is a navigation bar with tabs for 'Article', 'References', 'Citing Articles (1)', and 'Metrics'. The main text of the article begins with 'In 2010, 5-year-old Emily Whitehead was diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Though her parents were told that if you had to have a kid with cancer, ALL was the best one to have, Emily's course was hardly typical. After two rounds of chemotherapy, necrotizing fasciitis developed in both legs and she barely avoided amputation. Sixteen months later, she had a relapse. Bone marrow transplantation was recommended, but the Whiteheads, concerned about toxic effects, sought a second opinion at Children's Hospital of Pennsylvania. There they learned about a new therapy, developed by University of Pennsylvania investigators and known as CART-19, which involved genetically engineering the patient's own T cells to kill tumor cells.' The text continues with 'Unfortunately, a clinical trial had not yet been cleared by the Food and Drug Administration (FDA), and Emily's leukemic cells were doubling daily. So Emily returned to her local hospital and received another round of intensive chemotherapy, which bought her 3 weeks but no remission. Out of options, one oncologist recommended hospice. But "That just didn't make sense to us," says Tom Whitehead, Emily's father. When the Whiteheads said they wanted to return to Children's Hospital, the oncologist told them that hospice was preferable to entering Emily into an experimental study'.

On the right side of the article, there is a 'TOOLS' section with a grid of icons and labels: PDF, Print, Download Citation, Supplementary Material, E-Mail, Save, Article Alert, Reprints, Permissions, and Share/Bookmark. Below the tools is a 'Chinese Translation 中文翻译' link. Further down, there is a 'TOPICS' section with a list of related topics: Leukemia/Lymphoma, Childhood Cancer, Treatments in Oncology, Drugs, Devices, and the FDA, and Cost of Health Care. To the right of the topics is a 'MORE IN' section with a link to 'Perspective' dated 'October 5, 2017'. At the bottom of the right side, there is a 'TRENDS' section with a link to 'Most Viewed (Last Week)'.

descrivere la storia di questa terapia, per certi versi paradigmatica del percorso, spesso accidentato e non scevro da passioni e implicazioni etiche, di gran parte delle terapie innovative che stanno trasformando la farmaceutica.

Il primo paziente a essere sottoposto in USA, nel 2012, a questo trattamento fu Emily, una bambina di 6 anni che non rispondeva alle terapie classiche.

descrizione delle prime cellule CAR-T da parte dell'immunologo israeliano Zelig Eshhar nel 1993

[Proc Natl Acad Sci U S A.](#) 1993 Jan 15;90(2):720-4.

**Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors.**

[Eshhar Z<sup>1</sup>](#), [Waks T](#), [Gross G](#), [Schindler DG](#).

L'intuizione è stata quella di unire la specificità dell'anticorpo per riconoscere il tumore con l'efficacia dei linfociti T, le cellule del nostro sistema immunitario modificandoli "educandoli" a riconoscere particolari recettori.

### ***CAR-T cells:***

*linfociti T modificati per esprimere recettori creati in laboratorio.*

*I recettori degli antigeni sono detti "chimerici" perché sono composti da diversi elementi:*

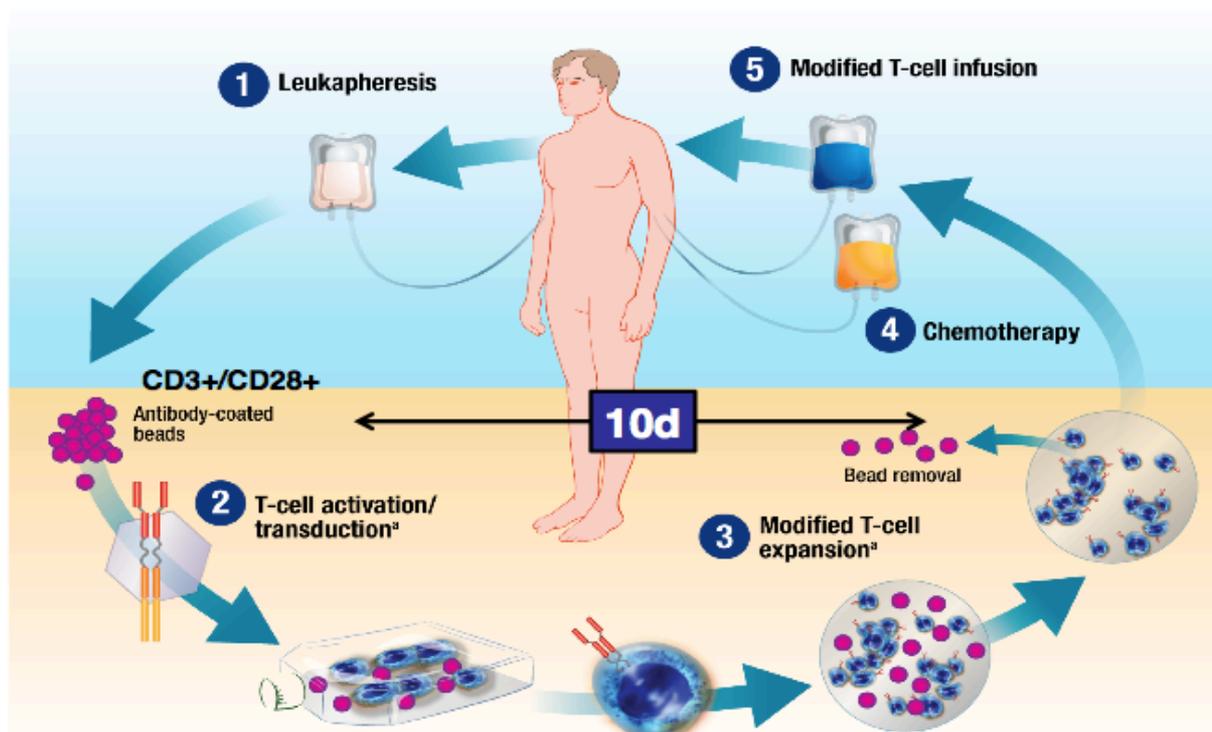
*la regione variabile, di origine anticorpale, che riconosce gli antigeni espressi dal tumore*

