

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**

**“AMEDEO AVOGADRO”**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**Corso di Laurea Magistrale in Farmacia**

**TESI DI LAUREA**

***Chimeric Antigen Receptor – Natural Killer: Sviluppo e Applicazione nelle terapie oncologiche***

**Relatore**

**Prof. Fabrizio Condorelli**

**Candidata**

**Alessia Adriana Adiletta**

**Anno Accademico 2023-2024**

**Sessione Estiva**

Da piccola ho sempre fantasticato su cosa sarei potuta diventare da grande. Mi immaginavo seduta dietro ad una scrivania a firmare assegni, oppure fingevo di essere un dottore di successo salvando la vita a tutti i miei peluches. Nonostante la mia giovane sicurezza quelle certezze che avevo sul mio futuro erano solide come un castello di carte. Senza nemmeno accorgermene il tempo era andato avanti senza aspettarmi ed io mi ero ritrovata a dover compiere una delle decisioni più importanti della mia vita: “Cosa sarei diventata”?

Erano molti i mestieri che mi ronzavano in testa ma nessuno intonava la nota giusta per eliminare quel brusio. Fino a quando non decisi di iscrivermi alla facoltà di Farmacia, forse per una sfida con me stessa o forse perché effettivamente non sapevo in cosa fossi realmente portata. Tuttavia ora sono qui, a scrivere qualche riga di dedica senza nemmeno rendermi conto che quella bambina piena di incertezze alla fine ha trovato la sua strada. Una strada piena di soddisfazioni, consapevolezza, gratitudine ma anche una strada segnata di ansie, sacrifici e delusioni.

Il mio percorso lo dedico a me, alla ragazza che ha sempre cercato di dimostrare a sè stessa quanto vale, lo dedico a tutto quello che ho appreso e a tutto quello che potrò apprendere in futuro.

Grata di poter chiudere questo capitolo e cominciarne un altro, ancora più bello intitolato vita.

# INDICE

1. IL SISTEMA IMMUNITARIO ED IL CANCRO .....	5
1.1. EVASIONE IMMUNITARIA NELLA PROGRESSIONE DEL CANCRO .....	9
2. LE TERAPIE ONCOLOGICHE E LA SVOLTA IMMUNOTERAPICA.....	13
2.1 L'EVOLUZIONE VERSO LE TERAPIE CELLULARI .....	15
2.2. CAR-T: LA NUOVA FRONTIERA NELLA LOTTA CONTRO IL CANCRO .....	16
2.2.1 LA STRUTTURA DEL RECETTORE CAR.....	18
2.2.2 CAR-T: PROBLEMATICHE TERAPEUTICHE.....	20
LA SELEZIONE DEGLI ANTIGENI.....	20
LA DIFFICOLTÀ DELL'INFILTRAZIONE DELLE CAR-T NEI TUMORI .....	20
IL MICROAMBIENTE TUMORALE OSTILE.....	20
LA SCOMPARSA DELL'ANTIGENE.....	21
LA DIFFICOLTÀ DI ESPANSIONE E DI PERSISTENZA DELLE CAR-T .....	21
TOSSICITÀ SISTEMICA.....	21
3. OBIETTIVO DEL LAVORO DI TESI.....	23
4. SUPERARE LE LIMITAZIONI DELLE CAR-T: IL FUTURO DELLE TERAPIE ANTITUMORALI CON LE CAR-NK .....	24
4.1. RECETTORI DELLE CELLULE NATURAL KILLER.....	27
4.2. FONTI DI CELLULE NK ALLOGENICHE PER LA TERAPIA DEL CANCRO.....	30
4.3. REGIMI PREPARATORI DI LINFODEPLEZIONE.....	34
4.4. STRUTTURA E INGEGNERIZZAZIONE CAR-NK.....	36
4.4.1. SPINA DORSALE E PROMOTORE VETTORIALE .....	36
4.4.2. IL PEPTIDE SEGNALE.....	37
4.4.3. VARIANTE A FRAMMENTO A CATENA SINGOLA (SCFV).....	38
4.4.4. IL LINKER .....	39
4.4.5. LA REGIONE CERNIERA (CD8 $\alpha$ , Ig CH2CH3).....	39
4.4.6. IL DOMINIO TRANSMEMBRANA (CD3, CD8, CD28, NKG2D, 2B4).....	40
4.4.7. SEGNALE DI ATTIVAZIONE .....	40
4.4.8. IL TAG DI RILEVAMENTO (GFP, cMyc-tag, FLAG, LNGFR).....	42
4.5. METODI PER LA TRASDUZIONE DI CAR IN CELLULE NK .....	42
4.5.1. I LENTIVIRUS.....	42
4.5.2. I RETROVIRUS.....	43
4.5.3. L'ELETTROPORAZIONE DELL'mRNA .....	43
4.5.4. IL TRASPOSONE <i>SLEEPING BEAUTY</i> .....	44

4.5.5. RICOMBINAZIONE MEDIANTE CRISPR/CAS9 .....	44
4.6. BERSAGLI DELLE CELLULE CAR-NK.....	45
4.7. IMPIEGHI TERAPEUTICI.....	49
4.7.1. LINFOMA NON HODGKIN .....	50
4.7.1.1. EPIDEMIOLOGIA ED EZIOPATOGENESI .....	50
4.7.1.2. MANIFESTAZIONI CLINICHE .....	51
4.7.1.3. TERAPIE .....	51
4.7.2. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA.....	52
4.7.2.1. MANIFESTAZIONI CLINICHE .....	52
4.7.2.2. TERAPIE .....	53
4.7.3. LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA.....	53
4.7.3.1. TERAPIE .....	54
4.8. CLINICAL TRIALS .....	55
4.9. LIMITI E PROBLEMI.....	59
4.9.1. L'EFFETTO FRATRICIDA.....	59
4.9.2. LA CRIOCONSERVAZIONE.....	59
4.9.3. ALLORIGETTO DELLE CELLULE T .....	60
4.9.4. SENESCENZA REPLICATIVA .....	61
4.9.5. IL MICROAMBIENTE TUMORALE.....	62
4.10. OTTIMIZZAZIONE DELLA TERAPIA CAR-NK .....	62
4.11. PROSPETTIVE FUTURE: I TUMORI SOLIDI.....	67
4.11.1. IL TUMORE DELLA MAMMELLA.....	68
4.11.2. CANCRO DEL PANCREAS .....	68
4.11.3. CARCINOMA OVARICO.....	70
4.11.4. ALTRI TUMORI .....	70
5. CONCLUSIONI .....	75
BIBLIOGRAFIA.....	76

## 1. IL SISTEMA IMMUNITARIO ED IL CANCRO

Diversi meccanismi endogeni, intrinseci ed estrinseci alla cellula “patologica”, agiscono al fine di contenere o eliminare le cellule potenzialmente tumorali allorché la riparazione dei danni genetici fallisce.

Tra i meccanismi estrinseci ne sono stati individuati almeno tre principali attraverso i quali le cellule e i tessuti circostanti riconoscono la presenza di cellule tumorali. Il primo di questi consegue alla necessità delle cellule di ricevere specifici segnali trofici dall'ambiente circostante per evitare la loro morte cellulare programmata (ad esempio l'interazione delle cellule epiteliali con la matrice extracellulare), per cui l'interruzione di tali segnali può portare alla morte cellulare. Un secondo meccanismo coinvolgerebbe il controllo di geni che regolano la polarità delle cellule e, conseguentemente, la loro capacità di formare giunzioni cellulari e di proliferare per cui, in presenza di giunzioni cellulari alterate, si creerebbero dei segnali che impediscono l'avanzamento del ciclo cellulare. Infine, il terzo meccanismo estrinseco sarebbe rappresentato dalla capacità dei leucociti effettori del sistema immunitario di limitare la trasformazione o la crescita delle cellule tumorali. Altresì, il sistema immunitario sarebbe in grado di individuare e eliminare selettivamente le cellule tumorali presenti in determinati tessuti in base all'espressione di antigeni tumorali specifici (TSAs). Questo processo, noto come immuno-sorveglianza del cancro, si verifica quando il sistema immunitario riconosce e distrugge le cellule trasformate che sono sfuggite ai meccanismi intrinseci di soppressione tumorale, prevenendo così la loro malignità. Nonostante l'esistenza di diversi meccanismi di soppressione tumorale nel nostro organismo, è però importante ricordare che il cancro può talvolta sopravvivere e persino proliferare.

Il sistema immunitario svolge un ruolo essenziale nel regolare la crescita dei tumori attraverso due componenti essenziali denominate immunità innata e immunità adattativa. L'immunità innata è costituita da diversi elementi che comprendono le componenti tissutali (come le barriere epiteliali, che rappresentano una barriera fisica tra il corpo e l'ambiente esterno), componenti molecolari (proteine che circolano nel sangue e in altri liquidi biologici), i mediatori dell'infiammazione (rilasciati da cellule in risposta a stimoli) e una serie di componenti cellulari, ovvero tutte le cellule che costituiscono l'immunità innata. Queste cellule includono i fagociti, che utilizzano la fagocitosi come meccanismo prevalente per l'eliminazione dei patogeni, e sono caratterizzate da tre famiglie principali: a) quella che comprende i neutrofili, i monociti/macrofagi, i mastociti e le cellule dendritiche; b) quella

costituita dalle NK (Natural Killer); c) quella delle ILC (Innate Lymphoid Cell), ovvero cellule innate di origine linfoide. La capacità di riconoscimento delle cellule dell'immunità innata è limitata non essendo equipaggiate per distinguere uno specifico “invasore”.

Il sistema immunitario adattativo, invece, coinvolge:

- linfociti specializzati come i linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, abilitati al riconoscimento specifico degli antigeni tramite l'interazione con le cellule presentanti l'antigene (APC).
- i linfociti B, i quali si attivano trasformandosi in plasmacellule, producendo anticorpi, ovvero le principali molecole solubili dell'immunità adattativa.

L'immunità adattativa si definisce tale poiché si adatta al tipo di patogeno, perché ha una capacità di riconoscimento dettagliata e specifica. Questa immunità è anche detta acquisita in quanto attivata al momento del “primo” incontro con l'antigene, cui consegue lo sviluppo di una memoria immunologica, che la renderà più efficace nel caso di un secondo incontro col medesimo antigene (*re-challenge*).

Il sistema immunitario riconosce il patogeno basandosi su molecole che hanno funzione di recettori. I recettori per l'immunità innata sono i *Pattern Recognition Receptor* (PRR), in grado di riconoscere molecole conservate e condivise da più classi di microbi, definite “profili molecolari associati a patogeni” (PAMP) e “profili molecolari associati al danno” (DAMP). Quindi i PRR sono in grado di riconoscere sia le molecole che provengono dal mondo microbico, sia molecole rilasciate da cellule danneggiate o che vanno incontro a morte con dissoluzione delle membrane.

Notevoli differenze contraddistinguono i recettori dell'immunità specifica, i quali sono caratterizzati da una specificità elevatissima per gli antigeni dei quali riconoscono alcune porzioni, chiamate determinanti antigenici. Questi recettori sono rappresentati dagli anticorpi prodotti dai linfociti B attivati e dal recettore presente sulla membrana dei linfociti T, che si chiama T-Cell Receptor (TCR).

Ogni essere umano possiede miliardi di differenti recettori antigenici, in grado di riconoscere una grande varietà di antigeni. Questi recettori (sia TCR che anticorpi prodotti dai linfociti B) sono distribuiti nella popolazione dei linfociti T e B in modo clonale, quindi ogni linfocita T presenta un solo recettore con una sola specificità antigenica, stessa cosa per la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B. Da ciò ne consegue che, quando nell'organismo sarà

presente l'antigene specifico verso un TCR, le cellule che esprimono quel determinato TCR andranno incontro ad espansione clonale.

Le due tipologie di immunità rappresentano due bracci che hanno caratteristiche diverse dal punto di vista funzionale, ma che cooperano al fine proteggere l'organismo da una vasta gamma di minacce esterne e interne, contribuendo così al mantenimento della salute e del benessere generale. [1]

Sebbene il sistema immunitario si contraddistingua per la sua abilità di riconoscere e distruggere le cellule anomale, tale capacità può essere elusa da eventi mutazionali che sfuggono alla sua vigilanza, creando le condizioni per l'espansione e la diffusione metastatica delle cellule trasformate. Ciononostante, lo sfruttamento delle risposte immunitarie attraverso gli approcci definiti come immunoterapici rappresenta una forma di trattamento emergente e promettente per le patologie oncologiche.

Da lungo tempo è noto che il sistema immunitario e le cellule cancerogene convivono spesso in un equilibrio dinamico, e che l'interazione complessa tra i tumori in crescita e il sistema immunitario può influenzare lo sviluppo della malattia. La teoria della "sorveglianza immunitaria", in particolare, suggerisce che il sistema immunitario sia attivamente coinvolto nell'eliminazione delle cellule anomale per prevenire la formazione di tumori. Infatti, un'immunità compromessa è associata a maggior rischio di sviluppare il cancro. Di contro, è dimostrato che la presenza di un gran numero di linfociti infiltranti il tumore (TILs) contraddistingue spesso forme neoplastiche associate ad una prognosi ed una sopravvivenza migliori. Ne deriva che il fine dell'immunoterapia nel trattamento del cancro possa essere quello di potenziare o ristabilire la funzionalità del sistema immunitario affinché possa individuare e eliminare le cellule tumorali. Perché ciò avvenga, però, è allo stesso tempo necessario che l'intervento terapeutico sia in grado di contrastare i meccanismi utilizzati dal tumore per eludere e sopprimere la risposta immunitaria.

Capire come il sistema immunitario influenzi lo sviluppo e la progressione del cancro è stata una delle domande più impegnative in immunologia. Oggi si comprende che il sistema immunitario svolge un ruolo duplice nel contesto tumorale poiché non solo può contrastare la crescita del tumore eliminando le cellule tumorali o rallentandone la proliferazione, ma può anche favorirne la progressione selezionando le cellule tumorali più adattate alla sopravvivenza in un ambiente immunitario attivo, o creando condizioni favorevoli al loro

sviluppo all'interno del microambiente tumorale. Ricerche recenti condotte su modelli animali e su pazienti affetti da cancro hanno evidenziato, infatti, che specifiche categorie di cellule immunitarie, sia innate che adattative, insieme a molecole effettrici e vie metaboliche, possono collaborare per contrastare l'insorgenza e lo sviluppo dei tumori.

Ciò può avvenire mediante l'attivazione di numerosi meccanismi, quali:

1. Immunovigilanza. Il sistema immunitario rileva e riconosce le cellule tumorali come non-self, e cerca di eliminare attivamente le cellule tumorali prima che possano formare un tumore.
2. Attivazione delle cellule immunitarie. Una volta riconosciute, le cellule immunitarie come i linfociti T e le cellule natural killer (NK) vengono attivate per attaccare e distruggere le cellule tumorali.
3. Secrezione di citochine. Le cellule immunitarie possono rilasciare citochine, che sono molecole di segnalazione che stimolano altre cellule immunitarie ad attaccare il tumore e a combattere l'infezione.
4. Presentazione antigenica. Le cellule presentanti l'antigene (APC), come le cellule dendritiche, possono catturare antigeni provenienti dalle cellule tumorali e presentarli ai linfociti T esponendoli nel complesso maggiore di istocompatibilità, attivando così una risposta immunitaria specifica contro il tumore.
5. Attivazione della risposta immunitaria adattativa. Questo tipo di risposta immunitaria coinvolge i linfociti T e B che vengono attivati in modo specifico contro il tumore, fornendo una risposta mirata e a lungo termine. In particolare l'attivazione dei linfociti T citotossici (CD8<sup>+</sup>) permette la distruzione delle cellule tumorali presentate attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I attraverso la produzione di granzimi e perforina, mentre l'attivazione dei linfociti T helper (CD4<sup>+</sup>) fornisce dei segnali di attivazione ad altri componenti del sistema immunitario.
6. Formazione di memoria immunitaria. Dopo aver eliminato con successo il tumore, il sistema immunitario può sviluppare una memoria immunitaria che lo rende più preparato a combattere nuovamente lo stesso tumore in futuro.

7. Attivazione dei meccanismi di apoptosi. Il sistema immunitario può indurre la morte cellulare programmata (apoptosi) nelle cellule tumorali, impedendo loro di proliferare e diffondersi ulteriormente.

8. Regolazione dell'infiammazione. Il sistema immunitario può regolare l'infiammazione nell'ambiente tumorale, contribuendo a limitare la crescita e la diffusione del tumore.

Come detto in precedenza però, il sistema immunitario può, in opportune circostanze, favorire la crescita del tumore. Questa doppia azione dell'immunità, sia nel proteggere l'organismo dall'insorgere di tumori, che nel promuovere la loro crescita, rientra nel concetto biologico di *immunoediting* [2], processo dinamico attraverso il quale il sistema immunitario interagisce con le cellule tumorali, influenzando la loro evoluzione. Questo concetto si basa sull'idea che il sistema immunitario non solo può riconoscere e distruggere le cellule tumorali (fase di eliminazione), ma può anche modellare la loro crescita e sviluppo (fase di equilibrio) e persino favorire la crescita di varianti tumorali immuno-evasive (fase di fuga).

Nella fase di eliminazione, il sistema immunitario riconosce le cellule tumorali come estranee e le elimina efficacemente. Tuttavia, durante questo processo di interazione tra il sistema immunitario e il tumore, possono sopravvivere varianti tumorali che sono meno suscettibili alla distruzione immunitaria. Queste varianti possono entrare nella fase di equilibrio, in cui la loro crescita è controllata dal sistema immunitario, ma non completamente eliminata. Infine, le varianti tumorali che hanno sviluppato meccanismi di evasione immunitaria possono sfuggire al riconoscimento del sistema immunitario e proliferare in modo incontrollato, portando alla fase di fuga. [3]

L'abilità delle cellule tumorali di sfuggire ai meccanismi di controllo e distruzione del sistema immunitario, nota come evasione tumorale, riveste un ruolo essenziale nella progressione del cancro. Tale fenomeno permette alle cellule tumorali di proliferare, invadere i tessuti adiacenti e diffondersi in altre sedi del corpo, influenzando significativamente il corso della malattia.

### **1.1. EVASIONE IMMUNITARIA NELLA PROGRESSIONE DEL CANCRO**

Uno dei meccanismi coinvolti nell'evasione della sorveglianza immunitaria da parte della cellula tumorale prevede il coinvolgimento una particolare tipo di linfociti T, denominati

Treg, o cellule T regolatorie. In condizioni fisiologiche, il loro ruolo principale è quello di controllare e sopprimere l'attività di altre cellule immunocompetenti, aiutando a prevenire risposte immunitarie eccessive o dannose. Ad esempio, le Tregs svolgono un ruolo cruciale nella prevenzione delle malattie autoimmuni, nel mantenimento della tolleranza immunitaria e nella soppressione delle risposte immunitarie indesiderate contro antigeni innocui. Tuttavia, nel contesto del microambiente tumorale, la soppressione immunitaria, agevolata dalle cellule Treg CD4 CD25 FoxP3 e da altre popolazioni cellulari soppressive, emerge come un meccanismo rilevante di evasione della risposta immune da parte del tumore, rappresentando un ostacolo significativo alle immunoterapie [4]. Queste cellule Treg sono spesso attratte nel microambiente tumorale ma messaggeri extracellulari prodotti dalle cellule tumorali. Evidenze scientifiche, ad esempio, indicano che il fattore di crescita trasformante (TGF)- $\beta$ , secreto dalle cellule tumorali e da altre cellule, sia in grado di facilitare la conversione *in situ* delle cellule T CD4 in Treg soppressive. [5]

Nei meccanismi di evasione tumorale sarebbero coinvolte anche cellule mieloidi, in particolare le "cellule soppressive di derivazione mieloide" (MDSC), le cellule dendritiche modulate (DC) e i macrofagi M1 ed M2, tutte utili a creare un microambiente infiammatorio in grado di promuovere l'iniziazione del tumore, l'angiogenesi e la metastasi. I fattori prodotti dal tumore e quelli rilasciati, in risposta, dalle cellule infiammatorie instaurerebbero un circolo vizioso conferendo, ad esempio alle MDSC, resistenza all'apoptosi e ad altro tipo di influenze esercitate dai linfociti T. Nello specifico del contesto oncologico, le MDSC CD11bGr1 sopprimono l'immunità antitumorale mediata dalle cellule T CD8, ad esempio inibendone l'espressione della catena  $\zeta$  del TCR. Le MDSC con tale fenotipo si accumulano, ad esempio, nelle lesioni del melanoma, in un contesto strettamente correlato all'ambiente infiammatorio, suggerendo che il microambiente tumorale infiammatorio favorisca il reclutamento e l'attività immunosoppressiva delle MDSC.