*una regione spacer di collegamento*

*dai domini di segnalazione all'interno del linfocita T*

# CART19 Study Overview\*

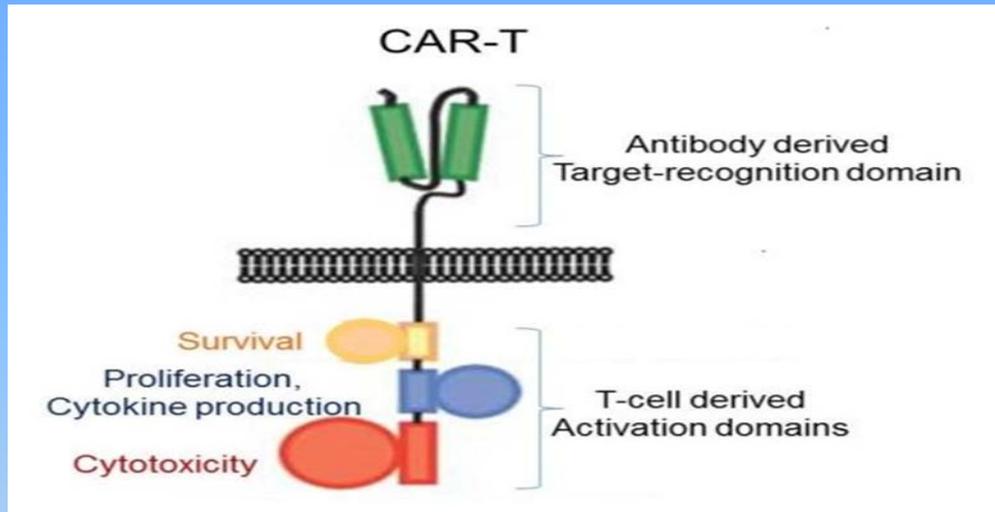
Porter DL, et al. *N Engl J Med.* 2011;365(8):725-733  
Kalos M, et al. *Sci Transl Med.* 2011;3:95ra73  
Grupp S, et al. *N Engl J Med* 2013;368:1509-1518



Le terapie cellulari CAR-T fanno parte delle cosiddette immunoterapie adoptive cell transfer (ACT).

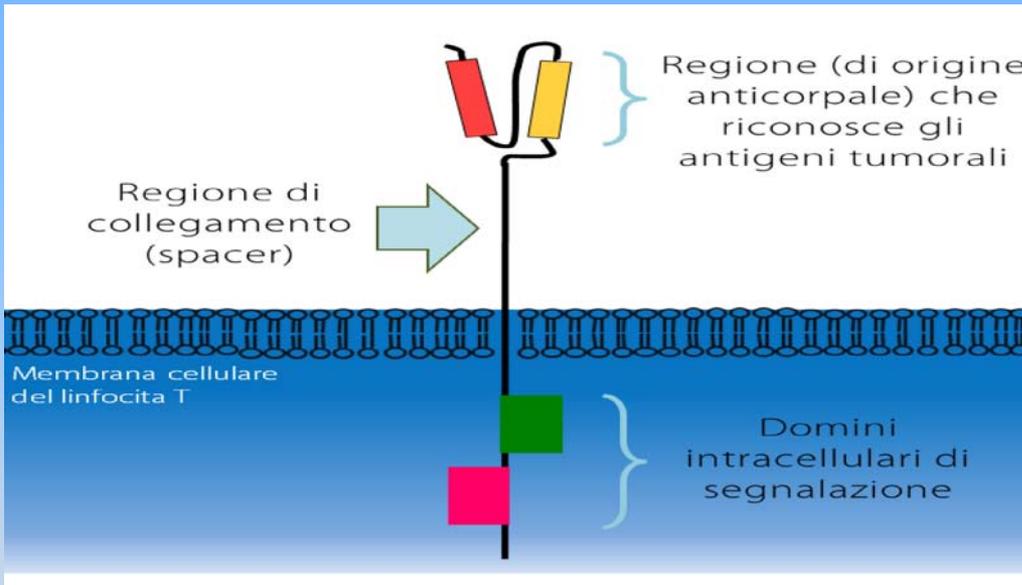
Le terapie cellulari CAR-T utilizzano come substrato i linfociti T del paziente, prelevati dal suo sangue tramite leucaferesi.

le cellule subiscono una riprogrammazione genetica mediante tecniche di gene editing o ricorso a vettori virali.

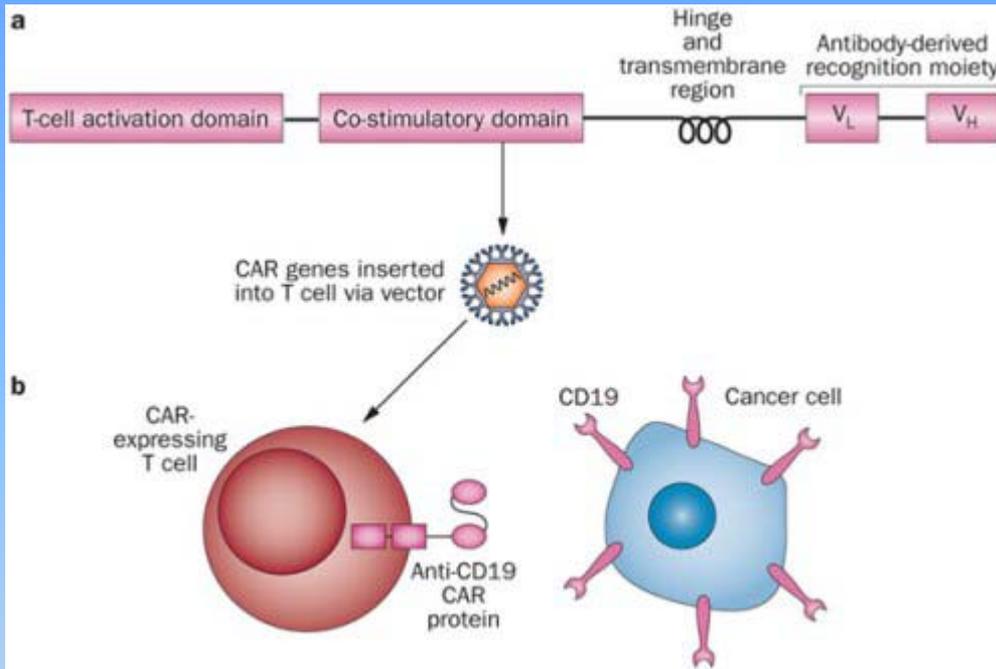


il linfocita T è ingegnerizzato, tramite l'utilizzo di vettori oncoretrovirali o lentivirali, con recettori chimerici per l'antigene (CAR), costituiti da un dominio di riconoscimento antigenico fuso a domini di trasduzione del segnale derivati dal complesso TCR.

*In laboratorio è possibile isolare le regioni variabili dell'anticorpo (in rosso e in arancione nell'immagine ) le parti che riconoscono **in maniera estremamente specifica** le molecole espresse sulla superficie dei tumori*



## 1° Generazione



Questo tipo di struttura combina la specificità del riconoscimento anticorpale MHC-indipendente con le potenzialità anti-tumorali dei linfociti T, permettendo così il possibile trasferimento al linfocita T sostanzialmente di qualsiasi specificità antigenica.

Il dominio di riconoscimento antigenico generalmente deriva dalle porzioni variabili delle catene anticorpali o del TCR, mentre il dominio di trasduzione generalmente utilizzato deriva dalla porzione intracellulare della catena  $\zeta$  del CD3

[Sci Transl Med.](#) 2011 Aug  
**T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia.**

[Kalos M](#)<sup>et al.</sup>

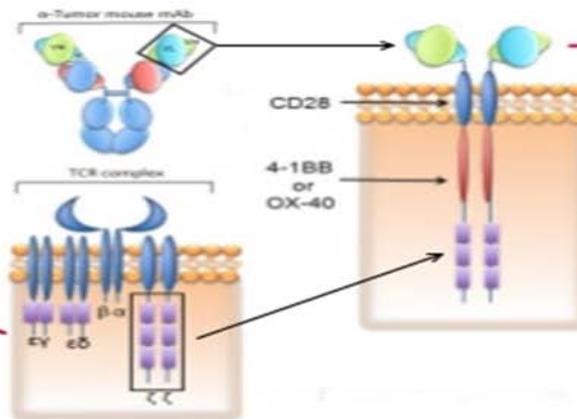
## 2° Generazione

ha previsto l'aggiunta alla porzione intracellulare di domini costimolatori derivati dalle molecole CD28, 41BB o OX40, si è tradotta nella generazione di cellule che presentano una maggiore capacità di produzione di citochine e di espansione ([Carpenito C et al, 2009](#); [Ritchie DS et al, 2013](#)).