Un altro esempio di cellula infiammatoria con attività pro-tumorale è rappresentato dal macrofago CD11bF4/80, con fenotipo M2, il quale produce quantità elevate di TGF- $\beta$ , IL-10 e fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), favorendo la crescita del tumore. [6]

È ampiamente noto che un altro meccanismo cruciale attraverso il quale i tumori evitano il riconoscimento da parte del sistema immunitario è la riduzione dell'efficienza del processo di presentazione dell'antigene, che coinvolge le proteine del complesso maggiore di

istocompatibilità di classe I (MHC-I). La ridotta esposizione dell'antigene tumorale, infatti, può contribuire a un aumento dell'incidenza e della diffusione delle metastasi tumorali, poiché i linfociti T citotossici (CTL) non sono più in grado di riconoscere tali tipologie di antigeni. Inoltre, anche eventi genetici quali le mutazioni puntiformi e le delezioni possono causare la perdita di singoli alleli dell'HLA, facilitando così l'evasione immunitaria dalle risposte dei linfociti T. Tuttavia, la sotto regolazione delle proteine MHC-I può rendere i tumori più suscettibili all'attacco delle cellule NK e, di conseguenza, i tumori potrebbero sviluppare meccanismi alternativi per sfuggire al riconoscimento da parte di quest'ultime. Riguardo alle NK, va infatti ricordato come queste esprimano recettori attivanti, come NKG2D, utili all'interazione con ligandi MICA e MICB indotti dallo stress, a loro volta espressi in diversi tipi di tumori. L'attivazione delle cellule NK tramite questa via di segnalazione può superare l'effetto inibitorio dei recettori KIR che si legano alle MHC-I. Di conseguenza, sebbene i tumori privi di MHC-I dovrebbero essere suscettibili all'uccisione mediata dalle cellule NK, la sotto regolazione o la diffusione di MICA o MICB potrebbe rappresentare un nuovo meccanismo di evasione immunitaria da parte del tumore. [7]

È stato già sottolineato in precedenza, che l'immunosoppressione indotta dal tumore richieda il rilascio di mediatori extracellulari da parte della cellula neoplastica. Un esempio chiave è rappresentato dal TGF- $\beta$  coinvolto in una vasta gamma di processi biologici, inclusi lo sviluppo, la crescita cellulare, la differenziazione, la riparazione tissutale. Inoltre, citochine come il fattore di necrosi tumorale (TNF), IL-1, IL-6, il fattore stimolante le colonie (CSF)-1, IL-8, IL-10 e gli interferoni (IFN) di tipo I possono contribuire in modo significativo alla progressione del cancro. Oltre alle citochine immunosoppressive, altri fattori, come il VEGF prodotto dai tumori, inibiscono la differenziazione delle cellule dendritiche, influenzando quindi la capacità di queste cellule di assorbire ed esporre l'antigene in modo efficace. In tal senso, anche IL-10 e TGF- $\beta$  sono note per inibire la maturazione delle cellule dendritiche che, mantenendo un fenotipo immaturo, diventano "tollerogene", non riuscendo a presentare l'antigene in modo adeguato alle cellule T. Altri fattori come i gangliosidi tumorali e l'antigene di superficie associato al cancro legante il recettore RCAS1 contribuiscono anch'essi alla progressione del tumore. Studi aggiuntivi hanno evidenziato che l'espressione di RCAS1 è associata all'apoptosi dei linfociti infiltranti il tumore (TIL). [8]

Più di recente, inoltre, è emerso un nuovo processo che potrebbe favorire l'instaurarsi della tolleranza immunitaria all'interno del microambiente tumorale per l'azione dell'enzima

immunoregolatore noto come indoleammina 2,3-diossigenasi (IDO). Questo enzima, che contiene un eme, catalizza la degradazione ossidativa dell'amminoacido triptofano, con la produzione di metaboliti noti come chinureine, determinando la deplezione di tale aminoacido, essenziale per la proliferazione dei linfociti T. A tal riguardo, è stato dimostrato che tumori, intrinsecamente immunogeni, ingegnerizzati per sovra-esprimere IDO, crescono più aggressivamente negli ospiti immunocompetenti e questa condizione è associata a una riduzione dell'accumulo dei linfociti T attivati, nella zona tumorale. Anche se i meccanismi precisi che regolano l'espressione e la funzione dell'IDO richiedono ulteriori indagini, ricerche recenti hanno indicato che tale enzima sia, indirettamente, sotto il controllo trascrizionale della proteina Bin1, la cui espressione risulta ridotta in molte tipologie di tumori umani. In definitiva, oltre IDO, anche altri enzimi come l'arginasi e l'inibitore del fattore nucleare kappa-B chinasi, IKK2, possono contribuire significativamente alla progressione del tumore agendo direttamente sulla proliferazione delle cellule tumorali o inducendo tolleranza/soppressione delle cellule T. [9]

Un'altra importante strategia di evasione immunitaria da parte del tumore è rappresentata dallo sfruttamento dei cosiddetti *checkpoint* immunologici che limitano l'azione dei linfociti T effettori. Uno tra i più studiati è quello innescato dall'antigene citotossico del linfocita T-4 (CTLA-4/CD152). CTLA-4 è una proteina situata sui linfociti T attivati, la cui interazione con il ligando B7, in competizione col recettore co-stimolatorio dei linfociti CD28, causa l'inibizione di queste cellule allorché ingaggiate nella risposta contro l'antigene. [10] Il tumore, dunque, sarebbe in grado di disarmare la risposta immunitaria limitando la co-stimolazione linfocitaria mediata da CD28 oppure esaltando l'ingaggio del CTLA-4. In quest'ultimo caso, è stato anche dimostrato che l'interazione con CTLA-4 possa indurre l'apoptosi nei linfociti T attivati evidenziando la possibilità ripristinare una normale risposta anti-tumorale attraverso il blocco di questo recettore. [11]

Analogamente, l'attivazione dell'asse rappresentato dal recettore inibitorio linfocitario PD-1 e dai suoi ligandi PD-L1 e 2, espresso dalle APC, ma eventualmente anche dalle cellule neoplastiche, gioca un ruolo cruciale nel favorire l'evasione immunitaria. Infatti, gli studi condotti sull'uso terapeutico di anticorpi monoclonali capaci di bloccare le interazioni PD-1/PD-L1 ne hanno evidenziato l'attività antitumorale immuno-mediata in diversi contesti di malattia. [12]

## 2. LE TERAPIE ONCOLOGICHE E LA SVOLTA IMMUNOTERAPICA

Nonostante i notevoli progressi, le difficoltà di guarigione sembrano essere ancora un problema molto presente. I metodi convenzionali per trattare il cancro, come chemioterapia, radioterapia e interventi chirurgici, spesso mostrano risultati limitati, evidenziando la necessità di adottare approcci terapeutici innovativi. [13] Attualmente sono state identificate cinque strategie di trattamento per il cancro. Le tre tradizionali comprendono chirurgia, radioterapia e chemioterapia classica, mentre le due più recenti includono la terapia mirata ai bersagli molecolari e l'immunoterapia. [14]

I progressi recenti nell'immunologia oncologica, infatti, hanno portato alla scoperta di nuovi approcci terapeutici per diverse forme di tumori maligni, rivoluzionando il modo in cui il cancro viene trattato. Grazie ai miglioramenti nella ricerca e nella pratica clinica delle terapie immunitarie, si è ottenuto un aumento della sopravvivenza dei pazienti con tumori metastatici che non rispondono alle terapie convenzionali. Tali trattamenti includono l'uso di differenti strategie come: a) gli inibitori dei *checkpoint* immunitari (CPI), concepiti per attivare le risposte delle cellule T; b) l'uso di anticorpi anti-TAA, che indirizzino la risposta citotossica contro il tumore; c) le terapie cellulari adottive, che implicano l'infusione di cellule immunitarie ingegnerizzate; d) i virus oncolitici, che mirano a eliminare in modo selettivo le cellule tumorali senza danneggiare quelle sane; e) i vaccini anti-cancro, che istruiscono il sistema immunitario a riconoscere e combattere il cancro; f) le terapie basate su citochine, che modulano la risposta immunitaria e gli anticorpi monoclonali. [15]

Riguardo ai CPI, questi farmaci sono oggi alla base trattamenti utilizzati per contrastare varie forme di tumore maligno, poiché agiscono interrompendo la disattivazione della risposta immunitaria operata da proteine come PD1 e CTLA-4. Tuttavia, una delle sfide principali nelle terapie basate su questi farmaci è l'identificazione di biomarcatori che possano garantire la risposta a lungo termine o prevedere la resistenza primaria o lo sviluppo di una acquisita. [16]

Gli anticorpi monoclonali anti-TAA, invece, mirano alle cellule tumorali attraverso diverse modalità, tra cui l'uccisione diretta, la distruzione immuno-mediata, la prevenzione della neo angiogenesi e la somministrazione di un farmaco citotossico alle cellule tumorali. [17]

Come evidenziato in precedenza, anche le citochine sono uno strumento sfruttato nell'immunoterapia, avendo la capacità di regolare la risposta immunitaria dell'organismo

nei confronti delle cellule tumorali, causandone anche la morte. La IL-2 è stata la prima citochina utilizzata nel trattamento del cancro, considerata la prima immunoterapia efficace nell'uomo. Nonostante ciò, il suo utilizzo è stato limitato a causa della sua tossicità e dei costi elevati. Altre citochine, come IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, TNF, TGF $\beta$ , CSF1, CCL2/3/5 e VEGF, vengono combinate con altre terapie antitumorali come i CPI, terapie con linfociti T attivati, i linfociti infiltranti del tumore (TIL), le cellule NK e la chemioterapia. Le citochine non vengono utilizzate solo direttamente, come terapia, ma sono anche fondamentali nel supporto allo sviluppo di terapie cellulari. Tuttavia, l'effetto pleiotropico delle citochine, quindi la capacità di influenzare una vasta gamma di cellule, unito al costo, alla tossicità ed a una breve durata di azione, sono ulteriori ostacoli da superare che non rendono questo approccio immunologico di prima scelta. [18]

I virus oncolitici (OV), invece, rappresentano una classe terapeutica di recentissima comparsa. I virus geneticamente modificati per essere privi di virulenza, conservano la capacità di attaccare ed eliminare le cellule tumorali nei confronti delle quali potenziano le risposte immunitarie innate e specifiche, evitando al contempo il danneggiamento di quelle sane. Nonostante i vantaggi terapeutici, l'utilizzo degli OV come strategia di trattamento antitumorale è ancora limitato. Numerosi fattori, tra cui il tropismo virale, la modalità di somministrazione, l'immunità antivirale, l'eterogeneità tumorale e il microambiente tumorale, influenzano il loro uso nelle immunoterapie. [19]

I vaccini, sono progettati per stimolare il sistema immunitario a generare una risposta antitumorale. Questo approccio terapeutico comporta l'introduzione di specifici antigeni tumorali nell'organismo del paziente, in modo tale da attivare il suo sistema immunitario adattivo e innescare una risposta contro il tumore. Gli antigeni utilizzati possono appartenere a due categorie principali: i TAA, definiti auto-antigeni perché espressi sia dalle cellule normali, in misura limitata, che dalle cellule tumorali; gli antigeni specifici del tumore (TSA), i quali possono essere espressi dal tumore a partire da oncogeni virali o per effetto di mutazioni driver che generano neo antigeni. [20] Nonostante i vaccini contro il cancro abbiano dimostrato grandi risultati nelle fasi precliniche, molti di essi hanno fallito nel contesto terapeutico, a causa dell'evasione immunitaria del tumore e dei meccanismi di fuga come la perdita di antigenicità, la riduzione di MHC-I, la presenza di un microambiente tumorale immunosoppressivo e la scarsa risposta immunitaria antitumorale. [21]

## 2.1 L'EVOLUZIONE VERSO LE TERAPIE CELLULARI

È indiscutibile che negli ultimi anni si sia assistito a un'importante svolta nel campo dell'oncologia grazie all'introduzione degli approcci terapeutici sopracitati. Questi trattamenti hanno cambiato radicalmente il panorama terapeutico per molte forme di tumori, offrendo speranza e migliorando significativamente la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti. Tuttavia, non è possibile ignorare che, nonostante i notevoli progressi compiuti, ci siano ancora molti limiti da affrontare. Le immunoterapie, pur mostrando risultati promettenti, possono anche presentare complicazioni, come reazioni avverse e resistenza tumorale. La ricerca in corso è incentrata non solo sul miglioramento degli attuali approcci immunoterapici appena affrontati, ma anche sull'identificazione di nuovi bersagli e metodologie che possano superare le limitazioni attuali.

Un'evoluzione nell'impiego terapeutico dell'IL-2, in molti casi caratterizzato da uno scarso impatto clinico, fu quello in associazione con terapie cellulari a base di linfociti T prelevati dal paziente. Nel dettaglio questi linfociti, già attivati in laboratorio, allorché reintrodotti nella circolazione del medesimo soggetto, venivano mantenuti in tale condizione tramite la co-somministrazione dell'IL-2. Tale pratica, alla base dell'approccio definito Lymphokine-Activated Killer (LAK) portava all'impiego di una popolazione policlonale di linfociti T del paziente, pertanto contenente un limitato numero di cellule realmente dirette verso l'antigene tumorale all'interno di una popolazione preponderante di cellule immunitarie dirette verso altri antigeni.

Tenuto conto di queste limitazioni responsabili di una enorme variabilità dell'efficacia da interindividuale, l'evoluzione dell'approccio cellulare fu quello di procedere con un ulteriore passaggio di selezione, al fine di scremare l'intera popolazione linfocitaria verso elementi che fossero reattivi contro un antigene tipico del tumore. Questa modifica portò alla registrazione di PROVENGE<sup>®</sup>, un farmaco innovativo poiché prodotto ogni volta specificatamente per un singolo determinato e non genericamente per tutti i soggetti con la medesima patologia. In questo caso, il soggetto veniva sottoposto a leucaferesi con la citochina ricombinante GCSF, ovvero alla mobilitazione, dal midollo verso il sangue periferico, delle cellule immunitarie mature, al fine di aumentarne la cellularità così da facilitarne la purificazione da un prelievo ematico. Il preparato veniva poi spedito all'azienda, o al laboratorio dell'azienda, per la purificazione di cellule APC e linfociti T da stimolare attraverso il *challenge* con un antigene tumorale ricombinante fuso con lo stesso

GCSF in maniera tale da determinare, da una parte, la stimolazione antigenica del linfocita T, e dall'altra, a favorire l'espansione dell'APC tramite la stimolazione del recettore per la citochina. Tale approccio era, infatti, attuato con l'intento di determinare l'attivazione ed espansione dei soli linfociti T reattivi monospecifici per quell'antigene, da trasferire poi nel paziente.

Anche in questo caso, oltre a determinarsi una condizione di elevata variabilità interindividuale nelle efficienze di preparazione (legata al numero di cellule isolate ed iniettabili), uno dei maggiori problemi evidenziati era quello di trasferire le cellule in un ambiente che, dal punto di vista immunitario, risultava ostile per l'attuarsi dei meccanismi di contro-regolazione immunitaria. Infatti, ad essere selezionati erano semplicemente dei linfociti "nativi" specifici per l'antigene che però, come tali, necessitavo *in vivo* della continua presenza di una APC complementare per esplicare un'azione immunologica. Ciò veniva confermato da un'efficacia terapeutica limitata nel tempo.

## **2.2. CAR-T: LA NUOVA FRONTIERA NELLA LOTTA CONTRO IL CANCRO**

Quando si stimola un linfocita T si instaura una sinapsi con l'APC che ha un ruolo fondamentale; questa sinapsi è basata su un complesso di recettori che si articolano tra le membrane dell'APC e il linfocita T. Il nucleo è il TCR, sul linfocita T, e l'MHC, sull'APC, con l'antigene ad ottimizzare l'interazione tra i due recettori. Nei pressi del complesso MHC-antigene-TCR, inoltre, è necessaria la presenza di una serie di recettori co-stimolatori che devono essere contemporaneamente ingaggiati perché ci sia un'efficace risposta immunologica. Tra questi troviamo in particolare i co-recettori stimolatori CD3 e CD28 il cui ingaggio è necessario per una piena e duratura attivazione del linfocita, non garantita dal solo TCR. Ciò ha una spiegazione finalistica nel preservare l'organismo da un'attivazione impropria del sistema immunitario e dunque dal rischio di una risposta autoimmunitaria.

La completa attivazione del linfocita da parte dell'antigene, dunque, richiede sì l'ingaggio del TCR, ma questo recettore è di per sé privo di un'attività di segnalazione intrinseca, necessitando di formare, a questo scopo, un complesso con CD3 e le catene  $\zeta$  (proteine integrali di membrana), anch'esse prive di attività intrinseche. Successivamente, a tale complesso si uniranno i recettori CD4 o CD8 che, oltre a stabilizzare l'interazione con l'MHC sull'APC, attivano segnali intracellulari mediate da chinasi che hanno come target le regioni denominate "immunoreceptor tyrosine-based activation motifs" (ITAM) presenti nel

contesto di CD3 $\zeta$ . Infine, questi segnali intracellulari saranno potenziati dall'accoppiamento dei recettori co-stimolatori, come CD28 e OX-40, con i corrispettivi ligandi (della famiglia di B7) espressi sulla cellula APC o sulla cellula target.

L'acquisizione di tali conoscenze ed il miglioramento delle tecniche di ricombinazione genica, costituiscono dunque il presupposto necessario ad un'ulteriore evoluzione delle terapie cellulari diretta a superare i limiti dei primi approcci descritti nel precedente paragrafo. Ciò ha portato alla messa a punto di "superlinfociti", manipolati geneticamente per aumentarne la specificità verso gli antigeni sovra espressi nei tumori in assenza del rinforzo operato naturalmente dalle cellule APC. Nel dettaglio, infatti, i linfociti T del paziente, una volta prelevati, subiscono un processo di ingegnerizzazione genetica al fine di esprimere particolari recettori antigenici, artificiali, denominati "*Chimeric antigen receptors*" (CARs), diventando delle cellule CAR-T. Il gene codificante per tali peculiari proteine chimeriche, introdotto nei linfociti impiegando dei vettori lentivirali apatogeni (in quanto derivati dall'HIV), risulta essere, infatti, un assemblaggio di regioni codificanti mutate da varie molecole coinvolte nella sinapsi immunologica. L'ottimizzazione di questo particolare recettore antigenico, ha dunque richiesto una serie di tentativi volti ad identificare, quali domini funzionali dei vari co-recettori naturali fossero indispensabili per rendere la molecola "autosufficiente" nell'attivazione antigene-dipendente del linfocita. Questo approccio prende il nome di "*adoptive T cell transfer*" (ACT), mentre la proteina CAR sarebbe il recettore in grado di racchiudere in un'unica molecola tutte le funzioni della sinapsi immunologica, a partire dalla capacità di riconoscere l'antigene fino alla capacità di stimolare in maniera massimale la risposta e l'attivazione del linfocita T in assenza di APC.

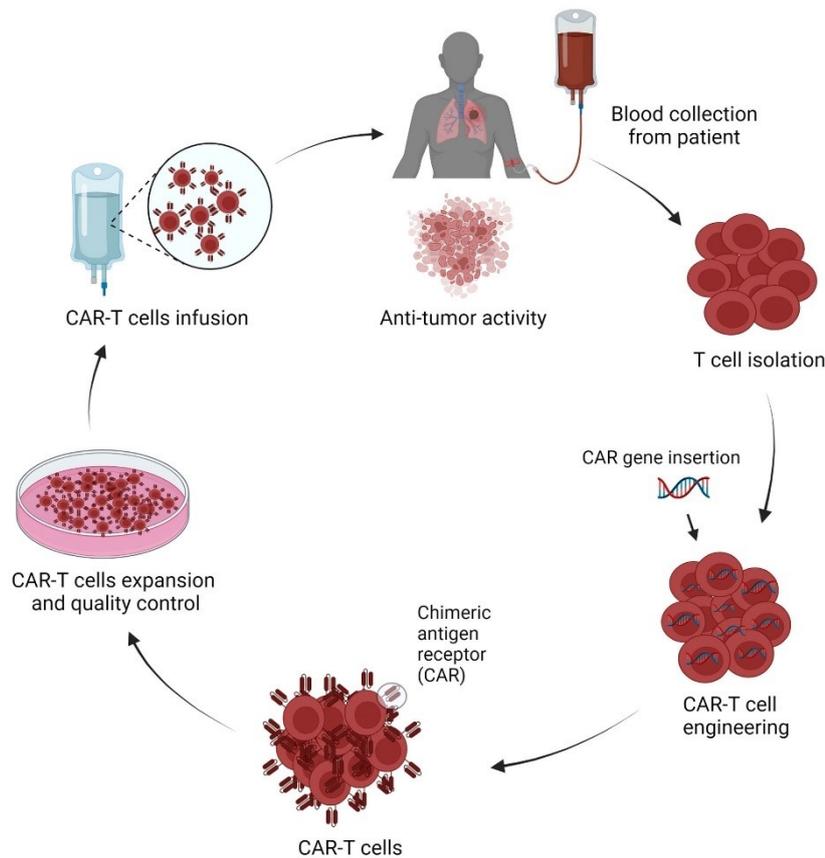


Figura 1: Rappresentazione schematica della produzione e dell'applicazione di cellule CAR-T. Kandra P, Nandigama R, Eul B, Huber M, Kobold S, Seeger W, Grimminger F, Savai R. Utility and Drawbacks of Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T) Therapy in Lung Cancer. *Front Immunol.* 2022 Jun 2; 13:903562. doi: 10.3389/fimmu.2022.903562 PMID: 35720364; PMCID: PMC9201083.

## 2.2.1 LA STRUTTURA DEL RECETTORE CAR

Le caratteristiche funzionali del recettore antigenico CAR rappresentano una sintesi tra le peculiarità degli anticorpi e quelle dei recettori e co-recettori linfocitari. A partire dall'estremità N-terminale del CAR, infatti, troviamo i domini extracellulari di derivazione anticorpale, un dominio transmembrana e i domini intracellulari di segnalazione utili all'attivazione del linfocita.

Più nello specifico, la porzione esterna, deputata all'interazione diretta con l'antigene è derivato dalle regioni variabili di un anticorpo monoclonale, collegate tra loro a formare un "frammento variabile a catena singola" (scFv). In altri termini, l'scFv è una proteina chimerica costituita dalle catene leggere (VL) e pesanti (VH) delle immunoglobine, collegate da un corto *linker* peptidico. Ovviamente, queste regioni VL e VH sono selezionate per la loro capacità di legarsi all'antigene di interesse. Il *linker* tra le due catene è costituito

da residui idrofili per conferirgli flessibilità. Come per i normali anticorpi, l'scFV è dotato di complementarità totale per l'antigene, indipendentemente dal contributo delle proteine del complesso di istocompatibilità.

Il dominio transmembrana, che favorisce la comunicazione fra le regioni extracellulari e quelle intracellulari, è generalmente mutuato dalla regione ad  $\alpha$ -elica, idrofobica, del CD28, mentre l'analoga regione del CD3 $\zeta$  non può essere impiegata per evitare la formazione di ibridi tra CAR ed il TCR nativo del linfocita T.

In fine, a determinare l'accensione dei segnali attivatori del linfocita T, la regione intracellulare del CAR risulta essere composta dalle regioni ITAM del CD3 $\zeta$  e dai domini di trasduzione di molecole co-stimolatorie come il CD28, 4-1-BB e OX-40.

Per quanto riguarda il design dei recettori, questo ha subito nel tempo notevoli cambiamenti poiché i CAR di prima generazione includevano solo il dominio CD3 $\zeta$  e non riuscivano ad attivare le cellule T a riposo né a indurre risposte durature o rilascio di citochine, a causa della bassa capacità di segnalazione. L'integrazione di ulteriori domini co-stimolatori, come CD28 o 4-1BB, nei CAR di seconda generazione, ha portato a una migliore attivazione, sopravvivenza e espansione delle cellule T modificate. I CAR di terza generazione combinano due domini co-stimolatori, come CD28 e 4-1BB mentre quelli di quarta generazione, che caratterizzano le cellule chiamate TRUCKS (cellule T reindirizzate per l'uccisione mediata da citochine universali), potenziano ulteriormente l'attività antitumorale attraverso modifiche genetiche aggiuntive. [22]. La diversa combinazione dei vari domini co-stimolatori può influenzare in molti modi la differenziazione e il metabolismo delle cellule CAR-T. Una combinazione di 4-1BB e CD3 $\zeta$ , ad esempio, favorisce la differenziazione delle cellule T della memoria centrale e migliora il metabolismo ossidativo. D'altra parte, la combinazione di CD28 e CD3 $\zeta$  favorisce la differenziazione delle cellule di memoria e la glicolisi. Sempre al fine di sfruttare al meglio le proprietà dei diversi domini co-stimolatori e migliorare l'efficacia delle cellule CAR-T, è stata sviluppata una terapia CAR-T di terza generazione che combina due domini co-stimolatori oltre a CD3 $\zeta$ . Questa combinazione può migliorare la persistenza delle cellule CAR T, la loro capacità proliferativa e l'attività antitumorale in vivo.

Nel contesto dell'immunoterapia antitumorale, le cellule CAR-T si sono dimostrate promettenti, tuttavia, diversi ostacoli limitano la loro efficacia. Una serie di fattori contribuisce al fallimento di questa terapia, che verranno discussi di seguito.

### **2.2.2 CAR-T: PROBLEMATICHE TERAPEUTICHE**

Nonostante i successi ottenuti, la terapia CAR-T ha sicuramente delle limitazioni evidenti, illustrate come qui riportato.

#### **LA SELEZIONE DEGLI ANTIGENI**

Attualmente, tutte le terapie CAR-T approvate da EMA hanno come bersaglio vari marcatori in comune tra cellule normali e quelle neoplastiche, ovvero dei TAA, dunque, il fatto che non siano al momento disponibili dei bersagli specifici per il cancro, cioè dei TSA, fa sì che questa terapia sia inefficace in varie forme di neoplasie, anche tra quelle ematologiche. Se, nel caso delle terapie CAR-T mirate contro il CD19, si è avuto un certo successo nel trattamento di forme recidivanti/resistenti di leucemia e linfoma, la mancanza di bersagli specifici rende ancor più difficile la loro applicazione nel trattamento dei tumori solidi per via di intricate interazioni con il microambiente tumorale.

#### **LA DIFFICOLTÀ DELL'INFILTRAZIONE DELLE CAR-T NEI TUMORI**

Uno dei principali problemi che si verifica dopo infusione endovenosa delle cellule terapeutiche è l'ottenimento di un'adeguata capacità di circolare nell'organismo unita quella di penetrare nel contesto del tumore con una sufficiente numerosità. Una vascolarizzazione anomala, la matrice extracellulare densa e l'espressione disregolata delle citochine possono ostacolare l'arrivo delle cellule T nei siti tumorali. Varie strategie sono state esplorate per superare questo ostacolo, ma presentano rischi, in quanto possono interferire con le funzioni fisiologiche normali.

#### **IL MICROAMBIENTE TUMORALE OSTILE**

Una volta che le cellule CAR-T entrano nell'ambiente tumorale, sono soggette a influenze immunosoppressive che ne inibiscono la funzione. Popolazioni cellulari come i macrofagi associati al tumore, le cellule Treg, le MDSC e i fibroblasti associati al tumore possono sopprimere direttamente le cellule CAR-T, riducendo la loro efficacia antitumorale. Il VEGF e altri fattori contribuiscono a questa disfunzione immunitaria.

## **LA SCOMPARSA DELL'ANTIGENE**

Dopo l'inizio dell'attività antitumorale, la perdita o la sotto regolazione dell'antigene target rappresenta un meccanismo importante di fallimento del trattamento. Pertanto, sono in corso ricerche su costrutti CAR-T che mirano a più antigeni o terapie CAR-T sequenziali per mitigare questo problema.

## **LA DIFFICOLTÀ DI ESPANSIONE E DI PERSISTENZA DELLE CAR-T**

La durata di azione delle cellule CAR-T è importante per ottenere una remissione a lungo termine, in particolare nelle neoplasie maligne che richiedono una terapia prolungata, come la leucemia linfoblastica acuta (LLA). Molto spesso, una ridotta sopravvivenza *in vivo* delle CAR-T può derivare dalla risposta immunitaria dell'organismo contro di esse. In tal caso, per limitare questa complicazione si fa abitualmente ricorso ad una chemioterapia di linfodeplezione (ad esempio con fludarabina), preparatoria all'ACT, per ridurre la risposta immunitaria, migliorando così l'amplificazione e la durata delle cellule CAR-T e, di conseguenza, l'efficacia del trattamento. Sempre nell'intento di aggirare questo tipo di problema, sono state proposte e studiate diverse strategie di allestimento dell'ACT, tra cui modifiche della struttura delle cellule CAR-T, selezione delle cellule T parentali, condizioni di coltura delle cellule T, interventi farmacologici, modifiche genetiche e metaboliche, nonché promozione dello sviluppo di un fenotipo di memoria. Nonostante ciò, dopo l'infusione, le cellule CAR-T possono esaurirsi e andare incontro a morte cellulare indotta dai ripetuti stimoli antigenici.

## **TOSSICITÀ SISTEMICA**

Nonostante un elevato tasso di risposte cliniche, questa terapia è purtroppo accompagnata anche da un alto rischio di effetti collaterali. In particolare, durante la fase acuta del trattamento, le cellule CAR-T attivate rilasciano naturalmente una grande quantità di citochine infiammatorie. Ciò è alla base di una tossicità sistemica che evolve nella “sindrome da rilascio di citochine” (CRS) caratterizzata da febbre, ipotensione, ipossia e insufficienza multiorgano. Alcuni pazienti possono anche sviluppare una “sindrome da neurotossicità associata alle cellule effettrici immunitarie” (ICANS), che induce disturbi neurologici come afasia, alterazioni dello stato mentale, tremori, convulsioni e cefalea. In alcuni casi, dopo la terapia con cellule CAR-T, può verificarsi una condizione chiamata “linfocitosi emofagocitica” (HLH) o “sindrome da attivazione macrofagica” (MAS). Questo si verifica in circa il 3,5% dei pazienti trattati con cellule CAR-T e si manifesta con febbre,

epatosplenomegalia, alterazioni della funzionalità epatica, bassi livelli di cellule del sangue e altri sintomi.

## **EFFICIENZA NEL CONTESTO DI TUMORI SOLIDI**

Attualmente, la maggioranza degli studi clinici sulle cellule CAR-T si focalizza sulle neoplasie ematologiche maligne, mentre il loro impiego nei tumori solidi non è ancora del tutto chiaro. Uno degli aspetti fondamentali da considerare attentamente è la selezione di un TSA anche se la maggior parte degli antigeni utilizzati in questa terapia è condivisa non solo dalle cellule tumorali, ma anche dalle cellule normali. Nelle neoplasie ematologiche, si è visto che il *targeting* di TAA offre la possibilità, in caso di danno a carico di popolazioni cellulari sane (ad esempio i linfociti “non leucemici”), di un rapido recupero, di conseguenza, gli effetti collaterali in questi tipi di tumori sono gestibili. Al contrario, il *targeting* di TAA nei tumori solidi può causare effetti collaterali più gravi, a causa di una ridotta capacità di rigenerazione dei tessuti solidi rispetto alle cellule ematiche. Inoltre, nel contesto dei tumori solidi, è comune riscontrare variazioni nell'espressione degli antigeni tra le diverse cellule tumorali. Per ovviare a questa eterogeneità, sono state proposte diverse strategie, come l'uso di CAR bi- o multi-specifiche, in grado di riconoscere più antigeni bersaglio, o l'introduzione di diversi CAR mirati a diversi antigeni nella stessa cellula T. Tuttavia, la tossicità *on-target* e *off-tumor* rimane una delle principali preoccupazioni in entrambi gli approcci, poiché gli antigeni tumore-specifici sono limitati. Infine, l'infiltrazione delle cellule CAR-T nel tumore e la persistenza dell'effetto citotossico rappresentano le principali sfide per l'ACT applicato al trattamento dei tumori solidi. [23]

### **3. OBIETTIVO DEL LAVORO DI TESI**

Il campo dell'oncologia ha subito una trasformazione significativa negli ultimi decenni grazie all'avvento dell'immunoterapia, che ha rivoluzionato l'approccio nel trattamento dei tumori. Il passaggio da approcci terapeutici convenzionali a immunoterapie è stato guidato dalla crescente comprensione dei meccanismi di interazione tra il sistema immunitario e le cellule tumorali, consentendo un approccio di ACT. In tale contesto, le CAR-NK, ovvero le cellule NK manipolate per esprimere un CAR, hanno assunto un ruolo di grande importanza in questa nuova era terapeutica, dimostrando un potenziale rivoluzionario nel combattere il cancro. Questa tesi si propone di esplorare l'impatto dei nuovi approcci immunoterapici basati sulle CAR-NK e di analizzare come questi si propongano di soppiantare le vecchie terapie convenzionali nel trattamento del cancro. Le CAR-NK, con la loro capacità di riconoscere e distruggere le cellule tumorali senza la necessità di un adattamento specifico, hanno suscitato un grande interesse come potenziali agenti terapeutici per una vasta gamma di tumori. Attraverso un'analisi approfondita dei dati disponibili e delle recenti scoperte scientifiche, questa tesi offre un'analisi completa delle CAR-NK soffermandosi principalmente sui motivi che hanno portato alla loro progettazione, impieghi, regimi preparatori, struttura, bersagli, aspetti applicativi, problematiche, ottimizzazioni e obiettivi futuri.

#### **4. SUPERARE LE LIMITAZIONI DELLE CAR-T: IL FUTURO DELLE TERAPIE ANTITUMORALI CON LE CAR-NK**

Le cellule NK rappresentano una popolazione particolare di cellule dell'immunità innata perché sono di origine linfoide, quindi condividono con linfociti T e B lo stesso progenitore linfoide, ma mentre i linfociti T e B sono cellule dell'immunità specifica, il cui recettore va incontro a riarrangiamento e per attivarsi ha bisogno dell'aiuto di un APC, le cellule NK esprimono dei recettori con una capacità di riconoscimento limitata, quindi hanno una diversificazione tipica delle cellule dell'immunità innata. Sono cellule già pronte a svolgere la loro funzione, ovvero uccidere l'agente patogeno che nella maggior parte dei casi è rappresentato da cellule infettate da virus o cellule stressate e quindi recepite dalle cellule NK come pericolose. Le cellule natural killer sono presenti nel sangue rappresentando lo 0.2-0.3% dei leucociti circolanti, situate anche in alcuni organi, in particolare nella milza, fegato e nelle mucose. Dal punto di vista morfologico le cellule NK assomigliano molto ai linfociti, costituite da poco citoplasma e per la maggior parte occupate dal nucleo, sono cellule piccole definite granulocitiche a causa della presenza di granuli, all'interno dei quali sono immagazzinati enzimi come la perforina e i granzimi A e B. La perforina, rilasciata mediante un processo di esocitosi, perfora la membrana plasmatica della cellula bersaglio formando un poro acquoso attraverso il quale le cellule muoiono per lisi osmotica e, sempre attraverso questi pori, le cellule NK inseriscono nella cellula bersaglio degli enzimi definiti granzima A e B che inducono le cellule bersaglio a morire per apoptosi. Le cellule NK hanno quindi un meccanismo misto poiché la perforina induce la morte per lisi osmotica e i granzimi A e B attivano la cascata della morte apoptotica. I granzimi A sono delle endonucleasi (frammentano il DNA) mentre i granzimi B attivano le caspasi effettrici. Le cellule NK partecipano all'immunità anche con un meccanismo indiretto, mediante l'eliminazione dei batteri intracellulari che sono stati internalizzati dai macrofagi ma non sono ancora stati uccisi da essi. Le NK potenziano l'azione microbica dei macrofagi che così possono uccidere i microrganismi che hanno fagocitato. Si noti come sia presente una cooperazione tra le cellule NK e i macrofagi, i quali, una volta che hanno internalizzato i microbi, iniziano a produrre interleuchina 12 che stimola le NK a produrre interferone  $\gamma$ , il quale attiva le proprietà antimicrobiche dei macrofagi che quindi uccidono i microbi fagocitati. L'attivazione delle cellule NK è regolata dal bilancio tra i segnali attivatori e inibitori ricevuti dai recettori sulla superficie. I recettori inibitori agiscono come un punto di

controllo, come un freno che la cellula NK deve superare. Questi "freni" sono presenti in molte cellule immunitarie e il significato comune è quello di prevenire un'attivazione inopportuna delle cellule immunitarie ed evitare che queste invece di essere utili siano causa di danno. I recettori attivatori sono diversi tipi di molecole accomunate dalla presenza a livello citoplasmatico del dominio ITAM, un dominio che contiene tirosine implicato nell'attivazione di tirosin-chinasi che sono responsabili all'avvio della cascata di trasduzione del segnale che avvia l'attività citotossiche delle NK. I recettori inibitori sono caratterizzati dalla presenza del dominio citoplasmatico ITIM che contiene tirosine, ma attiva delle tirosin-fosfatasi che de-fosforilano i residui di tirosina delle proteine fosforilate. Le tirosinfosfatasi agiscono spegnendo la cascata di trasduzione del segnale che dipende dalle tirosin-chinasi attivate dai recettori attivatori. A livello extracellulare i ligandi dei recettori attivatori sono vari, uno è il recettore attivatore CD16 il cui ligando è il dominio costante degli anticorpi di classe IgG, il quale riconosce cellule opsonizzate da anticorpi IgG. I recettori inibitori, invece, riconoscono molecole di MHC di classe I espresse costitutivamente da cellule sane nucleate, l'MHC I agisce come freno dell'attività delle cellule NK, ovvero queste ultime non attaccano le cellule sane perché esprimono questi segnali inibitori. Le cellule NK riconoscono ligandi espressi da cellule in condizioni normali. In questa situazione alcuni recettori attivatori delle cellule NK legano dei ligandi che possono essere espressi dalle cellule normali, tuttavia le cellule esprimono anche le molecole di MHC I che vengono riconosciute dai recettori inibitori. Se la cellula è sana il rapporto tra i segnali inibitori e attivatori si bilancia e la cellula NK non si attiva perché le tirosinchinasi attivate dal dominio ITAM vengono sufficientemente inattivate dalle tirosin-fosfatasi attivate dai recettori inibitori (che attivando le tirosin-fosfatasi rimuovono i gruppi fosfato dalle tirosin-chinasi e bloccano la cascata di trasduzione del segnale responsabile dell'attivazione delle cellule NK). La cellula NK si attiva quando l'equilibrio risulta alterato, ovvero quando le cellule bersaglio non esprimono le molecole che ingaggiano i recettori inibitori. In alcune cellule tumorali a volte, per sfuggire alla sorveglianza immunitaria viene bloccata l'espressione di MHC I, quindi viene tolto il freno alle cellule NK e queste cellule diventano suscettibili alla loro azione. In una seconda situazione la cellula che incontra la cellula NK esprime livelli elevati di ligandi per i recettori attivatori, ovvero ligandi associati a stress e a danno; questi ligandi ingaggiano un numero superiore di recettori attivatori nella cellula NK. Vengono attivate così tante protein-chinasi che le protein-fosfatasi attivate dai recettori inibitori non riescono a de-fosforilare in modo efficiente le tirosin-chinasi e quindi non riescono a bloccare la

cascata di attivazione che dipende dai recettori attivatori. Le cellule NK sono importanti nelle difese, ma anche in ambito oncologico perché riconoscono e uccidono le cellule tumorali.

Uno dei principali motivi che ha spinto la ricerca ad individuare nuovi approcci terapeutici è la possibilità che le cellule CAR NK, a differenza delle cellule CAR T, possano essere ottenute da donatori di qualsiasi origine, rendendo la terapia facilmente accessibile. Di contro la terapia con CAR-T è limitata dall'alloreattività, dalla neurotossicità e dalla sindrome del trapianto contro l'ospite (GVHD), a causa dell'utilizzo di cellule T autologhe. Purtroppo, i pazienti candidati alla terapia CAR-T spesso presentavano un basso numero di cellule T nel sangue periferico a causa dei trattamenti pregressi, rendendo difficile la raccolta di una quantità sufficiente di cellule T autologhe per la produzione del costrutto CAR. Si è potuto riscontrare, infatti, come fosse difficile raccogliere un numero adeguato di cellule per la produzione di CAR-T, in particolare, uno studio ha evidenziato come il 22,5% dei pazienti non sia riuscito a raggiungere il numero target di cellule T CD3+ necessarie. Il complicato e lungo processo di produzione delle CAR-T può rendere molti pazienti non idonei al trattamento o portare a una progressione della malattia dopo essere stati arruolati specialmente a causa dei lunghi tempi di attesa. Al contrario, le cellule NK non necessitano l'utilizzo di cellule autologhe per la produzione di terapie CAR NK, poiché non sono attivate attraverso la via MHC, presentando un rischio ridotto di alloreattività. Di conseguenza, uno dei principali benefici della terapia con CAR NK è la capacità di produrre cellule pronte all'uso tramite produzione su larga scala (*off the shelf*) e di infonderle ai pazienti in qualsiasi momento, senza la necessità di attendere la raccolta di cellule autologhe. [24].

Il secondo beneficio che si può riscontrare attraverso l'utilizzo della terapia con CAR NK, è una considerevole diminuzione della neurotossicità seguita da un calo di citochine. Si è potuto notare che l'attivazione delle cellule CAR T provoca una liberazione di citochine infiammatorie, responsabili della CRS e della neurotossicità. Come evidenziato in uno studio di fase I con tisagenlecleucel nella leucemia linfoblastica acuta (LLA), si è visto che l'85% dei pazienti ha sviluppato CRS e un 26% ha sperimentato una tossicità di grado 3 o superiore, mentre il 41,5% ha avuto neurotossicità di grado 3 o superiore, fenomeno verificatosi anche in altre terapie CAR-T. D'altra parte, l'utilizzo di un costrutto CAR-NK anti-CD19 non corrispondente all'HLA, derivato dal sangue del cordone ombelicale, ha avuto un riscontro positivo, inquanto nessuno dei pazienti trattati nello studio ha sviluppato gli effetti collaterali

tipici del trattamento con i linfociti T. [25] Questa differenza di tossicità tra le cellule CAR-T e NK potrebbe essere dovuta alla diversità delle citochine rilasciate durante l'attivazione cellulare. Le cellule CAR T, rilasciano citochine infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale alfa, IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6, mentre i pazienti trattati con terapia CAR NK non mostrano un aumento significativo di queste citochine infiammatorie, al contrario, esse rilasciano il fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF), citochina differente che sfavorisce la sindrome da rilascio di citochine. [26]

Ulteriore beneficio che caratterizza le cellule NK è il fatto che presentano diversi meccanismi per individuare ed eliminare le cellule tumorali. In particolare, le cellule NK svolgono un ruolo cruciale nella citotossicità mediata dagli anticorpi, tramite il recettore CD16 presente sulla loro superficie, il quale consente loro di riconoscere la porzione Fc degli anticorpi IgG legata alle cellule tumorali e di distruggerle.

Come precedentemente trattato, le cellule NK possono essere attivate al fine di eliminare le cellule tumorali. Tale processo conferisce alle cellule NK di riconoscere cellule aventi un MHC basso o assente da parte di recettori killer delle immunoglobuline, definiti KIR. Essi possono essere attivanti o inibitori a seconda della loro coda citoplasmatica, la quale è caratterizzata da un motivo inibitorio basato sulla tirosina immuno recettoriale inibente (ITIM) e attivante (ITAM). Le cellule NK sfruttano il recettore KIR inibitorio per garantire la normale espressione di HLA sulle cellule sane. Le cellule tumorali e le cellule sottoposte a stress possono modulare l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I) e dei recettori KIR inibitori, o sovra esprimere molecole indotte dallo stress come MICA/MICB (proteina A/B correlata alla catena MHC di classe I), per attivare i recettori KIR, promuovendo così l'attivazione delle cellule NK per eliminare le cellule bersaglio. Le cellule NK, inoltre, hanno una durata di vita di circa 2 settimane, per questo motivo, qualora si dovesse presentare tossicità off-tumor on-target, è possibile sfruttarne la loro autoeliminazione. [27].