### I CAR: radar-bazooka per le cellule del sistema immunitario

Recettori chimerici  
**CARs**

Una parte intracellulare  
che rende attivi le  
cellule del sistema  
immunitario

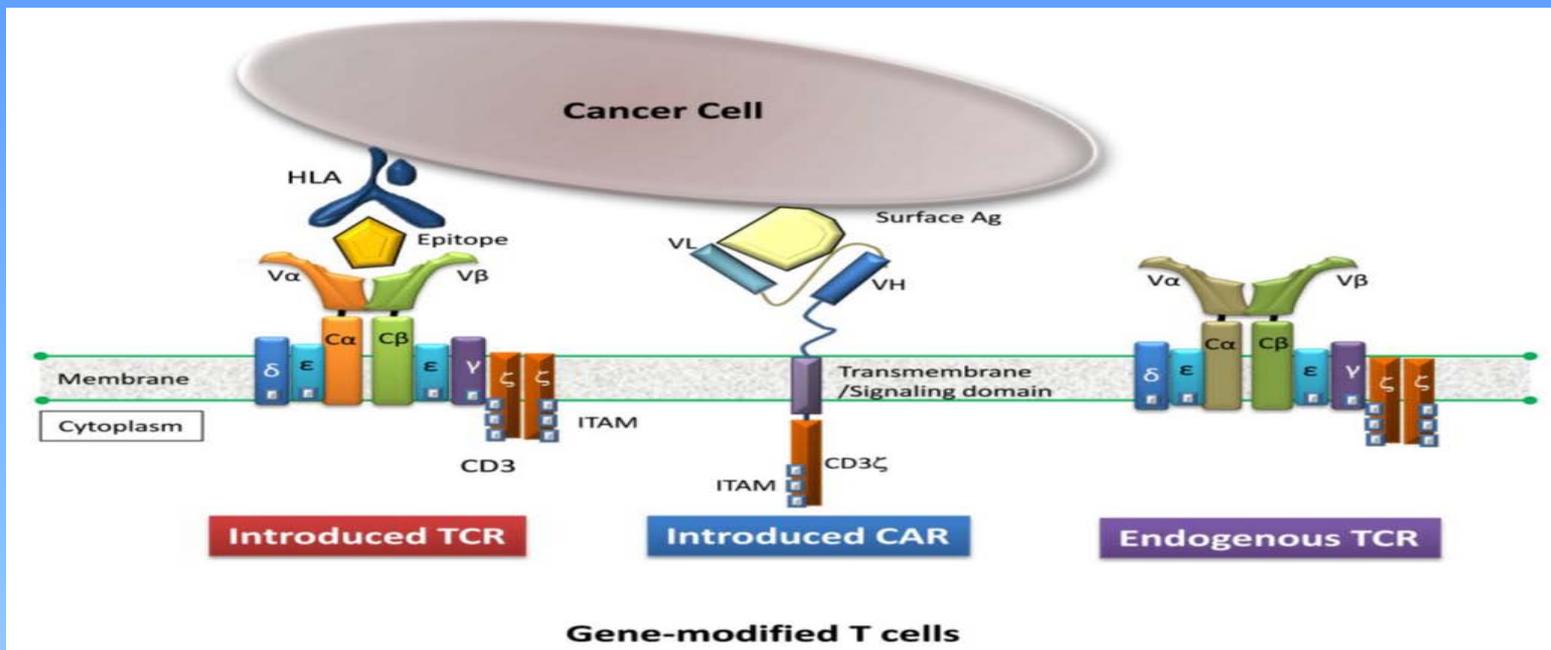


Una parte extracellulare  
derivata da un anticorpo che  
riconosce la cellula tumorale



modified from Chekmasova AA, Brentjens  
RJ (2010), *Discov Med*, 9(44):62-70

la combinazione di multipli domini di segnale (CD3z-CD28-41BB oppure CD3z-CD28-OX40) ha permesso lo sviluppo di CAR di 3° generazione ad attività ulteriormente incrementata ([Till BG et al, 2012](#))



Le sequenze sintetiche così espresse sulla superficie cellulare sono in grado di riconoscere antigeni specifici sulla superficie della cellula tumorale (soprattutto il recettore CD19, ma anche CD20, CD23 ed ErbB2/HER2)

La somministrazione al paziente delle cellule CAR-T così modificate fa sì che esse si leghino selettivamente alle cellule tumorali, attivandone i meccanismi di morte cellulare.

## 4° generazione :

L'editing genetico.

Il team di W. Qasim ha prelevato delle [cellule T](#) da un donatore qualunque e, utilizzando la tecnica **TALENS**, ne ha modificato il corredo genetico in modo da renderle universali.

Questo implica due enormi vantaggi: non c'è bisogno di prelevare sangue al paziente e si **elimina il rischio di rigetto** durante il trattamento.