#### **4.1. RECETTORI DELLE CELLULE NATURAL KILLER**

Il processo di attivazione delle cellule Natural Killer rappresenta il risultato di una complessa interazione multifattoriale che coinvolge numerosi recettori, sia inibitori che attivanti, ciascuno caratterizzato da differenti soglie di attivazione. L'autorizzazione delle cellule NK nel rispondere in modo efficace alle cellule bersaglio avviene mediante le interazioni tra i

ligandi MHC presenti sulle cellule sane e i recettori nelle cellule NK umane. Questa interazione è essenziale per regolare e potenziare la risposta delle cellule NK contro le cellule bersaglio, contribuendo così alla funzione immunologica.

È necessario soffermarsi sulla netta differenza che caratterizza le cellule NK autorizzate e non, in quanto le prime utilizzano la glicolisi nelle vie metaboliche per sostenere l'attivazione, mentre le seconde sfruttano l'energia prodotta attraverso la fosforilazione ossidativa. Entrambe possono essere modificate per diventare effettori immunitari.

I recettori attivatori non hanno tutti la stessa potenza e la forza di trasmissione del segnale viene condizionata dall'ambiente citochinico. Alcuni recettori KIR attivatori possono anche legarsi alle molecole HLA, ma con una minore affinità rispetto ai recettori KIR inibitori. I geni del locus KIR possono essere disposti in alotipi KIR B, che includono uno o più geni KIR attivatori, o in alotipi KIR A, che contengono principalmente geni KIR inibitori e una forma attivante definita KIR2DL4 e KIR2DS4. Si è evidenziato attraverso un'analisi di trapianti di cellule staminali ematopoietiche da donatori non imparentati, somministrata a soggetti affetti da leucemia mieloide acuta (LMA), che i donatori aventi alotipo KIR B, erano più protetti dalle recidive.

Ulteriore recettore attivante è NKG2D il quale lega i ligandi sovra-regolati dallo stress cellulare come MICA e MICB anche se può risultare ridotto sulle cellule NK di pazienti con tumori digestivi, leucemia linfatica cronica (CLL), cancro al seno, virus dell'epatite B cronica e virus dell'epatite C. Si ritiene che possa aiutare ad eludere il riconoscimento delle cellule NK. L'attivazione della metalloproteasi ADAM17 che causa la liberazione dei ligandi di superficie MICA/B rappresenta un'altra strategia per evitare il riconoscimento da parte delle cellule NK. Proprio per questo motivo si sono riscontrati alti livelli di MICA nel MM. Per evitare la liberazione dei ligandi di superficie è possibile sfruttare l'azione di antagonisti di ADAM17, i quali possono migliorare le funzioni delle cellule NK.

Altra molecola appartenente ai recettori fondamentali delle NK è il CD94 caratterizzato dalla capacità di formare eterodimeri con NKG2A o NKG2C. Entrambi i complessi che si formano sono in grado di identificare la molecola HLA-E non classica, la quale spesso è sovra regolata in cellule neoplastiche per mediare l'inibizione delle cellule NK. Il segnale trasmesso tramite NKG2A ha un effetto inibitorio, mentre quello tramite NKG2C attiva la funzione delle cellule NK mediante il legame con DAP12. Le cellule NK che esprimono

NKG2C svolgono un ruolo significativo nelle infezioni virali umane e possono essere sfruttate per potenziare l'attività citotossica contro i tumori che esprimono l'antigene HLA-E. [28]

Negli anni '80 attraverso l'utilizzo di cellule NK attivate mediante la linfocina (LAK), è stato possibile constatare per la prima volta un possibile impiego delle cellule NK a fini terapeutici. Questa tecnica consisteva nell'utilizzo di alte dosi di interleuchina 2 (IL-2) per espandere in ex vivo una miscela autologa di cellule T e NK in pazienti affetti da tumori solidi refrattari e metastatici. Il campo della terapia con le cellule NK ha ricevuto uno stimolo significativo grazie a una scoperta clinica di Ruggeri et al., che ha evidenziato un effetto protettivo delle cellule NK in un contesto di trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT) da donatore aploidentico selezionato CD34 privo di cellule T. In questo contesto, le cellule NK hanno dimostrato di ridurre le recidive di leucemia mieloide acuta (LMA) in presenza di una dissociazione KIR/HLA tra donatore e ricevente, senza aumentare il rischio di malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD). Questa osservazione ha stimolato ulteriori ricerche che hanno approfondito l'analisi di sicurezza ed efficacia dell'infusione di cellule NK dopo il trapianto allogenico e autologo per migliorare le risposte terapeutiche, oltre a promuovere ricerche che esplorano il trasferimento adottivo di cellule NK. [29]

## 4.2. FONTI DI CELLULE NK ALLOGENICHE PER LA TERAPIA DEL CANCRO

L'utilizzo di diverse fonti di cellule NK allogeniche per la terapia CAR-NK offre vantaggi significativi in termini di efficacia e sicurezza. Nel dettaglio è importante riconoscere alle cellule nk la capacità di ridurre il rischio di rigetto. Utilizzare fonti diverse può risultare utile nel selezionare cellule con compatibilità HLA (*Human Leukocyte Antigen*) adeguata, riducendo il rischio di rigetto immunitario e la probabilità di sviluppare la malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD). Altresì avere diverse fonti di cellule NK aumenterebbe la disponibilità di questo trattamento, garantendo ai pazienti sufficienti risorse per la terapia. Inoltre le fonti possono essere selezionate e modificate per adattarsi meglio alle esigenze specifiche di ciascun paziente, rendendo la terapia individuale.

Ci sono varie fonti utilizzate per ottenere le cellule NK al fine di impiegarle nella produzione delle CAR-NK. Le principali comprendono:

- Cellule NK prelevate da sangue periferico di donatori HLA-aploidentici
- Cellule NK aploidentiche espanse attraverso citochine (CIML)
- Cellule ematopoietiche
- Cellule prelevate dal cordone ombelicale (UCB)
- Cellule staminali pluripotenti indotte (IPSC)
- Linee cellulari immortalizzate

In passato, il sangue periferico prelevato da donatori HLA-aploidentici, di solito fratelli o figli di un paziente, rappresentava la fonte più comune di cellule NK utilizzate. L'uso frequente di questa fonte era dato dal fatto che la corrispondenza parziale dell'HLA diminuiva il rischio di rigetto. Nel 2005, uno studio clinico intrapreso dall'Università del Minnesota ha dimostrato la sicurezza e l'assenza di tossicità, insieme ad una breve persistenza delle cellule NK nel sangue ed a una validità terapeutica nel trattamento della leucemia mieloide acuta. Lo studio consisteva in un trasferimento di cellule NK aploidentiche in pazienti con cancro refrattario, seguito dalla somministrazione di IL-2 senza ricorrere al trapianto. Le cellule NK sono state prelevate da donatori aploidentici HLA di classe I, successivamente CD3 depletate con il dispositivo CliniMacs di grado GMP, incubate con IL-2 ad alte dosi durante la notte e infuse nei pazienti per aumentare la dose. Approccio successivo fu quello di combinare le cellule NK di donatori aploidentici con rituximab/IL-2 e somministrarle a pazienti con linfoma non Hodgkin refrattario. Sebbene

l'efficacia del trattamento risultò modesto (27%), le cellule NK circolanti del donatore vennero rilevate fino a 20 giorni dopo l'infusione. Ulteriore strategia fu quella di espandere attraverso citochine le NK (CIML) dimostrando un aumento nella produzione di interferone  $\gamma$  e nell'attività citotossica contro la leucemia in vitro. In uno studio di fase 1 condotto su pazienti affetti da leucemia mieloide acuta, il trasferimento adottivo di cellule NK a memoria ha dimostrato un'efficacia clinica evidenziata da quattro remissioni complete su nove pazienti trattati. Le cellule NK a memoria hanno dimostrato un'ampia proliferazione e sono rimaste rilevabili nel sangue per settimane. Negli otto giorni successivi all'infusione si è potuto constatare una significativa crescita di cellule NK a memoria del donatore con produzione di interferone gamma.

Tra i principali limiti nell'uso del sangue periferico si includono la quantità limitata di cellule ottenute dal prodotto aferetico, la presenza di una miscela cellulare eterogenea e il cambiamento di funzionalità delle NK. Uno dei principali approcci per evitare la malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD) è la deplezione dei linfociti CD3, la quale elimina definitivamente le cellule T. Inoltre per un miglioramento della purezza delle cellule, è importante attuare una selezione per il marcatore CD56 anche se può ridurre ulteriormente la quantità di cellule disponibili. Un recente studio di fase I che ha somministrato cellule NK aploidentiche HLA come parte del regime preparatorio per il trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche per neoplasie mieloidi ad alto rischio, ha evidenziato l'importanza critica della dose di cellule NK CD56 infuse, trovando un'associazione significativa con la sopravvivenza complessiva dei pazienti.

Un'ulteriore strategia utilizzata per potenziare la quantità delle cellule NK, vede l'uso di citochine come IL-2 e IL-15 per espandere le cellule NK aploidentiche nel sangue periferico al fine di effettuare infusioni multiple nei giorni successivi al trapianto autologo. Tuttavia, i risultati clinici sono stati insoddisfacenti, presumibilmente a causa della diminuzione delle cellule NK che si verifica dopo una prolungata coltura in vitro con IL-15 e IL-2 o a causa di una breve persistenza in vivo.

In un altro studio, per trattare pazienti affetti da linfoma avanzato o tumori solidi si è ricorso all'utilizzo dell'IL-2 per espandere ex vivo le cellule NK prelevate da donatori non legati da parentela. Sebbene si sia riscontrata un'incrementata sopravvivenza libera da progressione (PFS) nei pazienti che hanno ricevuto cellule NK non corrispondenti per KIR, l'efficacia clinica è stata limitata e la durata delle NK è stata breve (tra 1 e 4 giorni), probabilmente a

causa dell'assenza di chemioterapia linfodepletiva prima dell'infusione di NK. L'emergere di queste limitazioni ha favorito la ricerca di nuove fonti alternative per ottenere cellule NK più performanti.

Tecnica utilizzata per ampliare in vitro le cellule NK vede il coinvolgimento di cellule di supporto irradiate, come le cellule feeder della linea cellulare eritroleucemica K562. Quest'ultime possono subire delle variazioni per esprimere citochine come IL-15 e IL-21 e molecole co-stimolatorie come 4-1BBL. Si è potuto constatare attraverso studi in vitro che, a differenza dell'IL-15, le NK trattate con IL-21 riuscivano a mantenere la loro funzionalità e la loro efficacia. Questi risultati indicano che le cellule NK si esauriscono in base al contesto a cui sono soggette e per questo motivo sono stati creati metodi di espansione che non richiedono l'uso di cellule feeder, ad esempio utilizzando particelle ottenute dalle membrane delle cellule K562. Queste particelle mantengono l'attivazione delle cellule T attraverso l'espressione di molecole come 4-1BBL e IL-21.

Varie fonti utilizzate per ottenere le cellule NK comprendono l'uso di cellule ematopoietiche. Recentemente si è scoperta la capacità della nicotinammide (NAM), inibitore allosterico delle vie metaboliche dipendenti dal NAD, di espandere le cellule ematopoietiche, in particolare le cellule NK derivate dal sangue. Il risultato con l'impiego della nicotinammide ha generato un prodotto denominato GDA-201, caratterizzato dall'espressione di CD16, un effetto citotossico conservato, produzione di citochine e resistenza allo stress ossidativo. Attraverso questa tipologia di fonte per espandere le cellule NK si è rilevato una maggior persistenza di queste cellule per circa 7-14 giorni nonché un'efficacia clinica promettente nei pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin a cellule B.

Il prelievo di cellule NK derivate dal sangue del cordone ombelicale (UCB) è una fonte molto utilizzata soprattutto perché ha il vantaggio di consentire il mismatching KIR/HLA. Il termine "*mismatching*" si riferisce ad una situazione in cui i recettori KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptor*) presenti sulle cellule NK non sono accoppiati con gli antigeni HLA presenti sulle cellule bersaglio. L'antigene leucocitario umano (HLA) è una proteina presente sulla superficie delle cellule implicate nel riconoscere il "*self*" e nel controllo delle risposte immunitarie. Le cellule NK esprimono recettori KIR che interagiscono con queste proteine sulle cellule bersaglio. Un mismatching tra KIR e HLA può verificarsi quando le cellule NK riconoscono cellule che esprimono HLA diversi da quelli con cui i recettori KIR si accoppiano normalmente. Si è osservato che alcune cellule NK derivate da UCB sono

state ingegnerizzate per esprimere un recettore chimerico dell'antigene (CAR) specifico per il CD19, antigene di superficie comune nelle cellule B, in particolare nelle cellule B maligne. Queste cellule NK CD19-CAR hanno mostrato un'efficacia promettente in uno studio di fase 1 e 2 contro i linfomi che esprimono questo antigene, in particolare non hanno mostrato CRS, neurotossicità e GVHD, persistendo fino a 12 mesi dopo infusione. Attraverso diversi studi è stato riscontrato un tasso di risposta del 73% su 11 pazienti arruolati con LLC e NHL trattati con una singola dose. Uno dei principali limiti che caratterizza l'uso di cellule NK derivate dal sangue del cordone ombelicale è il piccolo volume di UCB per unità. Per questo motivo, un altro metodo per generare cellule NK sempre utilizzando sangue del cordone ombelicale prevede la differenziazione di cellule staminali ematopoietiche CD34 con un sistema di coltura basato su citochine. Questa tecnica è stata successivamente confrontata con le cellule NK derivate da espansione con citochine; le cellule espanse hanno mostrato una maggiore espressione di KIR e una maggiore citotossicità contro le linee cellulari tumorali. Le cellule NK isolate da UCB e successivamente espanse sono state confrontate con le cellule NK derivate da cellule staminali mostrando una maggiore espressione di KIR e una maggiore citotossicità contro le linee cellulari tumorali.

Le cellule NK possono derivare anche dalle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), le quali hanno la capacità di trasformarsi in varie tipologie di cellule mature provenienti dai tre strati germinativi, incluse le cellule NK. Questo approccio offre la possibilità di effettuare modifiche genetiche complesse e di produrre potenzialmente cellule NK con un'efficacia migliore. Anche se i protocolli attuali richiedono da 4 a 6 settimane per espandere le cellule NK mature dalle iPSC, il prodotto cellulare risultante può essere congelato e reso disponibile "pronto all'uso" in grandi quantità per un utilizzo ripetuto.

Ultima tecnica per aumentare il numero di cellule NK citotossiche consiste nell'utilizzare una linea cellulare clonale immortalizzata derivata da un paziente affetto da linfoma a cellule NK. Tuttavia, sono state create poche linee cellulari clonali a causa della difficoltà di sviluppo e della rarità della malattia. Queste linee cellulari sono principalmente composte da cellule NK "pure", che proliferano facilmente in coltura, con un tempo di raddoppio di 2-4 giorni, rendendole adatte per somministrazioni ripetute ai pazienti secondo un regime flessibile. Tuttavia, si è scoperto che l'unica linea cellulare in grado di dimostrare una citotossicità elevata è rappresentata dalla linea cellulare NK-92 che è l'unica linea cellulare altamente dannosa per i bersagli tumorali. Le cellule NK-92 hanno subito un ampio sviluppo

preclinico e sono state sottoposte a studi di fase I in pazienti oncologici. Una delle principali differenze rispetto alle cellule NK prelevate dal sangue periferico è che le cellule NK-92 possono essere facilmente modificate geneticamente con metodologie di trasfezione non virale per esprimere recettori o ligandi specifici, permettendo il loro indirizzamento selettivo verso le cellule maligne. [30]

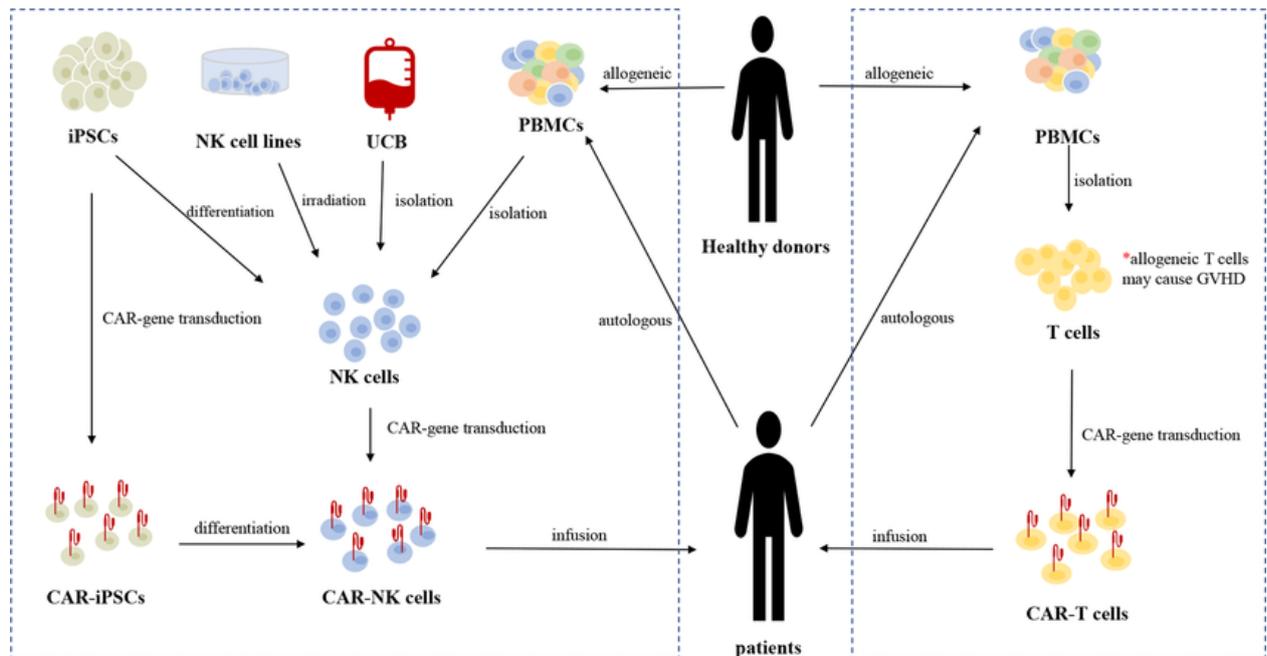


Figura 2: Le fonti e il processo di produzione delle celle CAR-NK e delle cellule CAR-T, rispettivamente. Lu H, Zhao X, Li Z, Hu Y, Wang H. From CAR-T Cells to CAR-NK Cells: A Developing Immunotherapy Method for Hematological Malignancies. *Front Oncol.* 2021 Aug 6; 11:720501. doi: 10.3389/fonc.2021.720501. PMID: 34422667; PMCID: PMC8377427.

### 4.3. REGIMI PREPARATORI DI LINFODEPLEZIONE

La linfodeplezione associata alle CAR-NK è una tecnica che consiste nella riduzione selettiva delle cellule del sistema immunitario, in particolare dei linfociti T, che riconoscono le molecole HLA non-self sulle cellule NK allogeniche. Lo scopo principale è quello di aumentare l'efficacia delle cellule NK, attraverso la riduzione dei linfociti T, in modo tale da permettere alle NK di agire in un ambiente meno competitivo. La linfodeplezione può anche ridurre una risposta immunitaria contro le cellule CAR-NK stesse, che altrimenti potrebbero essere riconosciute ed eliminate dal sistema immunitario del paziente. Inoltre

questa tecnica è in grado di prevenire la malattia del trapianto contro l'ospite, una complicanza potenzialmente grave dei trapianti di cellule CAR-NK, in cui le cellule trapiantate attaccano i tessuti sani dell'ospite. Come menzionato in precedenza l'obiettivo della chemioterapia linfodepletiva è duplice. Da una parte si cerca di ottenere una eliminazione delle cellule T dell'ospite che rigettano le cellule NK allogene in base al *mismatch* HLA e dall'altra si vuole indurre la produzione di citochine endogene IL-15 e IL-7 che promuovono l'espansione dei linfociti infusi. Particolarmente rilevanti sono i farmaci linfodeplenti, i quali diminuiscono le popolazioni cellulari che producono citochine e/o hanno proprietà immunosoppressive, come le Treg e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC), in modo tale da favorire un microambiente più idoneo per l'espansione delle cellule adottive. Ciclofosfamide e fludarabina sono i principali farmaci impiegati per ottenere l'espansione delle cellule NK. Dopo il trattamento di linfodeplezione, si è potuto notare un aumento significativo dell'IL-15 endogena, la quale, oltre a favorire la diffusione delle cellule NK in vivo, insieme all'IL-7, è essenziale per la proliferazione omeostatica delle cellule T, che si verifica dopo una grave deplezione di quest'ultime. Quindi, IL-15 potrebbe anche essere coinvolta nel rigetto delle cellule T CD8. Il farmaco N-803 super agonista dell'IL-15, ha dimostrato di ridurre le risposte cliniche nei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (LMA) trattati con cellule natural killer (NK) aploidentiche ML-NK, poiché può stimolare eccessivamente i linfociti T CD8. Un'altra opzione potrebbe essere rappresentata dall'utilizzo di costrutti CAR bicistronici contenenti citochine, che permettono una secrezione autocrina di IL-15 e potrebbero offrire una soluzione più efficace. È stato osservato che le cellule NK CD19-CAR derivanti da cordone ombelicale (UCB) e che esprimono IL-15 sono rilevabili in malattie come il linfoma non-Hodgkin o nella leucemia a cellule B croniche (LLC), nonostante la mancanza di compatibilità HLA. Purtroppo, una metodologia efficace che permetta di creare un ambiente citochinico favorevole, che possa migliorare la persistenza delle cellule NK riducendo al minimo il rischio di rigetto mediato dalle cellule T, deve ancora essere determinato. Si è verificato che anche con successive infusioni di cellule NK non si è riusciti a risolvere completamente questo problema, poiché la persistenza delle cellule NK dopo una seconda infusione risulta essere ancora più breve, suggerendo una risposta immunitaria da parte dell'ospite più rapida. Studi recenti hanno dimostrato che un ambiente immuno-compatibile creato nel periodo post-trapianto di cellule ematopoietiche può migliorare la persistenza delle cellule NK a lungo termine, grazie alla

corrispondenza delle cellule NK infuse con i linfociti trapiantati e all'assenza di cellule T ospite che possano attaccarle.