Anche in questo caso sono stati aggiunti i geni per i recettori CAR

L'ingegneria genetica ha degli strumenti di editing molto potenti: oltre alla tecnica **TALEN**, la ricerca si sta concentrando sulla neo-nata **CRISPR**

**TALEN** = Transcription Activator-Like Effector Nucleases

**TALEN** sono enzimi di restrizione artificiali capaci di agganciarsi al Dna, che possono essere disegnati in modo da connettersi a qualunque sequenza genica desiderata, derivano dai Tal effectors, strutture proteiche in grado di svolgere appunto tale funzione e presenti in alcuni batteri che infettano le piante.

**CRISPR** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats sono elementi genetici che i batteri utilizzano come forma di immunità acquisita per proteggersi dai virus. consistono in brevi sequenze geniche provenienti dai genomi virali incorporate in quelli batterici. Introducendo nelle cellule che vogliamo manipolare plasmidi – piccoli filamenti di Dna circolari – contenenti Crispr fatti su misura e geni per la sintesi delle Cas, è possibile tagliare e modificare il genoma in punti precisi.

## Gene Modified T Cell Therapies for Hematological Malignancies.

Abramowski-Mock U, Delhove JM, Qasim W.

Hematol Oncol Clin North Am. 2017 Oct;31(5):913-926. Review.

**Table 1**  
Clinical experience using CAR-T cells redirected toward hematological malignancies

Target	Malignancy	Gene Transfer Method	Costimulatory Domain	T Cell Origin	Cell Dosage	N	Center	Reference
CD19	FL	Electroporation	CD3 $\zeta$	Autologous	1–2 $\times 10^9/m^2$	2	NCI	Jensen et al, <sup>32</sup> 2010
CD19	FL	Retroviral	CD28	Autologous	5 $\times 10^6/kg$	1	NCI	Kochenderfer et al, <sup>21</sup> 2010
CD19	FL; CLL; SMZL	Retroviral	CD28	Autologous	5–55 $\times 10^6/kg$	8	NCI	Kochenderfer et al, <sup>22</sup> 2012
CD19	CLL; MCL; DLBCL	Retroviral	CD28	Allogeneic	1–100 $\times 10^6/kg$	10	NCI	Kochenderfer et al, <sup>23</sup> 2013
CD19	CLL	Retroviral	CD28	Autologous	1–4 $\times 10^6/kg$	4	NCI	Kochenderfer et al, <sup>33</sup> 2015
CD19	ALL	Retroviral	CD28	Autologous	1, 3 $\times 10^6/kg$	21	NCI	Lee et al, <sup>34</sup> 2015
CD19	CLL; ALL	Retroviral	CD28	Autologous	2–30 $\times 10^6/kg$	9	MSKCC	Brentjens et al, <sup>35</sup> 2011
CD19	ALL	Retroviral	CD28	Autologous	1.5–3 $\times 10^6/kg$	5	MSKCC	Brentjens et al, <sup>36</sup> 2013
CD19	CLL, ALL	Retroviral	CD28	Autologous	0.4, 1, 3 $\times 10^7/kg$	10	MSKCC	Brentjens et al, <sup>35</sup> 2011
CD19	FL; DLBCL	Retroviral	CD28	Autologous	2–20 $\times 10^7/m^2$	6	BCM	Savoldo et al, <sup>37</sup> 2011
CD19	ALL, CLL	Retroviral	CD28	Allogeneic	1.5, 4.5, 12 $\times 10^7/m^2$	8	BCM	Cruz et al, <sup>26</sup> 2013
CD19	CLL; ALL	Retroviral	CD28	Autologous	0.2, 1, 2 $\times 10^8/m^2$	14	BCM	Xu et al, <sup>38</sup> 2014
CD19	CLL; ALL; DLBCL; FL; MCL	Retroviral	4-1BB	Autologous	1.5–500 $\times 10^7$ cells	110	Upenn	Maude et al, <sup>39</sup> 2014
CD19	CLL	Lentiviral	4-1BB	Autologous	0.15–16 $\times 10^6/kg$	3	Upenn	Porter et al, <sup>18</sup> 2011; Kalos et al, <sup>19</sup> 2011
CD19	ALL	Lentiviral	4-1BB	Autologous	10–100 $\times 10^6/kg$	2	Upenn	Maude et al, <sup>39</sup> 2014
CD19	MM	Lentiviral	4-1BB	Autologous	1–5 $\times 10^7$ cells	10	Upenn	Garfall et al, <sup>40</sup> 2015
CD19	CLL, SLL, MM	Lentiviral	4-1BB	Autologous	1–5 $\times 10^{7/8}$ cells	42	Upenn	Fraietta et al, <sup>41</sup> 2016

CD19	ALL	Lentiviral	4-1BB	Autologous	$0.76-20.6 \times 10^6/\text{kg}$	30	Upenn	Maude et al, <sup>39</sup> 2014
CD19	NHL	Sleeping Beauty	CD28	Autologous	$1 \times 10^6/\text{m}^2$	Auto (7)	MDACC	Kebriaei et al, <sup>28</sup> 2016
		Transposition	—	Allogeneic	$1 \times 10^6/\text{m}^2$	Allo (19)	—	
CD20	MCL; NHL	Electroporation	CD28-4-1BB	Autologous	$0.1-3.3 \times 10^9/\text{m}^2$	3	FHCRC	Till et al, <sup>42</sup> 2012
CD20	DLBCL	Lentiviral	4-1BB	Autologous	$\sim 0.3-2.2 \times 10^7/\text{kg}$	7	CPLAGH	Wang et al, <sup>43</sup> 2014
CD22	FL; DLBCL; NHL; B-ALL	Lentiviral	4-1BB	Autologous	$0.3-1 \times 10^7/\text{kg}$	9	NCI	Haso et al, <sup>44</sup> 2013
CD30	HHL; NHL	Retriviral	CD28	Autologous	$2 \times 10^7 - 1 \times 10^8/\text{m}^2$	28	BCM	Rothe et al, <sup>45</sup> 2015
CD30	HL	Lentiviral	4-1BB	Autologous	$3.2 \times 10^5/\text{kg}$	11	CPLAGH	Wang et al, <sup>46</sup> 2015
CD33	AML	Lentiviral	4-1BB	Autologous	$1.19 \times 10^9$ cells	10	CPLAGH	Wang et al, <sup>46</sup> 2015
CD123	AML	Lentiviral	CD28	Autologous	—	30	COHNMC	Mardiros et al, <sup>47</sup> 2015
		—	—	Allogeneic	—	—	—	
CD138	MM	Lentiviral	4-1BB	Autologous	$0.44-3.78 \times 10^7/\text{kg}$	5	CPLAGH	Guo et al, <sup>48</sup> 2016
BCMA	MM	Retroviral	CD28	Autologous	$0.3 \times 15 \times 10^6/\text{kg}$	12	NCI	Ali et al, <sup>49</sup> 2016
ROR1	CLL; SLL	Sleeping Beauty	4-1BB	Autologous	$1 \times 10^5/\text{kg}$	48	MDACC	Deniger et al, <sup>50</sup> 2015
IgK	NHL; CLL; MM	Retrovirus	CD28	Autologous	$0.2-2 \times 10^8/\text{m}^2$	16	BCM	Ramos et al, <sup>51</sup> 2016
LeY	AML	Retroviral	CD28	Autologous	$0.5-1.3 \times 10^9$ cells	5	PMCCC	Ritchie et al, <sup>52-56</sup> 2013

*Abbreviations:* ALL, acute lymphoblastic leukemia; BCM, Baylor College of Medicine; BCMA, B-cell maturation antigen; BL, burkitt lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; COHNMC, City of Hope National Medical Center; CPLAGH, Chinese PLA General Hospital (China); DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FHCRC, Fred Hutchinson Cancer Research Center; FL, follicular lymphoma; HL, Hodgkin's lymphoma; LeY, Lewis Y antigen; MCL, mantle cell lymphoma; MDACC, MD Anderson Cancer Center; MDS, myelodysplastic syndrome; MM, multiple myeloma; MSKCC, Memorial Sloan Kettering Cancer Center; NHL, non-Hodgkin lymphoma; NCI, National Cancer Institute; PMCCC, Peter MacCallum Cancer Center (Australia); ROR1, receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1; SLL, small lymphocytic lymphoma; Upenn, University of Pennsylvania.

Reported enrollment numbers (N) as detailed for registered trials at [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov).

- I prossimi anni dovrebbero vedere l'autorizzazione di un numero sempre maggiore di terapie cellulari, anche se molti aspetti devono essere ancora approfonditi con particolare riguardo al profilo di sicurezza per il paziente.
- Produzione controllata in laboratori autorizzati



Il progetto EURE-CART  
(EUROpean Endeavour for  
Chimeric Antigen  
Receptor Therapies )

multicentrico di fase I/II per dimostrare la sicurezza e l'efficacia di un'immunoterapia adottiva basata su **cellule T geneticamente modificate con un recettore chimerico antigenico (CAR) specifico per l'antigene CD44v6 (CD44v6 CAR – T)** in pazienti affetti da leucemia mieloide acuta o da mieloma multiplo.

# Ucar-ts (Universal chimeric antigen receptor T-cells) che rappresentano dei Car allogenici 'pronti all'uso

La loro produzione può essere sviluppata su larga scala e standardizzata in conformità ai criteri di fabbricazione previsti per i prodotti farmaceutici.

Citation: *Molecular Therapy — Oncolytics* (2016) **3**, 16006; doi:10.1038/mto.2016.6

Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy



[www.nature.com/mto](http://www.nature.com/mto)