#### **4.4. STRUTTURA E INGEGNERIZZAZIONE CAR-NK**

La formazione e la progettazione del costrutto CAR rappresenta un punto fondamentale al fine di ottenere, attraverso meccanismi di ingegnerizzazione molecolare, una metodologia efficace. Come già spiegato in precedenza il CAR si compone di 3 parti fondamentali: l'ectodominio, la regione transmembrana e l'endodominio. L'ectodominio è formato da un peptide segnale, scFv che rappresenta la variante a frammento a catena singola, con un linker che unisce le due catene pesante e leggera e una regione cerniera che collega questa struttura alla regione transmembrana. Quest'ultima componente è essenziale poiché ha il compito di agganciare la molecola CAR alla membrana cellulare e, inoltre, si collega all'endodominio che comprende i segnali di attivazione.

##### **4.4.1. SPINA DORSALE E PROMOTORE VETTORIALE**

La struttura vettoriale racchiude tutti gli elementi necessari per l'espressione della CAR come il promotore, il segnale della poliadenina e i frammenti di regolazione trascrizionale. Questa componente è implicata nel trasportare il transgene facilitandone l'inserimento nella cellula effettrice. Con il termine promotore ci si riferisce ad una sequenza di DNA che regola l'espressione del gene che codifica per il recettore chimerico dell'antigene (CAR). Il compito principale del promotore consiste nell'attivare la trascrizione del gene CAR e quindi nell'espressione della proteina CAR sulla superficie delle cellule NK. Nella costruzione di CAR-NK, vengono utilizzati diversi tipi di promotori, ognuno con caratteristiche specifiche. Ad esempio, i promotori virali come il citomegalovirus (CMV) o il virus della leucemia murina (MMLV) generalmente si prediligono per la loro espressione ampia del gene CAR mentre promotori come EF1 $\alpha$  (Elongation Factor 1 alpha) o PGK (fosfoglicerato chinasi), definiti costitutivamente attivi, possono essere utilizzati per garantire un'espressione più costante del gene CAR indipendentemente dal tipo cellulare ospite o dalle condizioni ambientali. È stata evidenziata l'importanza della scelta del promotore in base alla sua dimensione e dal fatto che esso abbia una influenza diretta sui livelli di espressione del transgene. Inoltre, la dimensione del promotore influenza l'efficienza di trasduzione virale e la successiva espressione di GFP. I geni CAR vengono solitamente introdotti utilizzando plasmidi virali con un promotore esogeno. Diversi paragoni sono stati condotti per valutare

l'impatto di diversi promotori sui livelli di espressione della CAR. Un'indagine ha rivelato che il promotore EF1 $\alpha$  ha determinato livelli di espressione della CAR più elevati rispetto ad altre tipologie di promotori come CMV (citomegalovirus), UbiC e PGK (fosfoglicerato chinasi). In un altro studio, invece, è emerso che il promotore MSCV ha superato EF1 $\alpha$  e PGK risultando molto più stabile e performante. Tuttavia, va sottolineato che l'efficacia del promotore potrebbe essere influenzata anche dalla sequenza scFv associata. Attraverso queste considerazioni è emerso che è essenziale individuare il promotore più adatto per un determinato costrutto, tenendo conto anche degli elementi aggiuntivi che possono condizionare i livelli di espressione e il tipo di vettore virale. Infatti, la scelta del promotore può impattare direttamente sul titolo virale, come dimostrato da uno studio che ha riscontrato titoli virali più elevati utilizzando la sequenza del promotore CMV all'interno di un vettore lentivirale SIN 5' LTR rispetto alle sequenze RSV (virus del sarcoma di Rous). Oltre alla semplice espressione basale della CAR nella cellula immunitaria, è essenziale considerare dinamiche come l'ubiquitinazione, la down-regulation e la cinetica di ri-espressione, che possono avere un notevole impatto sull'efficienza delle cellule CAR a seguito dell'esposizione all'antigene. Le informazioni recenti sulle cellule CAR-NK illustrano una vasta gamma di promotori impiegati per regolare l'espressione di CAR, sia per le cellule NK derivate da linee cellulari sia per quelle primarie. In entrambi i casi, si è potuto constatare come i promotori virali (come CMV, MPSV, MMLV, SFFV, ecc.) siano migliori per generare le CAR-NK rispetto ai promotori costitutivamente attivi, come EF1 $\alpha$ , CMV e PGK.

#### **4.4.2. IL PEPTIDE SEGNALE**

La sequenza del recettore chimerico dell'antigene (CAR) è costituita inizialmente con un breve peptide segnale (SP), che è una sequenza di peptidi situata all'estremità N-terminale delle proteine. La funzione principale di questi peptidi è quella di fornire le istruzioni per il corretto assemblaggio post-traduzionale delle proteine nel reticolo endoplasmatico (ER) e nell'organello di Golgi, nonché per l'espressione sulla membrana cellulare. La struttura finale sarà una proteina transmembrana di tipo I che si legherà sulla membrana cellulare. Nei processi cellulari eucariotici, i peptidi segnale situati all'estremità N-terminale delle proteine nascenti vengono riconosciuti dalla particella di riconoscimento del segnale (SRP) mentre la proteina è ancora in fase di traduzione nel ribosoma. Successivamente, una peptidasi peptidica specifica del peptide segnale (SPP) taglia il peptide segnale dopo che la proteina nascente ha attraversato la membrana del reticolo endoplasmatico, consentendo così

l'assemblaggio e il ripiegamento della proteina. Anche per quanto riguarda i peptidi segnale sono state riscontrate notevoli diversità, che influiscono direttamente sui diversi livelli di efficienza della secrezione proteica. Attualmente, la sequenza del peptide segnale CD8a è la più utilizzata per le cellule NK primarie, mentre per le linee cellulari NK la sequenza del peptide segnale delle immunoglobuline a catena pesante o leggera è più diffusa.

#### **4.4.3. VARIANTE A FRAMMENTO A CATENA SINGOLA (SCFV)**

scFv è una proteina che rappresenta il dominio di legame dell'antigene tumorale per le CAR, il cui compito è quello di fondere le regioni variabili della catena pesante e leggera di un anticorpo. Una delle principali caratteristiche di questa componente è il fatto che varie tipologie di scFv siano in grado di legarsi a differenti epitopi sulla stessa proteina, determinando così sia la specificità che la funzionalità della cellula CAR-NK. Un tipico esempio è rappresentato dallo sviluppo di diverse varianti di scFv per mirare alla mucina 1 (MUC1), proteina glicosilata ampiamente presente, anche se queste differenze possono portare ad effetti collaterali distinti, come il legame a tessuti normali. Pertanto, è essenziale selezionare attentamente il bersaglio per una CAR affinché sia specifico per l'antigene tumorale, evitando al contempo il riconoscimento di auto-antigeni che potrebbero causare gravi effetti collaterali.

Tuttavia, risulta molto complesso individuare un bersaglio adeguato sui tumori solidi. Uno dei principali motivi è in gran parte dovuto al fatto che l'espressione della maggior parte degli antigeni associati al tumore (TAA) sia sui tumori stessi che nei tessuti sani. Essendo che l'scFv non rappresenta una forma naturale di anticorpo, la sua sintesi avviene sempre artificialmente, determinando così l'ordine della catena pesante e leggera. Fino ad ora, la maggior parte dei ricercatori ha preferito un orientamento VH-VL per le CAR-NK. È stato evidenziato come la specificità dell'antigene e costante di associazione in una CAR possono risultare inferiori rispetto al loro anticorpo originale, principalmente a causa della mutata connettività dei domini VL e VH. Attraverso una elaborazione assistita tramite computer, è stato possibile analizzare la sequenza amminoacidica della regione CDR del VH e del VL, predicendo l'interazione dello scFv con il suo bersaglio. È da evidenziare come un mescolamento delle catene VH e VL di diversi anticorpi contro lo stesso epitopo possa portare ad un aumento dell'affinità della CAR.

La quasi totalità degli attuali studi clinici riguardanti le cellule CAR T hanno utilizzato frammenti singoli di anticorpi (scFv) derivati da topi, aumentando il rischio di una reazione immunitaria dell'ospite contro il trapianto, con il risultato di tossicità e/o diminuzione della persistenza delle cellule portatrici di CAR. L'umanizzazione dello scFv murino o l'utilizzo di scFv derivati da anticorpi completamente umani potrebbe risolvere il problema. Ricerche precedenti che hanno impiegato recettori CAR basati su scFv murini diretti contro CD19 o CD5 hanno dimostrato che le cellule NK-92 mostrano un'efficace attività antitumorale sia in vitro che in modelli murini. Un recettore CAR diretto contro GD2, con scFv umanizzato, ha dimostrato un'alta espressione, aumentando la produzione di citochine e la proliferazione delle cellule T. Tuttavia, poiché questi recettori CAR hanno una natura chimerica, anche gli scFv umanizzati possono provocare risposte immunitarie contro l'ospite. Fortunatamente, nei pochi studi clinici finora condotti sulle CAR-NK, non sono stati riscontrati effetti collaterali significativi legati alle risposte immunitarie anti-CAR. Da queste ricerche emerge che sia le CAR-NK murine che quelle umanizzate, con scFv derivati, mostrano una potente citotossicità contro le cellule tumorali che esprimono l'antigene sia in vitro che in vivo.

#### **4.4.4. IL LINKER**

Il linker è un componente fondamentale situato tra la catena pesante e quella leggera, conferisce al CAR la capacità di identificare un epitopo bersaglio ed inoltre contribuisce alla conformazione dell'scFv. I linker troppo corti possono portare alla formazione di multimeri, perché impediscono l'associazione dei domini VH e VL, mentre domini troppo lunghi, possono non favorire una associazione corretta tra i domini VH e VL. Per le cellule CAR-NK, i multimeri del pentapeptide GGGGS (glicina-serina) sono i più utilizzati.

#### **4.4.5. LA REGIONE CERNIERA (CD8 $\alpha$ , Ig CH2CH3)**

Definita anche distanziatore, la regione cerniera è una componente essenziale situata a livello extracellulare del CAR che mette in comunicazione l'scFv al dominio transmembrana. Oltre al mantenimento della stabilità nell'intero costrutto, questa regione favorisce una notevole flessibilità che permette facile accesso all'antigene bersaglio. Prevalentemente vengono utilizzati costrutti CAR-NK derivati da domini extracellulari CD8 $\alpha$ , CD28 o cerniere basate sull'immunoglobulina G (IgG), le quali vengono condizionate dal tipo e dalla lunghezza del distanziatore stesso. Attraverso ulteriori approfondimenti è stato individuato come i domini cerniera CD28 riescano a promuovere maggiormente la dimerizzazione delle molecole CAR,

favorendo uno stimolo di attivazione molto più potente, sebbene si sia presentato il rischio di indurre la sindrome da rilascio di citochine. Oltre ai domini cerniera CD28, anche quelli basati sulle immunoglobuline G vengono comunemente impiegati, poiché la flessibilità che caratterizza i costrutti formati da IgG1, IgG4 e i domini CH2/CH3 delle IgG Fc rappresenta uno dei principali vantaggi. Sebbene siano disponibili distanziatori di varie lunghezze per il riconoscimento dell'antigene, la ricerca ha dimostrato che distanziatori più brevi sono correlati a un aumento nella produzione di citochine, alla proliferazione delle cellule CAR e a una maggiore durata e efficacia nel trattamento antitumorale nei modelli animali.

#### **4.4.6. IL DOMINIO TRANSMEMBRANA (CD3, CD8, CD28, NKG2D, 2B4)**

Il dominio transmembrana (TM) è un costituente fondamentale che unisce l'ectodominio del CAR ai domini di segnalazione di attivazione intracellulare e collega il recettore alla membrana cellulare NK, trasmettendo un segnale intracellulare dopo il legame con l'antigene bersaglio. Evidenze indicano che la selezione del dominio transmembrana (TM) influenza il funzionamento del costrutto CAR nell'amplificare l'attivazione delle cellule. Il dominio TM di CD28, CD16, NKp44, NKp46, NKG2D, DNAM-1 e 2B4 è stato sfruttato per lo screening della funzione CAR mediante l'uso della linea cellulare NK-92. È importante soffermarsi sul fatto che la TM delle molecole generalmente espresse sulle cellule NK, porta a una maggiore degranolazione di CD107a (marcatore utilizzato per identificare l'attivazione delle cellule NK) e a una maggiore citotossicità. Pertanto, la fonte specifica della MT determinerà l'attività di CAR-NK.

#### **4.4.7. SEGNALE DI ATTIVAZIONE**

Le componenti responsabili dell'attivazione della cellula NK, durante il riconoscimento dell'antigene bersaglio, vengono definite domini attivanti. Il segnale di attivazione si riferisce al processo mediante il quale le cellule NK vengono attivate grazie all'interazione con il recettore CAR. Questo fenomeno avviene quando il recettore CAR riconosce specifici antigeni espressi sulla superficie delle cellule tumorali o infette. Una volta attivate, le CAR-NK possono quindi uccidere selettivamente le cellule bersaglio che esprimono tali antigeni. Le cellule NK impiegano molti recettori differenti che includono ad esempio, i recettori delle citochine, i quali sono rilevanti per la maturazione e l'attivazione delle NK. La maggior parte di questi recettori ha in comune molecole adattatrici e vie di segnalazione simili. La via JAK/STAT viene utilizzata dalle citochine IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-27 e

IFN- $\alpha/\beta$ . Di conseguenza, malgrado il primo segnale di attivazione nelle cellule T sia fornito tramite un recettore dell'antigene, molte delle vie di segnalazione successive sono condivise sia dalle cellule T che dalle cellule NK. È fondamentale comprendere che la segnalazione basata su CAR differisce dalle vie di attivazione canoniche. Nei linfociti T convenzionali, l'attivazione richiede la formazione di complessi multi molecolari (TCR-peptide-MHC con co-recettori) e l'ingaggio di molecole co-stimolatorie, mentre nelle cellule dotate di CAR, tali segnali sono integrati direttamente. Questa differenza ha implicazioni dirette sulla tempistica e disponibilità delle diverse molecole coinvolte nell'attivazione.

Le molecole co-stimolatorie generalmente provengono dalla famiglia CD28, dalla famiglia di geni del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNFR), (inclusi 4-1BB, OX40 e CD27) o dalla famiglia di recettori correlati alla molecola di attivazione linfocitaria di segnalazione. Per evitare reazioni avverse come la CRS causata da una eccessiva infusione di CAR, è possibile incorporare ai domini di attivazione degli interruttori di sicurezza, in modo tale da eliminare velocemente le CAR infuse.

Segnali intensi di attivazione risultano cruciali nel suscitare una risposta antitumorale robusta, tuttavia, possono innescare un esaurimento precoce delle cellule effettive. Per questo motivo, l'adozione di una combinazione di domini co-stimolatori può essere impiegata per modulare la reazione delle cellule immunitarie desiderate. Si è potuto notare come l'impiego di CAR basate su CD28 rispetto alle CAR basate su 4-1BB mostrano come i segnali attivati da CD28 inducano livelli più elevati di interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), granzima B, e fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Inoltre, i segnali di attivazione hanno un impatto sul metabolismo delle cellule del sistema immunitario. Si è osservato che le cellule CD28-CAR dipendono dal metabolismo glicolitico, mentre le CAR basate su 4-1BB, che invece dipendono dal metabolismo ossidativo, mostrano una maggiore persistenza.

Attraverso una analisi di 72 pubblicazioni che descrivono linee cellulari CAR-NK si è potuto constatare come nelle linee cellulari CAR-NK, CD3 $\zeta$  è ampiamente utilizzato come dominio principale di attivazione nelle terapie con cellule CAR, e circa la metà di esse incorpora anche un dominio aggiuntivo, solitamente mediante l'aggiunta di 4-1BB o CD28. In merito ai costrutti di terza generazione, si è osservato un uso più frequente della combinazione di CD28/4-1BB/CD3 $\zeta$ . Questi costrutti consentono alle cellule NK di ricevere segnali di co-stimolazione direttamente dopo il legame del CAR agli antigeni tumorali.

#### **4.4.8. IL TAG DI RILEVAMENTO (GFP, cMyc-tag, FLAG, LNGFR)**

I tag di rilevamento sono strumenti impiegati per inserire all'interno dei geni Car proteine fluorescenti e marcatori molecolari in modo tale da tracciare le cellule CAR-NK. L'inserimento dei tag avviene generalmente prima o dopo lo scFv. In particolare le proteine fluorescenti sono comunemente espresse anche nei plasmidi delle CAR-NK, i quali impiegano elementi bicistronici per consentire ai ricercatori di controllare il livello di espressione del CAR. Tuttavia, questo sistema può presentare svantaggi, come la discrepanza tra il rilevamento del tag e l'espressione effettiva del CAR associata una eccessiva risposta immunitaria causata dall'estraneità dei tag al corpo umano. Di conseguenza, questi tag sono spesso utilizzati solo in laboratorio e rimossi prima degli studi clinici. [31]

#### **4.5. METODI PER LA TRASDUZIONE DI CAR IN CELLULE NK**

La trasduzione è una procedura biotecnologica in cui viene introdotto del materiale genetico estraneo all'interno di una cellula ospite. La trasduzione di un gene che codifica per un recettore antigenico chimerico (CAR) all'interno delle cellule natural killer (NK) è un processo fondamentale impiegato nell'ingegnerizzazione delle cellule NK per cercare di potenziare la capacità delle cellule NK di riconoscere e distruggere cellule tumorali o infette. I due metodi principali impiegati sono la trasduzione virale attraverso l'utilizzo di lenti- o retrovirus e l'elettroporazione dell'mRNA, la trasfezione con DNA plasmidico nudo e l'integrazione mediata da DNA trasposisi.

##### **4.5.1. I LENTIVIRUS**

Virus impiegati nella terapia genica da molti anni, poiché dimostrano una notevole capacità di trasdurre sia cellule cicliche che non cicliche in modo efficiente. Il loro impiego ha portato a risultati positivi nel trattamento di varie malattie, tra cui l'HIV e il cancro. Uno dei principali vantaggi che caratterizza l'uso di lentivirus è la loro propensione ad integrarsi nel genoma dell'ospite, garantendo un'espressione a lungo termine del gene trasportato e una bassa reattività immunitaria. I dati disponibili evidenziano l'ampio utilizzo di lentivirus come vettori per la generazione di cellule NK dotate di recettori antigenici chimerici (CAR). In particolare, sono stati impiegati virus di seconda e terza generazione per generare linee cellulari NK che esprimono i CAR, con una preferenza per quelli di terza generazione,

considerati più sicuri. Un approccio fondamentale per migliorare l'efficienza di trasduzione virale, fu quello di adottare diverse strategie, tra cui l'utilizzo di pseudotipi diversi e la stimolazione delle cellule con citochine o composti specifici. Complessivamente, i lentivirus rappresentano un importante strumento per la produzione di cellule CAR-NK destinato alla terapia clinica.

#### **4.5.2. I RETROVIRUS**

I vettori basati su retrovirus necessitano che le cellule NK siano attivamente divise per consentire l'integrazione del vettore nel loro genoma. Gli studi dimostrano che sia linee cellulari CAR-NK sia cellule NK primarie hanno beneficiato dell'uso di retrovirus come vettori specialmente nella terapia contro il linfoma non-Hodgkin CD19 e la leucemia linfatica cronica. Come viene evidenziato in uno studio il 73% dei pazienti ha risposto positivamente, con la maggior parte che ha raggiunto la remissione completa entro 30 giorni dall'infusione di CAR-NK. Le cellule CAR-NK trasdotte con retrovirus hanno dimostrato di persistere nel sangue per almeno un anno dopo l'infusione. Per generare cellule CAR-NK sono stati sfruttati diversi tipi di retrovirus, in particolare i retrovirus alfa che portano l'involucro RD114, dimostrando una maggiore efficienza di trasduzione rispetto ai retrovirus gamma e ai lentivirus. Nonostante i retrovirus possano garantire un'espressione stabile del CAR nelle cellule NK per diverse settimane, la sicurezza del sistema retrovirale è ancora soggetta a considerazioni, specialmente quando confrontata con i lentivirus, reputati più sicuri.

#### **4.5.3. L'ELETTROPORAZIONE DELL'mRNA**

L'elettroporazione dell'mRNA codificante per CAR è una tecnica che utilizza impulsi elettrici brevi per introdurre molecole di RNA all'interno delle cellule. Nel contesto della formazione delle CAR-NK, l'elettroporazione dell'mRNA viene prevalentemente impiegata per inserire specifiche sequenze di RNA all'interno delle cellule NK, al fine di modificarle geneticamente e far loro esprimere i recettori CAR. Nel processo di elettroporazione, le cellule sono esposte a impulsi elettrici brevi e intensi, che provocano temporaneamente la formazione di pori nella membrana cellulare dove successivamente le molecole di RNA possono entrare all'interno delle cellule. Una volta all'interno, l'mRNA può essere tradotto dalle strutture cellulari per produrre le proteine desiderate, in questo caso i recettori CAR.

Il carico elettroporato è formato da mRNA o plasmidi codificanti per CAR. Si è riscontrato un miglioramento delle efficienze di trasfezione nelle cellule NK con effetti negativi minimi sulla vitalità cellulare grazie all'uso di mRNA CAR ad alta purezza al posto del cDNA (molecola di DNA sintetizzata in laboratorio a partire da un campione di RNA messaggero) in un plasmide. In generale, la capacità di trasfezione dell'mRNA è notevolmente maggiore nelle cellule NK espanse o attivate (oltre il 60%) rispetto alle cellule NK appena isolate (circa il 40%). Purtroppo il principale ostacolo di questa metodologia consiste nella breve finestra temporale in cui le CAR vengono espresse poiché una volta effettuata l'elettroporazione, le cellule CAR-NK devono essere somministrate ai pazienti entro 7 giorni.

#### **4.5.4. IL TRASPOSONE *SLEEPING BEAUTY***

Al fine di ottenere una maggior efficienza attraverso un posizionamento in specifiche regioni del genoma, i sistemi basati su trasposoni rappresentano un vantaggio significativo rispetto ai metodi tradizionali privi di capacità integrativa. Nelle cellule NK, i trasposoni vengono generalmente introdotti tramite elettroporazione seguita dall'integrazione nel genoma dell'ospite mediante enzimi trasposasi. Questa nuova tecnica è stata valutata in due ricerche, le quali hanno impiegato questa tecnologia per produrre cellule CAR-NK: una ha utilizzato le cellule NK-92-MI, mentre l'altra ha descritto la trasfezione del trasposone in cellule iPSC, seguita dal differenziamento in cellule NK. Entrambi gli studi hanno impiegato l'elettroporatore 4D-Nucleofector per introdurre i plasmidi contenenti la trasposasi nel nucleo cellulare. Dopo l'arricchimento, le cellule NK derivanti da iPSC esprimevano stabilmente CAR anti-mesotelina e mostravano efficacia in un modello murino di carcinoma ovarico. Anche se sono stati condotti numerosi studi che utilizzano il sistema del trasposone per generare cellule CAR-T primarie, la trasduzione di cellule NK primarie tramite trasposoni è più complessa. Tuttavia con ulteriori miglioramenti nei metodi di trasposone e trasfezione, si confida nella ricerca al fine di rendere questi approcci più praticabili.

#### **4.5.5. RICOMBINAZIONE MEDIANTE CRISPR/CAS9**

La tecnologia CRISPR/Cas9 rappresenta una metodologia basata sull'introduzione della proteina Cas9 insieme a RNA guida all'interno delle cellule NK. La tecnica è stata impiegata inizialmente nelle cellule NK primarie per disattivare il gene CD38, al fine di prevenire il rischio di perdita di cellule NK quando queste venivano utilizzate in combinazione con

daratumumab (anti-CD38) nei casi di mieloma multiplo. Più recentemente, CRISPR/Cas9 è stato utilizzato anche per introdurre nuovi geni. In questo approccio, insieme a CRISPR/Cas9, attraverso trasfezione, viene introdotto nella stessa cellula un modello di DNA omologo al donatore. Questo modello di DNA sostituisce il gene bersaglio, consentendo così l'introduzione di geni che promuovono effetti antitumorali. L'approccio è stato inizialmente impiegato con successo nelle cellule T primarie dove CRISPR/Cas9 è stato usato per colpire il gene TCR alfa, utilizzando la riparazione diretta dall'omologia (HDR) per inserire una cassetta CD19-CAR. L'espressione del CAR CD19, regolata dal promotore alfa endogeno del TCR, ha dimostrato una maggiore e persistente espressione rispetto ai vettori lentivirali che utilizzano un promotore virale. Seguendo questa strategia, è possibile utilizzare questo approccio per sviluppare cellule CAR-NK più efficaci. Tuttavia quando il gene CAR viene veicolato tramite vettori virali o tramite inserimento casuale basato su trasposoni, i livelli di espressione possono modificarsi, mentre l'uso di un promotore endogeno per guidare l'espressione del CAR, seguendo strategie di inserimento diretto nel locus specifico per CRISPR/Cas9, potrebbe favorire una lunga persistenza del costrutto CAR in vivo. Di conseguenza, la tecnologia CRISPR/Cas9 si configura come uno strumento versatile che richiede maggiori approfondimenti per la produzione di cellule CAR-NK poiché ha il potenziale per eliminare, correggere o introdurre con precisione geni in specifici loci, promettendo così la creazione di potenti cellule NK antitumorali.

#### **4.6. BERSAGLI DELLE CELLULE CAR-NK**

- CD20 e CD19
- CD138 e CS1
- CD22, CD7, CD33
- Her2
- GD2
- EGFR
- PSMA
- MUC1

Attraverso vari studi preclinici o clinici è stata evidenziata la presenza di diverse proteine di superficie cellulare come CD19 e CD20, espresse dalle cellule tumorali. Nel dettaglio, questi antigeni sono risultati essere sovra espressi in particolari neoplasie maligne, come quelle a

cellule B. Attraverso questo riscontro l'obiettivo di fondo emerso in numerosi studi aventi come metodologia impiegata l'uso di costrutti CAR era quello di dimostrare che la trasduzione retrovirale dei recettori chimerici dell'antigene anti-CD19 migliorava la citotossicità delle cellule natural killer contro queste neoplasie. Il protocollo applicato consisteva nel testare l'espressione di un recettore contenente molecole di segnalazione CD3 $\zeta$  e 4-1BB (anti-CD19-BB- $\zeta$ ) in cellule NK umane dopo elettroporazione. Il procedimento appena delineato offre un approccio pratico per potenziare l'attività citotossica delle cellule NK contro le neoplasie maligne di cellule B attuando un'azione diretta nei confronti delle proteine di superficie cellulare. [32]

Ulteriore bersaglio per le cellule NK ingegnerizzate con il recettore chimerico (CAR) è rappresentato da CS1. Attraverso uno studio è stato evidenziato che CS1, una proteina presente sulla superficie delle cellule di mieloma multiplo (MM), può essere l'obiettivo delle cellule NK mediante l'uso di un vettore virale contenente una CAR specifica per CS1. In vitro è stato dimostrato un aumento dell'attività citolitica delle cellule NK contro le cellule di mieloma multiplo, oltre ad un aumento di IFN- $\gamma$ . Inoltre, in prove ex vivo, il costrutto CAR-anti CS1 ha dimostrato un'attività migliorata rispondendo alle cellule tumorali primarie di MM. Di particolare rilievo, è il caso di trasferimento di cellule NK-92 con CAR per CS1 in un modello murino di xenotrapianto aggressivo di MM dimostrando una efficace inibizione della crescita delle cellule umane di MM IM9. Pertanto, CS1 rappresenta un possibile obiettivo per le cellule immunitarie dotate di CAR, rappresentando una promettente strategia terapeutica per il trattamento del MM. [33]

Per migliorare la citotossicità delle cellule NK contro le cellule di mieloma multiplo (MM) CD138-positivo è risultato un altro possibile bersaglio. È stato necessario generare cellule NK-92MI geneticamente modificate che trasportano un CAR costituito da un frammento variabile a catena singola (scFv) anti-CD138 fuso alla catena CD3 $\zeta$ . Attraverso questo costrutto (NK-92MI-scFv) si è dimostrato un notevole aumento della citotossicità nei confronti delle linee cellulari umane di mieloma multiplo. Inoltre, sono stati osservati incrementi rilevanti nella produzione di granzima B e interferone- $\gamma$ . [34] Altri bersagli come CD22, CD7 e CD33 sono importanti per il trattamento di altri tipi di tumori del sistema linfatico e mieloidi.

Anche nei tumori solidi, sono state individuate diversi bersagli terapeutici, con particolare attenzione a HER2, un gene sovra espresso in diversi tipi di cancro come quello al seno, al

colon e alle ovaie. Le cellule Natural Killer (NK) dotate di un recettore chimerico dell'antigene (CAR) specifico per HER2 sono state oggetto di studio per un loro possibile impiego nel trattamento dei tumori solidi. Attraverso lo sviluppo di un nuovo costrutto CAR definito, HER2-CAR-NK, che esprime anche sPD-1 (*Soluble PD-1 protein*), si è cercato di valutare l'efficacia contro vari tipi di cellule tumorali sia in vitro che in modelli murini di carcinoma mammario caratterizzati da un'elevata espressione di HER2, con o senza resistenza al trastuzumab. È stato evidenziato che sPD-1-CAR-NK mediante il rilascio di sPD-1 attivo, sia in grado di potenziare l'attività citotossica delle cellule HER2-CAR-NK contro le cellule tumorali che esprimono HER2 e PD-L1, favorendo, inoltre, un aumento della secrezione di perforina, granzima B e IFN- $\gamma$ . Questi risultati suggeriscono che le cellule sPD-1-CAR-NK specifiche per HER2 possono trasportare sPD-1 all'interno dei tessuti tumorali con elevata espressione di HER2, potenziando l'efficacia delle cellule HER2-CAR-NK senza provocare effetti avversi evidenti. sPD-1-CAR-NK rappresenta un'opzione terapeutica promettente per i pazienti affetti da carcinoma mammario HER2-positivo. Le cellule CAR miranti a HER2, attraverso l'uso di cellule NK provenienti dal sangue periferico e le cellule NK-92, sono state impiegate con successo anche nel trattamento di tumori al seno, alle ovaie e nel neuroblastoma. [35]

Target terapeutico di rilevante importanza identificato come bersaglio per l'immunoterapia passiva nel neuroblastoma (NB) è rappresentato dall'antigene GD2 (disialoganglioside). Le cellule CAR dirette contro GD2 dimostrano una notevole capacità nel contrastare le linee cellulari di neuroblastoma resistenti a multipli trattamenti e mostrano una significativa attività antitumorale in modelli murini di xenotrapianto. Ulteriori sviluppi hanno caratterizzato la nascita di nuove strategie basate su anticorpi specifici per GD2 attraverso l'impiego di una linea cellulare natural killer (NK) denominata NK-92-scFv(ch14.18) -zeta. Questa linea è stata oggetto di modifiche genetiche per esprimere un recettore chimerico specifico per l'antigene GD2, derivato dal ch14.18. Attraverso l'espressione di tale recettore chimerico NK-92-scFv(ch14.18) -zeta è in grado di eliminare in modo efficace le cellule NB positive per GD2. Il riconoscimento di GD2 da parte del recettore chimerico rappresenta il principale meccanismo coinvolto nell'attività di lisi mediata da NK-92-scFv(ch14.18) -zeta. [36]

Altri antigeni attualmente oggetto di studio come possibili obiettivi per le cellule CAR NK nei tumori solidi comprendono l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) proteina

situata sulla superficie delle cellule, coinvolta nella regolazione della crescita e della divisione cellulare. Rappresenta uno dei geni maggiormente amplificati nel glioblastoma (GB), tumore cerebrale maligno e aggressivo. Circa il 20-40% di questo tipo di tumore è caratterizzato da una variante definita EGFR III, la quale sembra essere un promettente bersaglio della terapia CAR NK. Il nuovo approccio ha dimostrato un'elevata attività citotossica ed efficacia nell'inibire la crescita del glioblastoma.

Altresì, si è notato che l'uso combinato di cellule CAR NK con virus oncolitici possa trovare impiego per eliminare i tumori solidi. Circa il 50% dei tumori riscontrati nei pazienti con glioblastoma esprime il gene EGFR wild-type (wtEGFR), con una minoranza che esprime anche la forma mutante EGFRvIII. È stato evidenziato come sia wtEGFR che EGFRvIII possono essere dei bersagli delle CAR-NK per trattare la GB. Sono state utilizzate linee cellulari NK umane NK-92 e NKL, oltre a cellule NK primarie, alle quali è stato introdotto un costrutto lentivirale contenente una CAR di seconda generazione mirante sia wtEGFR che EGFRvIII. L'obiettivo è stato quello di valutare l'efficacia anti-GB delle cellule NK modificate con EGFR-CAR. Le cellule NK ingegnerizzate con EGFR-CAR hanno dimostrato una maggiore attività citolitica e una produzione più elevata di IFN- $\gamma$ . Inoltre, in due modelli murini ortotopici di xenotrapianto di GB (dove le cellule tumorali umane vengono inoculate direttamente nella sede anatomica corrispondente nel topo), l'infusione intracranica di cellule NK-92-EGFR-CAR ha determinato una significativa soppressione della crescita tumorale e ha prolungato la sopravvivenza dei topi affetti da tumore. Questi risultati suggeriscono che l'infusione intracranica di cellule NK-92-EGFR-CAR rappresenti una promettente strategia clinica per il trattamento del glioblastoma. [37]

Altri bersagli terapeutici esaminati in recenti studi clinici includono l'antigene di membrana prostatico specifico (PSMA), espresso nei tessuti tumorali della prostata in maggiori quantità rispetto ad un individuo sano. Il cancro alla prostata (PCa) è una forma di cancro che si sviluppa a livello della ghiandola prostatica, una piccola ghiandola a forma di noce situata sotto la vescica negli uomini rappresentando la patologia più diffusa in Europa e negli Stati Uniti. È emerso che l'uso dell'immunoterapia adottiva mediante l'impiego di una linea cellulare immortalizzata definita NK-92 ha dimostrato un'elevata capacità di distruggere le cellule tumorali senza intaccare le cellule sane. L'impiego di cellule NK-92 ingegnerizzate con un recettore CAR che riconoscono l'antigene PSMA, rappresenta una nuova strategia terapeutica in quanto il nuovo costrutto ha dimostrato un'elevata capacità citolitica specifica

contro le cellule tumorali della prostata che esprimono PSMA in vitro. Inoltre, ha prodotto livelli significativi di IFN- $\gamma$  in risposta al riconoscimento dell'antigene. Questa specificità nel riconoscimento del PSMA e l'efficacia antitumorale sono state confermate anche in vivo. Infatti, il trapianto adottivo di cellule NK-92/CAR irradiate in topi affetti da cancro alla prostata ha rallentato la crescita del tumore e migliorato la sopravvivenza. Le linee cellulari immortalizzate NK-92 modificate con il CAR anti-PSMA costituiscono una soluzione terapeutica, pronta all'uso grazie alla loro capacità di essere modificate geneticamente con metodologie di trasfezione non virale per esprimere recettori o ligandi specifici. [38]

Infine, è stato riportato che sia le cellule CAR NK che le cellule CAR NKT (tipo di cellula del sistema immunitario con caratteristiche sia delle cellule T che delle cellule killer naturali) sono dirette contro MUC1. Questa glicoproteina costituisce un'importante barriera che limita l'efficacia dei farmaci nel legarsi ai loro bersagli sulle cellule tumorali. [39]

#### **4.7. IMPIEGHI TERAPEUTICI**

Diversi studi preclinici e clinici hanno confermato l'efficacia delle cellule NK modificate con CAR in diversi tipi di cancro, in particolare, quello ematologico.

Come già visto in precedenza le cellule NK-92 ingegnerizzate con CAR che riconoscono CD19 e CD20 hanno dimostrato un aumento dell'attività citotossica contro le neoplasie delle cellule B.

CD38 e CD138, invece, rappresentano dei marcatori classici delle plasmacellule e sono altamente espressi nel mieloma multiplo (MM). Anche se la terapia che impiega cellule CD38-CAR-T per il MM e cellule CD38-CAR-NK per la leucemia mieloide acuta (LMA) sono state riportate in diversi studi, purtroppo il costrutto CD38-CAR-NK non è stato ancora valutato per il trattamento nel mieloma multiplo. In aggiunta sono state sviluppate cellule CAR-NK mirate a CD138 che hanno dimostrato una maggiore attività antitumorale in vitro e in modelli murini di xenotrapianto. Altresì il bersaglio antigene di maturazione delle cellule B (BCMA) rappresenta un'altra scelta ideale per la terapia cellulare CAR a causa della sua espressione limitata nelle cellule del lignaggio delle cellule B. Il costrutto BCMA-CAR-NK modificato con il recettore delle chemochine CXCR4 ha significativamente ridotto il carico tumorale e prolungato la sopravvivenza dei topi portatori di tumore. Attualmente, le neoplasie a cellule T, come il linfoma periferico a cellule T e la leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL), rappresentano ancora una sfida mentre tre terapie cellulari CAR-NK

mirate a CD3, CD5 e CD7 hanno trovato impiego per il trattamento delle neoplasie maligne a cellule T. Patologie come i linfomi a cellule T e T-ALL hanno riscontrato notevoli benefici attraverso l'impiego del costrutto CAR che utilizza linee cellulari immortalizzate NK-92 dimostrando una significativa citotossicità antitumorale sia in vitro che in vivo. Recentemente l'efficacia delle cellule CAR-NK è stata esplorata in diversi tipi di tumori maligni, in particolare nelle neoplasie ematopoietiche.

Le neoplasie linfoidi B rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate dalla proliferazione anormale delle cellule B del sistema linfatico. Queste malattie possono coinvolgere linfonodi, milza, midollo osseo e altri organi linfoidi presentando una vasta gamma di manifestazioni cliniche e biologiche. [40]

Le principali neoplasie linfoidi B comprendono:

1. Linfoma non Hodgkin (LNH)
2. Leucemia linfatica cronica (LLC)
3. Leucemia linfoblastica acuta (LLA)

#### **4.7.1. LINFOMA NON HODGKIN**

I linfomi non Hodgkin (LNH) rappresentano un gruppo di malattie linfoproliferative eterogenee per origine, tipo di crescita, andamento clinico e risposta terapeutica.

##### **4.7.1.1. EPIDEMIOLOGIA ED EZIOPATOGENESI**

L'incidenza mondiale dei linfomi non Hodgkin rappresenta il 2-3% di tutti i casi di neoplasie e nei bambini rappresenta circa il 10% di tutte le malattie tumorali pediatriche. Differisce dal linfoma di Hodgkin, poiché aumenta gradualmente con l'avanzare dell'età. Numerosi sono i fattori che contribuiscono allo sviluppo della malattia in particolare:

- 1) la predisposizione familiare: la presenza di linfomi non Hodgkin all'interno della stessa famiglia potrebbe essere causata da una condizione di disordine del sistema immunitario. Questa anomalia potrebbe aumentare il rischio di sviluppare linfomi non Hodgkin.
- 2) infezioni virali: è stato riscontrato come il virus di Epstein-Barr (EBV) giocherebbe un ruolo chiave nello sviluppo delle sindromi linfoproliferative. Negli ultimi anni, si è attribuita una notevole importanza all'associazione tra la sindrome da immunodeficienza acquisita

(AIDS), causata dal virus HIV, e lo sviluppo di neoplasie, in particolare i linfomi non Hodgkin (LNH). Si è potuto notare come nei pazienti affetti da AIDS, vi sia una stimolazione anomala del sistema immunitario linfocitario B, aumentando così il rischio di sviluppare linfomi fino a quattro volte rispetto alle persone sane.

3) deficit immunitari congeniti e acquisiti: Si è notato un aumento di linfomi non Hodgkin (LNH) in diverse condizioni congenite in particolare nella sindrome di Wiskott-Aldrich. Per quanto riguarda le immunodeficienze acquisite, si è visto un aumento incidenza di LNH in pazienti sottoposti a trattamenti prolungati con farmaci immunosoppressori, come quelli per il trapianto renale, cardiaco, di midollo osseo e nel morbo di Hodgkin.

#### **4.7.1.2. MANIFESTAZIONI CLINICHE**

L'ingrossamento dei linfonodi superficiali è uno dei segni più rilevanti e immediatamente osservabili, riscontrati in circa due terzi dei pazienti. Le stazioni linfonodali più frequentemente coinvolte sono quelle del collo, dell'inguine e delle ascelle. Questi linfonodi tendono ad aumentare di volume e possono presentare una consistenza dura o elastica. I sintomi che caratterizzano la maggior parte dei pazienti comprendono febbre, perdita di peso inspiegabile, tosse, sudorazioni notturne seguiti da una progressiva difficoltà respiratoria. Uno dei siti maggiormente coinvolti è il mediastino. Nei casi più avanzati, potrebbe essere evidente una circolazione collaterale superficiale tramite la vena cava, oltre a un accumulo di liquido pleurico. Le forme che coinvolgono l'apparato gastrointestinale possono insorgere in qualsiasi punto di quest'ultimo e sono accompagnate da dolore addominale, riduzione dell'appetito, occasionalmente nausea e vomito, diarrea e feci scure, nonché occlusione intestinale.

#### **4.7.1.3. TERAPIE**

I trattamenti terapeutici convenzionali attualmente in uso includono la radioterapia (RT), la chemioterapia (CT), l'impiego di fattori di crescita ematopoietici (GF), i modificatori della risposta biologica (BRM) e il trapianto di midollo osseo (TMO). La CT è particolarmente significativa nell'ambito della terapia di tali forme tumorali. Regimi terapeutici ben tollerati come CVP (ciclofosfamide, vincristina e prednisone), CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, Oncovin e prednisone), C-MOPP (ciclofosfamide, mecloretamina, oncovin, procarbazine e prednisone) sono associati ad alte percentuali di remissione completa, anche se caratterizzati

da possibili fenomeni recidivanti. L'impiego di protocolli più aggressivi sin dall'inizio ha consentito di ottenere remissioni più prolungate e significative, anche se accompagnate da fenomeni di tossicità. [41]

## **4.7.2. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA**

La leucemia linfatica cronica è una patologia caratterizzata da un accumulo di linfociti B maturi non funzionanti nel flusso sanguigno, nel midollo osseo e nei tessuti linfatici. Questo tipo di cancro viene diagnosticato intorno ai 70 anni di età, colpendo principalmente gli uomini anziani nei paesi occidentali. La malattia è definita "cronica" poiché spesso progredisce lentamente, senza causare sintomi evidenti o disturbi al paziente e, di conseguenza, non richiede immediatamente un trattamento.