## REVIEW

# Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors

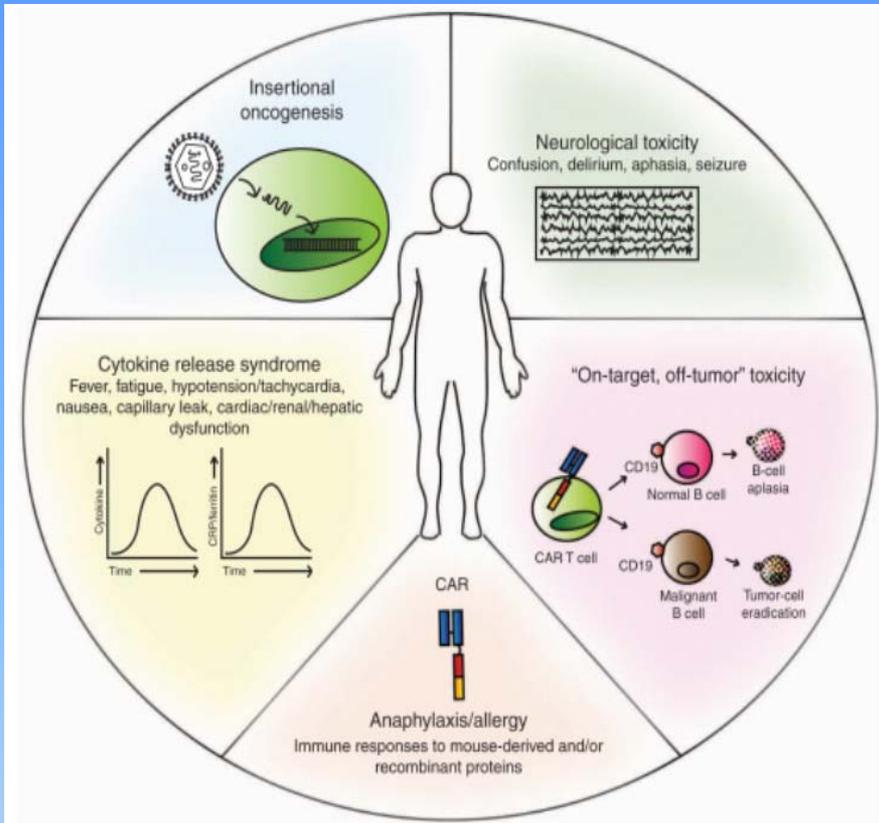
Kheng Newick<sup>1</sup>, Edmund Moon<sup>1</sup> and Steven M Albelda<sup>1</sup>

Chimeric antigen receptor (CAR) T cells are engineered constructs composed of synthetic receptors that direct T cells to surface antigens for subsequent elimination. Many CAR constructs are also manufactured with elements that augment T-cell persistence and activity. To date, CART cells have demonstrated tremendous success in eradicating hematological malignancies (e.g., CD19 CARs in leukemias). This success is not yet extrapolated to solid tumors, and the reasons for this are being actively investigated. Here in this mini-review, we discuss some of the key hurdles encountered by CART cells in the solid tumor microenvironment.

*Molecular Therapy — Oncolytics* (2016) **3**, 16006; doi:10.1038/mto.2016.6; published online 13 April 2016

2017 AACR  
Annual  
Meeting was  
held from  
April 1-5,  
2017, in  
Washington,  
D.C.

Lo sviluppo di terapie CAR-T per i tumori solidi è una vera e propria sfida nella sfida poiché è finora risultato molto più difficile identificare antigeni adatti su questa tipologia di cellula tumorale.



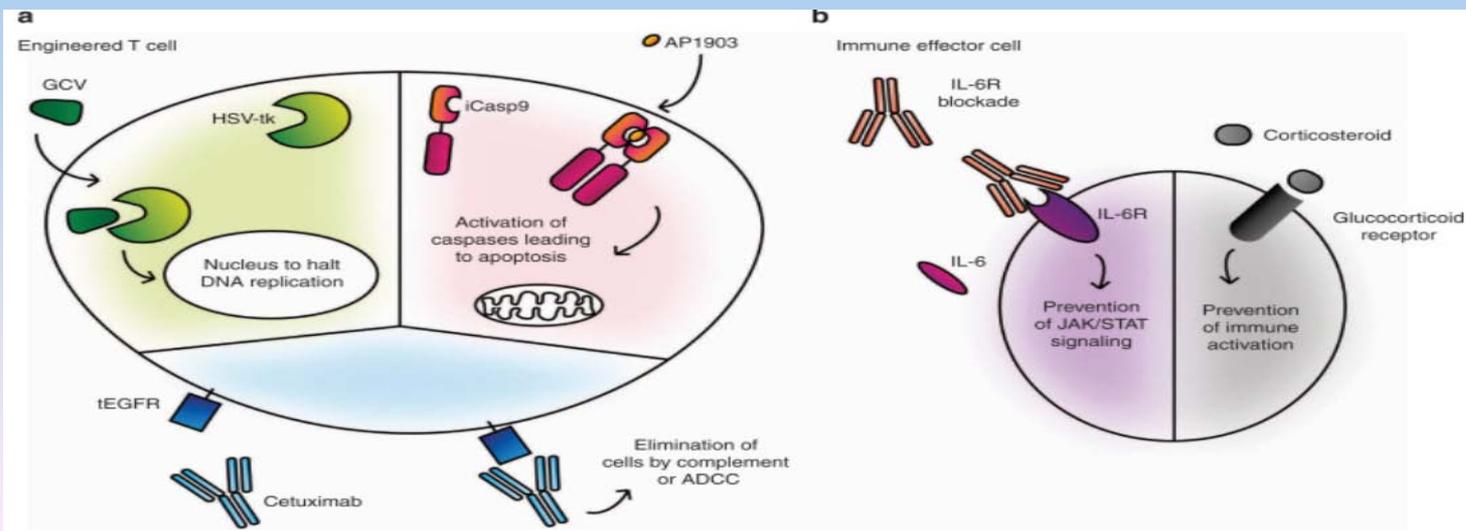
## REVIEW

# Toxicity and management in CAR T-cell therapy

Chalice L Bonifant<sup>1</sup>, Hollie J Jackson<sup>2</sup>, Renier J Brentjens<sup>3</sup> and Kevin J Curran<sup>3</sup>

T cells can be genetically modified to target tumors through the expression of a chimeric antigen receptor (CAR). Most notably, CAR T cells have demonstrated clinical efficacy in hematologic malignancies with more modest responses when targeting solid tumors. However, CAR T cells also have the capacity to elicit expected and unexpected toxicities including: cytokine release syndrome, neurologic toxicity, "on target/off tumor" recognition, and anaphylaxis. Theoretical toxicities including clonal expansion secondary to insertional oncogenesis, graft versus host disease, and off-target antigen recognition have not been clinically evident. Abrogating toxicity has become a critical step in the successful application of this emerging technology. To this end, we review the reported and theoretical toxicities of CAR T cells and their management.

*Molecular Therapy — Oncolytics* (2016) **3**, 16011; doi:10.1038/mto.2016.11; published online 20 April 2016

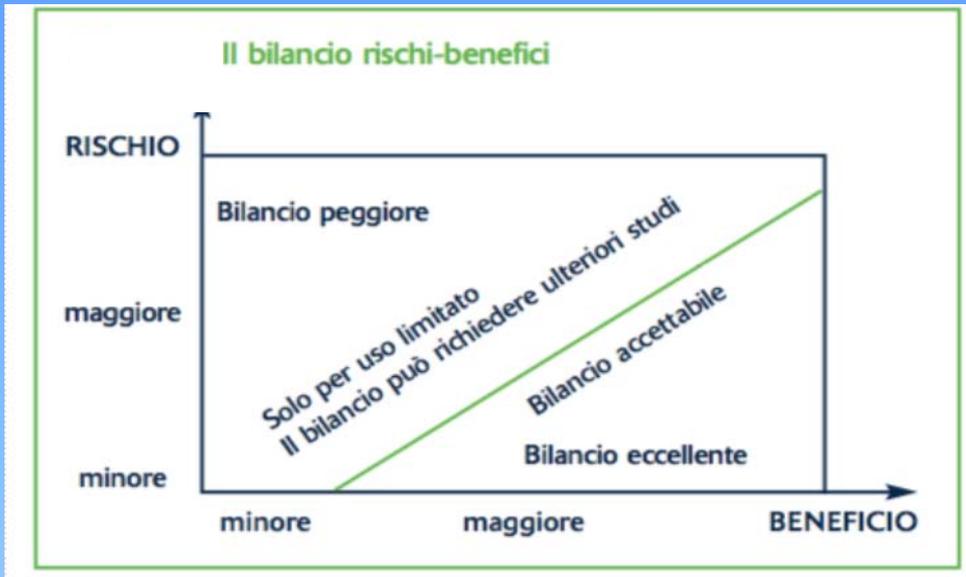


Dal punto di vista della gestione clinica i problemi principali sono legati alla possibile insorgenza di neurotossicità e della cosiddetta sindrome da rilascio di citochine (CRS).

Se la sindrome CRS sia un effetto “on-target” desiderato della terapia CAR-T, in quanto segnala la presenza di cellule T attivate nel corpo del paziente, gli effetti collaterali sarebbero tanto più gravi quanto più deteriorato è il quadro clinico iniziale del paziente.

L’infusione endovena potrebbe dare luogo a pesanti reazioni allergiche fino allo shock anafilattico, e anche il rischio d’infezioni che potrebbero portare alla morte del paziente.

Tra gli altri possibili effetti collaterali viene segnalata una prolungata citopenia e ipogammaglobulinemia con possibilità di sviluppare tumori secondari post terapia.



La gravità dei possibili effetti collaterali è legato il fatto che la terapia cellulare CAR-T autorizzata possa essere somministrata solo all'interno di centri clinici appositamente accreditati e in grado di gestire in modo efficace tutte le emergenze.

l'arricchimento delle conoscenze di farmacovigilanza : studi osservazionali ; trial clinici usando tecniche di sorveglianza attiva.

La valutazione sulla sicurezza o ancor meglio sul rapporto rischi-benefici, è una responsabilità condivisa

Bibliografia:

Clin Pharm Therap 2009;85:241-6.

Clin Pharm Therap 2012;92:486-93.

*Considerate la vostra semenza:  
fatti non foste a viver come bruti,  
ma per seguir virtute e canoscenza.*

*(Dante, Inferno (vv. 112-120))*



# Grazie per l'attenzione