### **4.7.2.1. MANIFESTAZIONI CLINICHE**

La maggior parte dei pazienti con leucemia linfatica cronica non manifesta sintomi evidenti e ha una progressione lenta che non richiede intervento terapeutico. Essendo che le manifestazioni cliniche della malattia non sono sempre evidenti, spesso la leucemia linfatica cronica viene diagnosticata durante esami del sangue di routine o quando si nota un ingrossamento dei linfonodi nel collo, nelle ascelle o nell'inguine, oppure quando l'emocromo rivela un aumento persistente dei linfociti nel sangue, superiore a 5.000/mmc nel tempo.

I sintomi più comuni sono correlati all'aumento dei linfociti anomali nei linfonodi e includono:

- Ingrossamento dei linfonodi (adenopatia generalizzata); possono anche verificarsi ingrossamenti della milza (splenomegalia) e del fegato (epatomegalia)
- Anemia
- Basso numero di piastrine nel sangue, che può causare lividi o emorragie anche da piccoli traumi, o la comparsa di macchie rosse (petecchie) sulle gambe o nella bocca
- Basso numero di neutrofili nel sangue
- Produzione di autoanticorpi, specialmente contro altre cellule del sangue, che vengono quindi distrutte.

Altre caratteristiche biologiche della leucemia linfatica cronica includono difetti nell'apoptosi (morte cellulare programmata) e una marcata immunodeficienza, soprattutto una ridotta produzione di anticorpi che peggiora con la progressione della malattia.

#### **4.7.2.2. TERAPIE**

Quando la malattia diventa sintomatica e richiede un intervento terapeutico, esistono vari approcci disponibili. La decisione riguardo al trattamento dipende dall'età del paziente, dalla presenza di altre condizioni mediche e dalle caratteristiche biologiche specifiche della malattia.

I principali approcci terapeutici sono:

- FCR: fludarabina-ciclofosfamide-rituximab, un approccio combinato tra chemioterapia e l'anticorpo monoclonale anti CD20 denominato rituximab.
- bendamustina + rituximab;
- clorambucile + anticorpo monoclonale (rituximab/obinotuzumab/ofatumumab). [42]

#### **4.7.3. LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA**

La Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) è il tipo di cancro più diffuso tra i bambini rimanendo purtroppo ancora la principale causa di morte per malattia tra i bambini e i giovani adulti. È stato ampiamente accertato che questa patologia si sviluppa a seguito di mutazioni cromosomiche che si verificano nelle prime fasi dello sviluppo fetale, nelle cellule del sistema linfatico causato dalla moltiplicazione incontrollata di un particolare tipo di cellula chiamata linfoblasto. In passato, la sopravvivenza dei bambini sotto i 15 anni era inferiore al 10% negli anni '60, ma ora è aumentata fino al 75%, con una sopravvivenza a lungo termine dell'85%. I sintomi più comuni includono febbre, affaticamento, sonnolenza e dolori ossei o articolari. Altri sintomi meno comuni possono includere mal di testa, vomito, difficoltà respiratorie e ridotta produzione di urina. Durante l'esame fisico, possono essere presenti pallosità, piccole macchie rosse e lividi sulla pelle e sulle mucose. All'atto della diagnosi, molti bambini presentano ingrossamento della milza e/o del fegato, spesso senza sintomi evidenti, con organi che possono essere palpabili a oltre 2 cm sotto il margine costale. È comune anche il gonfiore dei linfonodi a causa dell'accumulo di cellule leucemiche. All'inizio della malattia, si osservano spesso anemia, alterazioni nel numero e nella composizione dei globuli bianchi e bassi livelli di piastrine. Un alto numero di globuli bianchi nel sangue (più di 100.000/mmc) è presente nel 10-15% dei pazienti. I problemi di

coagulazione tendono ad essere lievi e raramente causano gravi sanguinamenti. La LLA è una malattia biologicamente eterogenea caratterizzata da differenze nei linfoblasti presenti nel sangue e nel midollo osseo. Sebbene il sistema nervoso centrale e i testicoli siano i siti più comuni di diffusione della malattia al di fuori del midollo osseo, teoricamente qualsiasi organo o tessuto può essere coinvolto, con casi descritti di coinvolgimento della pelle, degli occhi, della pleura, del pericardio, dei reni e dell'ovaio.

#### **4.7.3.1. TERAPIE**

I trattamenti farmacologici per la Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) possono comprendere una varietà di farmaci, inclusi:

- Farmaci chemioterapici: metotrexato, citarabina, vincristina, daunorubicina, ciclofosfamide e prednisone.
- Inibitori tirosin chinasi: Alcuni pazienti possono ricevere farmaci che inibiscono specifiche proteine chiamate tirosin chinasi, come imatinib, dasatinib o nilotinib
- Anticorpi monoclonali: Farmaci come rituximab possono essere utilizzati per mirare specificamente alle cellule leucemiche.
- il trapianto di cellule staminali prelevate da un donatore [43]

## 4.8. CLINICAL TRIALS

Considerando le loro proprietà biologiche uniche e la loro potente attività antitumorale, le cellule NK hanno recentemente destato curiosità come una promettente piattaforma alternativa per l'ingegneria CAR. Una serie di sperimentazioni attive, riportate nella tabella sottostante, ha confermato l'efficacia delle cellule NK ingegnerizzate con CAR. Di recente, le prestazioni delle cellule CAR-NK sono state esaminate in varie neoplasie maligne, come evidenziato nei trial clinici completati o in fase di reclutamento. Dopo il primo studio clinico sulle cellule CAR-NK (NCT00995137, [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)) iniziato nel 2009, sono stati registrati 39 studi nel [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) che esaminano la sicurezza e l'efficacia delle cellule CAR-NK. In particolare è stato condotto uno studio clinico di fase 1/2 sull'uomo utilizzando la terapia cellulare CAR-NK per pazienti affetti dalle patologie precedentemente descritte quali il linfoma non Hodgkin, la leucemia linfatica cronica e la leucemia linfoblastica acuta. (numero [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) NCT03056339). [44]

Identificatore della sperimentazione clinica nazionale	Fase di sperimentazione clinica	Tipo di cancro	Bersaglio dell'antigene	Fonte di cellule NK	Costrutto/metodo	Dosaggio	Stato
Sperimentazioni attive su cellule CAR NK							
<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03056339">NCT03056339</a>	1/2	Neoplasie linfoidi B, LLA, CLL, NHL	CD19	Sangue del cordone ombelicale	AUTO. CD19-CD28-CD3ζ-iCasp9-IL15	3 livelli di dosaggio: 10 <sup>5</sup> /Kg 10 <sup>6</sup> /Kg 10 <sup>7</sup> /Kg	Fase 1 completata, fase 2 reclutamento
<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00995137">NCT00995137</a>	1	B-ALL	CD19	Donatore aploidentico	CAR.19-41BB-CD3ζ	Sconosciuto	Finito
<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04245722">NCT04245722</a>	1	Linfoma a cellule B, LLC	Anticorpo CD19 ± CD20 (rituximab o obinutuzumab)	Cellule NK derivate da cellule staminali pluripotenti indotte	CAR.19-NGK2D-2B4-CD3ζ-IL15RF-hnCD16	Escalation della dose, dosaggi esatti sconosciuti	Reclutamento
<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03940833">NCT03940833</a>	1/2	Mieloma multiplo	BCMA	Linea cellulare NK-92	Sconosciuto	Sconosciuto	Reclutamento
<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03415100">NCT03415100</a>	1	Tumori solidi	Ligandi NKG2D	NK autologa o allogenica	elettroporazione dell'mRNA	Sconosciuto	Reclutamento
<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03940820">NCT03940820</a>	1/2	Tumori solidi	ROBO1		Sconosciuto	Sconosciuto	Reclutamento
<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03941457">NCT03941457</a>	1/2	Cancro al pancreas	ROBO1	Sconosciuto	Sconosciuto	Sconosciuto	Reclutamento
<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03383978">NCT03383978</a>	1	Glioblastoma	HER2	NK-92	AUTO. HER2-CD28-CD3ζ	1 × 10 <sup>7</sup> -1 × 10 <sup>8</sup> per infusione intracranica	Reclutamento

Figura 3: Elenco di sperimentazioni cliniche che impiegano la terapia CAR-NK. Basar R, Daher M, Rezvani K. Next-generation cell therapies: the emerging role of CAR-NK cells. *Blood Adv.* 2020 Nov 24;4(22):5868-5876. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002547. PMID: 33232480; PMCID: PMC7686910.

Nello studio di fase 1 e 2 NCT03056339, sono state somministrate cellule CAR-NK anti-CD19 non corrispondenti HLA derivate dal sangue del cordone ombelicale a 11 pazienti con tumori CD19-positivi recidivanti o refrattari (LNH, LLA e LLC). Le cellule NK sono state trasdotte con un vettore retrovirale che esprime geni che codificano per CAR anti-CD19, interleuchina-15 e caspasi 9 inducibile. Le cellule sono state espanse ex vivo e somministrate in un'unica infusione utilizzando una delle tre dosi ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  oppure  $1 \times 10^7$  Cellule CAR-NK per chilogrammo di peso corporeo) dopo la fase di linfo-deplezione.

Durante questo esperimento è stato evidenziato come l'impiego delle cellule CAR-NK non abbia generato la sindrome da rilascio di citochine, neurotossicità o malattia del trapianto contro l'ospite. Non si sono riscontrati aumenti nei livelli di citochine infiammatorie e la dose massima tollerata non è stata raggiunta. Un'analisi dettagliata condotta su 11 pazienti trattati ha mostrato che il 73% di essi ha ottenuto una risposta positiva al trattamento. In particolare, 7 di questi pazienti hanno registrato una remissione completa mentre 1 ha avuto una remissione della componente di trasformazione di Richter ma nonostante ciò ha mantenuto una LLC persistente. Le risposte si sono manifestate entro un mese dall'infusione a tutti i livelli di dosaggio, e le cellule CAR-NK infuse hanno mantenuto una presenza a livelli bassi per almeno un anno. La maggior parte dei pazienti affetti da tumori CD19-positivi ha mostrato una reazione favorevole al trattamento senza rilevanti effetti tossici. Inizialmente è stato condotto uno studio preclinico su topi il quale ha confermato l'efficacia delle cellule NK modificate con CAR anti-CD19, interleuchina-15 e caspasi 9 inducibile nel trattamento del linfoma. Questi risultati promettenti hanno portato all'avvio di studi clinici di fase 1 e 2 sulle cellule CAR-NK.

I pazienti sono stati trattati con una chemioterapia linfo-depletiva utilizzando fludarabina (a una dose di 30 mg per metro quadrato di superficie corporea) e ciclofosfamide (a una dose di 300 mg per metro quadrato) per tre giorni consecutivi, seguita da un'unica infusione di cellule CAR-NK a dosaggi progressivi di  $1 \times 10^5$  cellule,  $1 \times 10^6$  cellule e  $1 \times 10^7$  cellule per chilogrammo di peso corporeo. I primi 9 pazienti hanno ricevuto un prodotto CAR-NK parzialmente compatibile con il genotipo HLA del ricevente (4 su 6 corrispondenze nei loci HLA A, B e DR $\beta$ 1). Successivamente, il protocollo ha subito una modifica per permettere il trattamento senza considerare la compatibilità HLA, come avvenuto per i pazienti 10 e 11. Lo studio è stato approvato dal comitato di revisione istituzionale presso l'Università del Texas MD Anderson Cancer Center ed è stato condotto secondo i principi della

Dichiarazione di Helsinki. In sintesi, l'unità del sangue del cordone ombelicale è stata scongelata e le cellule NK sono state purificate e coltivate insieme a cellule feeder K562 ingegnerizzate e con interleuchina-2. Il sesto giorno, le cellule sono state trasdotte con un vettore retrovirale contenente i geni per la CAR anti-CD19, l'endodominio di segnalazione CD28.CD3 $\zeta$ , l'interleuchina-15 e la caspasi inducibile 9. Le cellule sono state quindi ampliate e preparate per una successiva infusione il quindicesimo giorno.

Gli 11 pazienti inclusi nello studio avevano già sperimentato 4 linee di trattamento. Tra di essi, cinque pazienti erano affetti da LLC, di cui due avevano anche la trasformazione di Richter o LLC accelerata, inoltre tutti avevano subito una progressione della malattia durante il trattamento con ibrutinib successivo ad almeno altre tre linee di terapia. Tutti e cinque i pazienti presentavano caratteristiche genetiche ad alto rischio. Altri sei pazienti erano affetti da linfoma, di cui due con linfoma diffuso a grandi cellule B e quattro con forma follicolare; tre di questi pazienti avevano subito una trasformazione in linfoma di alto grado. Dei sei pazienti con linfoma, quattro avevano avuto una progressione della malattia dopo un trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche, mentre due presentavano una malattia refrattaria.

È emerso che dopo aver ricevuto l'infusione delle cellule CAR-NK, nessuno dei soggetti ha mostrato segni di sindrome da rilascio di citochine, neurotossicità o linfocitosi emofagocitica. In aggiunta, non si sono verificati casi di malattia del trapianto contro l'ospite, nonostante l'assenza di compatibilità HLA tra i pazienti e le cellule CAR-NK somministrate. Come previsto, tutti i partecipanti hanno manifestato temporanei e reversibili effetti tossici ematologici, principalmente associati alla terapia chemioterapica di linfodeplezione.

Questa terapia è stata sperimentata su pazienti che avevano già ricevuto trattamenti intensivi per la leucemia linfatica cronica recidivante o refrattaria o per il linfoma non-Hodgkin. Dopo circa 13,8 mesi di follow-up, l'analisi ha rilevato che 8 degli 11 pazienti trattati (73%) hanno mostrato una risposta obiettiva (di cui 4 su 5 pazienti con leucemia linfatica cronica e 4 su 6 con linfoma non-Hodgkin); inoltre, 7 pazienti su 11 (64%) hanno ottenuto una risposta completa. Le risposte si sono verificate rapidamente e a diverse dosi. Dopo l'adozione dell'immunoterapia, le cellule NK non modificate tendono a scomparire entro due settimane dall'infusione, un aspetto che ha limitato il loro impiego clinico. Tuttavia, è stato osservato un aumento nel numero delle cellule CAR-NK infuse e la loro persistenza a livelli bassi per almeno 12 mesi, nonostante la significativa differenza HLA tra le cellule NK infuse e il

ricevente. Questo fatto ha portato a supporre che l'inclusione dell'interleuchina-15 nel costrutto abbia ricoperto un ruolo fondamentale nella persistenza e nell'attività antitumorale di queste cellule CAR-NK.

Nello studio, si è potuto valutare come la persistenza a lungo termine delle cellule CAR-NK con differente HLA sarebbe stata favorita da un ambiente adatto creato dal trattamento di linfodeplezione combinato con l'espressione ectopica dell'interleuchina-15 da parte delle cellule CAR-NK, in modo tale da promuovere la loro espansione. Tuttavia, tali cellule persistenti non sono risultate sufficienti a prevenire le ricadute e sembrano non aver portato a un'ulteriore espansione in vivo. Sebbene i preparati di cellule CAR-NK contenessero alcune cellule T dal donatore, il loro numero sembrava essere troppo esiguo per innescare una reazione di malattia del trapianto contro l'ospite. Gli effetti tossici delle cellule CAR-T, come la sindrome da rilascio di citochine, sono in gran parte attribuiti all'interleuchina-6, che viene prodotta sia dalle cellule CAR-T che dalle cellule mieloidi a differenza delle cellule NK che la secernono meno. Nei test è emerso che i livelli di citochine infiammatorie come l'interleuchina-6, il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  e l'interferone- $\gamma$  sono rimasti costantemente bassi nel tempo. Inoltre, i pazienti sono stati arruolati in modo sequenziale con un intervallo di almeno due settimane per garantire la sicurezza di conseguenza, è stato prodotto un nuovo prodotto di cellule CAR-NK per ciascun paziente. Tuttavia, è stato dimostrato la possibilità di ottenere più di 100 dosi di cellule CAR-NK da una singola unità di sangue cordonale. Questa capacità, insieme ai minimi requisiti di compatibilità HLA tra il donatore di cellule CAR-NK e il paziente, potrebbe facilitare la disponibilità di un prodotto pronto all'uso, ampliando così l'accessibilità del trattamento a un maggior numero di pazienti. [45]

## **4.9. LIMITI E PROBLEMI**

### **4.9.1. L'EFFETTO FRATRICIDA**

Si tratta di un fenomeno indesiderato dovuto ad una espansione ex vivo delle cellule NK mediante il quale le cellule identificano recettori o ligandi sulla superficie di altre cellule e innescano un'attività citotossica contro di esse. Ci sono vari processi che possono portare a questo fenomeno durante la proliferazione delle cellule NK o CAR-NK.

Uno dei principali meccanismi coinvolti nell'uccisione delle cellule fratricide durante l'espansione delle cellule NK o CAR-NK è l'asse Fas/FasL. La capacità citotossica di FasL riveste un ruolo importante nel funzionamento delle cellule NK, poiché attiva l'apoptosi tramite caspasi quando si lega al suo recettore Fas sulle cellule bersaglio. Generalmente, la Fas può essere espressa dalle cellule NK come parte di un meccanismo di auto-regolazione per limitare la loro attività, noto come morte cellulare indotta dall'attivazione (AICD). Tuttavia, durante l'espansione delle cellule NK, soprattutto in presenza di IL-2, IL-15 o determinati tipi di cellule feeder come K562-mIL21, si è osservato un aumento anomalo dell'espressione di Fas, portando così al fenomeno del fratricidio. Inoltre, un'elevata espressione di Fas durante l'espansione delle cellule CAR-NK, insieme a un'eccessiva presenza di FasL, riscontrata in alcune cellule tumorali come le plasmacellule maligne o nel microambiente tumorale (TME), può compromettere l'efficacia della terapia cellulare adottiva contro il cancro.

Ulteriore recettore che potrebbe provocare l'uccisione delle cellule fratricide è il NKG2D. Questo recettore è espresso principalmente dalle cellule NK, CD8 T e  $\gamma\delta$  T e riconosce diversi ligandi indotti dallo stress (NKG2D-Ls), tra cui MICA/B e ULBP1-6, spesso espressi da cellule cancerose o infettate da virus. Nonostante vi sia una crescente quantità di dati che descrivono l'espressione di NKG2D-L da parte delle cellule NK attivate, l'origine di tale espressione e le sue implicazioni sulla funzionalità delle cellule NK sono ancora oggetto di dibattito.

### **4.9.2. LA CRIOCONSERVAZIONE**

La conservazione delle cellule NK rappresenta un ulteriore ostacolo difficile da superare poiché è estremamente complicato somministrare un prodotto appena espanso di cellule CAR-NK ai pazienti in tempi adeguati, considerando lo stato delle cellule, le questioni

logistiche e i tempi necessari per preparare il paziente. La metodologia utilizzata per conservare l'intero costrutto prende il nome di crioconservazione, tecnica che consente l'uso delle cellule NK come prodotti "off-the-shelf". Questa pratica dovrebbe garantire una qualità uniforme delle cellule CAR-NK per i riceventi, eliminando le variazioni naturali tra i donatori di cellule NK. Diversi gruppi stanno lavorando per ottimizzare i componenti del mezzo di congelamento, ottenendo risultati promettenti. Un approccio innovativo coinvolge la protezione intracellulare mediata da nanoparticelle delle cellule NK, che potrebbe eliminare completamente l'uso di DMSO come agente crioprotettivo, preservando al contempo il potenziale citotossico delle cellule NK-92 ed evitando il criodanno.

#### **4.9.3 ALLORIGETTO DELLE CELLULE T**

Ulteriore problematica evidenziata è il rigetto delle cellule NK del donatore da parte del sistema immunitario dell'ospite. Le cellule T che riconoscono le molecole HLA non-self sulle cellule NK allogeniche sono i principali responsabili di questi processi. È stato evidenziato che livelli più alti di cellule T che hanno subito un processo di linfodeplezione sono stati collegati ad una maggiore resistenza delle cellule NK aploidentiche trasferite nei pazienti con leucemia. La chemioterapia linfodepletiva riduce temporaneamente il sistema immunitario dell'ospite, migliorando l'adesione delle cellule adottive. L'uso di farmaci linfodeplenti induce una diminuzione di altre popolazioni cellulari implicate nella produzione di citochine con proprietà immunosoppressive come le Treg e le cellule soppressori di derivazione mieloide (MDSC), creando un ambiente più favorevole all'espansione delle cellule adottive. Dosaggi elevati di ciclofosfamide e fludarabina sono richiesti per favorire l'adesione e l'espansione delle cellule NK. L'IL-15 endogena aumenta dopo il trattamento di linfodeplezione ed è stata associata alla proliferazione iniziale delle cellule NK in vivo.

Tuttavia, IL-15 e IL-7 sono fondamentali per la proliferazione omeostatica delle cellule T, un fenomeno osservato dopo una significativa deplezione delle cellule T. Pertanto, IL-15 può anche contribuire all'allorigetto delle cellule T CD8.

Successivamente è emersa l'ipotesi che il supporto delle citochine esogene possa prolungare l'efficacia della terapia con NK, anche se è stato riscontrato che l'uso del complesso superagonista N-803 di IL-15 diminuisce le risposte cliniche nei pazienti con leucemia mieloide acuta trattati con cellule NK aploidentiche a causa della stimolazione dei linfociti

T CD8. In alternativa, la secrezione autocrina da parte di costrutti CAR bicistronici contenenti citochine potrebbe rappresentare una soluzione più efficace. In questa prospettiva, le cellule NK CD19-CAR UCB che producono IL-15 sono state osservate a persistere nel lungo termine dopo l'infusione in pazienti con linfoma non-Hodgkin o leucemia linfatica cronica, nonostante il mismatching HLA.

Tuttavia, non è stata ancora definita una metodologia appropriata per creare un ambiente citochinico favorevole che migliorerebbe la persistenza delle cellule NK riducendo al minimo l'allorifiuto da parte delle cellule T.

#### **4.9.4. SENESCENZA REPLICATIVA**

La breve sopravvivenza delle cellule NK in vivo in assenza di supporto citochinico ha il beneficio di ridurre le tossicità al di fuori del tumore e il rischio di sviluppare malignità. Tuttavia, questo riduce anche la finestra temporale per le terapie, compromettendo le risposte immunoterapiche a lungo termine. È stato osservato che una maggiore persistenza e proliferazione in vivo delle cellule NK sono associate a migliori risultati clinici. Pertanto, una bassa persistenza in vivo potrebbe portare a recidive precoci. Inoltre, una breve vita delle cellule NK può limitare la loro espansione ex vivo durante la produzione, rendendo difficile ottenere un numero sufficiente di cellule per la terapia e riducendo il tempo per ottimizzarle geneticamente. Allungare la durata dell'attività delle cellule potrebbe aumentare l'efficacia delle terapie con CAR-NK.

A differenza delle cellule T, che possono persistere per lunghi periodi, la vita delle cellule NK umane non è definita chiaramente, ma può essere manipolata in vitro. Le cellule NK coltivate con specifici supporti e citochine possono espandersi rapidamente per diverse settimane senza mostrare segni di invecchiamento. Tuttavia, senza stimoli continui, possono diventare inattive e subire un invecchiamento dopo un periodo prolungato di proliferazione. In vivo, le cellule NK mature richiedono un costante supporto di citochine per rimanere attive, altrimenti scompaiono dal circolo dopo poche settimane. Anche le cellule NK umane si espandono e attivano sopravvivono solo per un breve periodo in topi immunodeficienti, a meno che non siano ingegnerizzate per esprimere citochine come l'IL-15.

#### **4.9.5. IL MICROAMBIENTE TUMORALE**

Come già visto in precedenza è stato dimostrato che la terapia CAR-NK rispetto a quella con CAR-T presenta numerosi vantaggi. Tuttavia ci sono importanti limitazioni da considerare poiché molti svantaggi che presentano le CAR-T si applicano anche alle cellule CAR-NK. Dall'identificazione dell'antigene bersaglio, alla variabilità dell'antigene, alla progettazione del costrutto, alla fase di produzione e alle difficoltà dopo l'infusione. Inoltre, le cellule NK si distinguono per un'emivita breve (< 10 giorni), il che può essere vantaggioso in caso di tossicità grave ma rappresenta anche una sfida poiché potrebbe richiedere somministrazioni ripetute per mantenere una risposta efficace nel tempo. In aggiunta la sovrastimolazione può portare all'esaurimento reversibile delle cellule NK durante la progressione tumorale, caratterizzato da una compromissione delle funzioni effettive e da un fenotipo alterato, simile a quanto osservato nelle cellule T. Si è notato, inoltre, come gli inibitori dei checkpoint immunitari siano in grado di ridurre l'attività citotossica delle cellule NK tramite interazioni dirette cellula-cellula e come l'espansione ex vivo delle cellule NK possa aumentare l'espressione di alcuni recettori checkpoint immunitari, riducendo l'efficacia della terapia con CAR-NK. Le cellule NK dei pazienti e quelle trasformate con CAR-NK possono trovarsi in un ambiente tumorale ostile, caratterizzato da cellule immunosoppressive e fattori solubili, che compromettono ulteriormente la loro efficacia. [46]

#### **4.10. OTTIMIZZAZIONE DELLA TERAPIA CAR-NK**

Al fine di sopperire ad alcune limitazioni che caratterizzano la terapia CAR-NK sono stati sviluppati dei metodi di ottimizzazione. Una delle principali strategie proposte per migliorare la persistenza delle CAR-NK è focalizzata sul targeting di checkpoint immunitari inibitori.

In particolare attraverso varie sperimentazioni si è potuto constatare come la rimozione o la disattivazione di PD-1 (KO) nelle cellule NK abbia aumentato la loro attività antitumorale in un modello di xenotrapianto di carcinoma ovarico. Gli stessi ricercatori hanno testato l'efficacia delle cellule NK di PD-1 KO contro linee cellulari di LMC, LMA e MM in vitro, dimostrando una risposta potenziata mediante l'uso di anticorpi bloccanti PD-1. Questa strategia suggerisce che il blocco di questo recettore potrebbe rappresentare un'opzione promettente per migliorare l'efficacia delle CAR-NK contro i tumori del sangue.

TIM-3 rappresenta un altro recettore del checkpoint espresso dalle cellule NK, si identifica come un marcatore di disfunzione quando le cellule NK positive per TIM-3 incontrano tumori che esprimono i suoi ligandi, come il glioblastoma o i blasti di leucemia mieloide acuta. Le cellule NK prive di TIM-3 hanno dimostrato di mediare una maggiore citotossicità in vitro. Un approccio analogo, basato su CRISPR/Cas9, è stato impiegato anche per il recettore Siglec-7, il quale induce l'inibizione delle cellule NK quando si lega a specifici glicani sialilati presenti sulle cellule tumorali. Ciò ha portato a un aumento dell'efficacia antitumorale delle cellule NK contro le linee cellulari del mieloma multiplo che esprimono il ligando Siglec-7.

Un ulteriore recettore immunologico implicato nel controllo del sistema immunitario viene definito TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*). Attraverso il legame con il suo ligando, il CD155, TIGIT inibisce l'attivazione delle cellule T e NK, in modo tale da ridurre la loro capacità di rispondere agli agenti patogeni. Pertanto, è stato ipotizzato che un blocco di TIGIT con anticorpi monoclonali potrebbe comportare un prolungamento della persistenza delle NK e della capacità antitumorale.

La focalizzazione su segnali inibitori delle cellule NK costituisce un'importante strategia terapeutica, volta a bloccare o neutralizzare i segnali che diminuiscono l'attività delle cellule NK. Ciò avviene tramite l'utilizzo di KIR o inibitori di NKG2A, con l'obiettivo di potenziare l'efficacia delle cellule NK contro i tumori ematologici e solidi.

Come già discusso in precedenza, l'esaurimento delle cellule NK costituisce una delle principali sfide e limitazioni di questo nuovo approccio immunoterapico. Per prevenire un consumo eccessivo, si è suggerito che il mirare ai checkpoint immunitari legati alle citochine potrebbe offrire una soluzione promettente. Diverse proteine, inclusi i soppressori della segnalazione delle citochine come SOCS1-7 e CIS, regolano in modo negativo la segnalazione delle citochine attraverso la via JAK/STAT nelle cellule NK.

Questi recettori vengono stimolati da citochine come IL-2 e IL-15, le quali sono spesso utilizzati nei protocolli di espansione in vitro delle cellule NK, come già trattato in precedenza. Di conseguenza, bloccare l'azione di tali recettori potrebbe migliorare l'efficacia e la persistenza delle cellule NK. Ricerche condotte in vari laboratori hanno dimostrato come l'eliminazione di CISH nelle cellule NK, riesca a migliorare la loro capacità citotossica. Successivamente è stato evidenziato come una espressione dell'IL-15 da parte delle cellule

CAR-NK CD19 possa favorire un'espansione e una citotossicità superiore contro le linee cellulari leucemiche, dimostrando che questo effetto è in parte dovuto a un incremento dell'attività metabolica delle cellule CAR-NK. In modo simile, l'interferenza con SOCS3, una diversa proteina che inibisce la segnalazione delle citochine, ha generato cellule NK che mostrano una maggiore capacità di crescita e una più efficace azione contro i tumori.

Una delle sfide principali nella terapia CAR, soprattutto per quanto riguarda i tumori solidi, consiste nel superare l'ambiente immuno-soppressivo che si forma attorno al tumore. Nonostante si sia dimostrato che questo effetto possa essere causato da differenti tipi di cellule, il TGF- $\beta$  sembra essere un regolatore chiave della TME. Svariati team hanno già effettuato con successo modifiche alle cellule CAR-NK, per eliminare il recettore TGF $\beta$ -R2 (recettore del fattore di crescita trasformante beta di tipo 2), rendendole resistenti all'inibizione del TGF- $\beta$  in vitro. Questa strategia, basata sul blocco del legame fra il TGF- $\beta$  e il suo recettore, ha portato a un miglior controllo dei tumori, inclusi quelli notoriamente difficili da trattare come l'adenocarcinoma prostatico o il glioblastoma. Inoltre, è emerso che l'eliminazione di CD9 e CD103 (ligandi di superficie nelle cellule NK) riesca ad inibire il rilascio di TGF- $\beta$ 1 da parte delle cellule staminali del glioblastoma e aumentare l'effetto citotossico di NK.

Un altro problema da considerare nella terapia con CAR-T e NK è che talvolta le molecole CAR non hanno come bersaglio esclusivamente gli antigeni tumorali delle cellule maligne, ma anche quelli espressi nelle cellule NK utilizzate nella terapia, causando la loro distruzione e, di conseguenza, una risposta ridotta al trattamento a causa della perdita delle cellule effettive. L'obiettivo preposto fu quello di eliminare i recettori mirati dalle CAR nelle cellule CAR-NK al fine di sviluppare un prodotto immunoterapico efficace, soprattutto nei tumori del sangue. La formazione del costrutto CD70-CAR-NK rappresentò infatti una promettente terapia sia per i tumori solidi che per quelli del sangue anche se emerse che durante la coltura e l'attivazione in vitro, il gene CD70 risultò sovra espresso nelle cellule NK, causando il loro auto danneggiamento. Per questo motivo attraverso l'eliminazione del gene CD70 nelle cellule NK utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas9, sono state ottenute cellule resistenti all'auto-distruzione senza compromettere la loro capacità citotossica. Un approccio simile è stato utilizzato per eliminare il gene CD38 nelle cellule CD38-CAR-NK, riducendo così la morte cellulare dovuta all'auto-danneggiamento e potenziando l'azione citotossica contro le cellule tumorali. Nei pazienti con mieloma multiplo, dove il gene CD38 è ampiamente

espresso nelle cellule tumorali, l'uso del farmaco daratumumab porta a una significativa perdita di cellule NK a causa dell'auto-distruzione. Tuttavia, le cellule NK prive del gene CD38 hanno dimostrato di resistere all'auto-danneggiamento indotto dal daratumumab, mostrando un migliore profilo metabolico e un'azione citotossica potenziata contro le cellule tumorali. Attualmente, è in corso uno studio clinico per valutare l'efficacia delle cellule FT576 (cellule BCMA CAR NK derivate da iPSC), che sono state modificate per esprimere un recettore specifico per il mieloma multiplo e prive del gene CD38, in combinazione con altri farmaci. Questi risultati offrono nuove opportunità per ottimizzare le cellule CAR-NK in fase di sviluppo per trattare i tumori del sangue e altri bersagli cellulari espressi anche nelle cellule NK, come precedentemente dimostrato nelle cellule CAR-T.

La regolazione del metabolismo tumorale rappresenta un'ulteriore strategia volta a potenziare l'azione delle cellule CAR-NK. In situazioni di ipossia, l'adenosina viene prodotta sfruttando il metabolismo dell'ATP attraverso l'azione di CD39 e CD73. Questi enzimi sono implicati nel processo di evasione immunitaria, ostacolando il traffico delle cellule NK verso i siti tumorali e inibendo la loro maturazione. In aggiunta, è stato dimostrato che l'utilizzo di anticorpi anti-CD39 e anti-CD73 usati per bloccare l'azione dell'adenosina ha dimostrato di essere efficace nel potenziare gli effetti della terapia mirata per il carcinoma ovarico. CD73 potrebbe rappresentare un bersaglio significativo per il trattamento di vari tumori solidi come il glioblastoma, il carcinoma prostatico e il cancro ai polmoni, dato che è fortemente espresso in tali tumori. Ulteriore miglioramento è stato riscontrato con l'impiego dell'anticorpo anti-CD73 poiché le cellule CAR-NK ingegnerizzate con il recettore NKG2D hanno mostrato risultati promettenti nel trattamento del cancro ai polmoni. [47]

La difficoltà di traffico e homing verso il midollo osseo e i linfonodi rappresenta una delle sfide principali dell'immunoterapia CAR. Dalle ricerche cliniche emerge che una migliore distribuzione delle cellule NK nel midollo osseo può essere associata a un migliore controllo della malattia nei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta e da altre neoplasie residenti nel midollo osseo. Attualmente, diverse strategie volte a mantenere o potenziare l'espressione di chemochine o recettori di adesione nelle cellule CAR-NK sono oggetto di studio in modelli preclinici, con l'obiettivo di migliorarne la localizzazione nel midollo osseo e nei linfonodi.

I principali recettori delle chemochine espressi dalle popolazioni NK che influenzano la distribuzione delle stesse includono CXCR4, CXCR3, CCR3, CCR5 e CX3CR1. La chemochina CXCL12, che si lega a CXCR4, è abbondantemente espressa nel mieloma multiplo dalle cellule stromali endoteliali e del midollo osseo, così come in casi di leucemia e linfoma. In modo simile, nei pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta, leucemia mieloide acuta, linfoma e mieloma multiplo, la nicchia del midollo osseo mostra spesso un'elevata espressione di CXCL9 e/o CXCL10, che sono ligandi di CXCR3. È importante notare che CXCL9 e CXCL10, essendo ligandi di CXCR3, sono considerati chemochine immunosoppressive coinvolte nei meccanismi di resistenza al mieloma multiplo. Inoltre, il fattore inibitorio della migrazione dei macrofagi (MIF) può legarsi sia a CXCR4 che a CXCR7 ed è stato rilevato in livelli elevati nel midollo osseo del mieloma multiplo. Infine, CCL19 e CCL21, ligandi chemochinici di CCR7, facilitano l'ingresso delle cellule della leucemia linfoblastica cronica nei linfonodi, dove queste cellule si trovano frequentemente.

Una strategia ideale sembrerebbe quella di modificare l'espressione dei recettori delle chemochine nelle cellule NK trasferite in adozione. Attraverso numerosi studi è emerso come CXCR4 sia espresso maggiormente nelle cellule NK derivate da UCB rispetto a quelli nelle cellule PB-NK, suggerendo una migliore capacità di homing del midollo osseo. Per questo motivo sono state formulate alcune strategie al fine di migliorare il traffico di NK verso questa nicchia. Le cellule NK umane modificate per esprimere CXCR4 tramite un metodo lentivirale bicistronico hanno mostrato un incremento significativo nella loro capacità di migrare verso le cellule tumorali CD19 rispetto alle cellule NK umane con CAR CD19, aumentando di oltre il doppio la migrazione.

L'aumento dell'espressione del recettore CXCR4R334X tramite elettroporazione su cellule BCMA-CAR-NK ha dimostrato di migliorare la migrazione in vivo verso il midollo osseo e di aumentare la sopravvivenza nei topi affetti da mieloma, rispetto alle sole cellule anti-BCMA-CAR-NK.

Attraverso l'interazione con i ligandi CCL19 e CCL21, il recettore CCR7 è noto per favorire la migrazione delle cellule NK verso i linfonodi. Tuttavia, è stata osservata una sotto regolazione di CCR7 in seguito all'espansione ex vivo, risolta efficacemente utilizzando IL-18. Per potenziare il targeting dei linfonodi da parte delle cellule NK trasferite adottivamente, è stato impiegato un approccio in cui le cellule acquisiscono CCR7 tramite trogocitosi (processo mediante il quale una cellula assorbe parti di un'altra cellula

circostante) dalle cellule feeder K562 in topi nudi atimici. Inoltre, l'elettroporazione di mRNA CCR7 è stata impiegata con successo per aumentare la migrazione in risposta alle chemochine CCL19 e CCL21. Le cellule NK con CAR anti-CD19 trasfettate con CCR7 hanno dimostrato un aumento fino a 5 volte nell'abilità di uccidere i tumori CD19 e fino a 6 volte nella loro capacità migratoria in risposta alle chemochine CCL19 e CCL21.

Un ulteriore metodo impiegato mira a ridurre l'espressione di CCR5 nelle cellule NK espanse ex vivo diminuendo il loro sequestro da parte del fegato dopo l'infusione endovenosa di immunoterapia adottiva e favorendo la permanenza delle cellule NK nel circolo sanguigno. Poiché l'espressione di CCR5 aumenta durante l'espansione ex vivo delle cellule NK trasferite adottivamente, questa strategia potenzia la capacità di indirizzare il traffico delle cellule NK in vivo.

Ulteriore miglioramento proposto vede l'utilizzo dell'editing genetico CRISPR per influenzare il movimento delle cellule NK poiché il ruolo della segnalazione delle chemochine nella distribuzione delle CAR-NK è significativo e influenza l'efficacia antitumorale, a seconda della localizzazione del tumore. È stato dimostrato che l'interruzione del recettore CCR5 mediante CRISPR/Cas9 ha alterato il percorso migratorio delle cellule NK nel corpo, riducendo il loro arrivo al fegato e aumentando l'attraversamento verso il midollo osseo. Questo approccio potrebbe rappresentare una strategia per guidare le CAR-NK verso i tumori localizzati nel midollo osseo e migliorarne l'efficacia contro le neoplasie ematologiche. Strategie simili di knock-out o addirittura knock-in potrebbero essere utilizzate per influenzare o esprimere altri recettori delle chemochine sulla superficie delle CAR-NK, indirizzandole così al sito tumorale. Un esempio di questa strategia è stato condotto sulle cellule NK-92, dove l'aumento dell'espressione dei recettori delle chemochine, come il CXCR2, e di IL-2 mediante l'editing genetico HDR ha aumentato la capacità di migrazione delle NK92 verso i tumori e migliorato la loro capacità di ridurre la crescita tumorale in vivo in un modello di cancro del colon umano. [46]

#### **4.11. PROSPETTIVE FUTURE: I TUMORI SOLIDI**

Un numero sempre maggiore di ricerche condotte in laboratorio e su modelli animali ha dimostrato l'efficacia delle cellule CAR-NK nel contrastare i tumori solidi, in particolare, l'uso del costrutto CAR-NK si è rivelata una tecnica promettente per il trattamento del glioblastoma (GMB), del tumore alla mammella, all'ovaio e al pancreas.

#### **4.11.1. IL TUMORE DELLA MAMMELLA**

In modelli in vitro e in vivo le cellule CAR-NK si sono dimostrate efficaci contro il cancro della mammella attraverso la formazione di un costrutto CAR, definito CD28.4-1BB.CD3 $\zeta$  diretto verso il fattore tissutale (TF) bersaglio antigenico risultato essere presente nel 50-85% delle pazienti affette da carcinoma mammario triplo negativo. Il costrutto è stato successivamente trasdotto in cellule NK-92MI appartenenti a linee immortalizzate prive del recettore CD16. È stato evidenziato come nei modelli di xenotrapianto derivati dal tumore, le cellule CAR-NK progettate, abbiano una maggiore attività antitumorale contro le cellule che esprimono TF, oltre a mantenere un'attività citotossica rispetto alle cellule NK-92MI non modificate utilizzate come gruppo di controllo.

Un altro antigene identificato sulla superficie di numerose cellule tumorali è l'EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), che rappresenta un bersaglio per le cellule CAR-NK. Queste cellule hanno dimostrato una citotossicità potente e il rilascio di citochine, come l'IFN- $\gamma$ , la perforina e il granzima B, contro le linee cellulari del cancro del colon-retto e del carcinoma mammario che esprimono l'antigene. In aggiunta le cellule NK92 che sono state modificate per esprimere CAR e IL-15 dirette contro l'EpCAM hanno mostrato una citotossicità selettiva e superiore rispetto alle cellule NK92 non modificate.

#### **4.11.2 CANCRO DEL PANCREAS**

L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) è caratterizzato da un tessuto connettivo immunosoppressivo, il quale può raggiungere fino al 70% del volume del tumore. Di conseguenza a causa della complessità dello stroma la maggior parte degli studi in vivo non sono stati soddisfacenti. Attraverso la produzione di costrutti CAR-NK, diversi sforzi sono stati compiuti per affrontare la sfida rappresentata dal PDAC. Una ricerca ha individuato il recettore dei folati  $\alpha$  (FR $\alpha$ ) e il recettore di morte 4/5 (DR4/5) come obiettivi promettenti per la terapia cellulare CAR-NK, essendo sovra espressi. Questo studio ha dimostrato l'efficacia notevole della proteina TRAIL diretta verso FR $\alpha$ , mediante l'impiego di costrutti CD3 $\zeta$ .CAR-NK92 in modelli murini di xenotrapianto in vitro e in vivo di cancro al pancreas. Allo stesso modo, sono state esaminate le cellule CAR-NK mirate a MUC-1 in contesti preclinici, che hanno poi portato allo studio clinico di fase I nel 2017 (NCT02839954). Questo studio ha coinvolto l'uso di costrutti CAR derivati da CD28 e 4-1BB in cellule CAR-NK dirette sia contro MUC1 che contro PD-1. Tra i pazienti trattati, la maggior parte dei

quali affetti da vari tipi di cancro con espressione positiva di PD-1 e MUC1, 7 pazienti su 8 hanno registrato una malattia stabile senza gravi eventi avversi. Tali risultati hanno successivamente portato ad uno studio clinico di fase I/II per pazienti con diversi tipi di tumori con espressione di MUC-1.

Un altro obiettivo promettente per la terapia con CAR-NK è ROBO-1, recettore coinvolto nella regolazione e nella crescita delle cellule nervose durante lo sviluppo embrionale. È stato dimostrato attraverso recenti studi che ROBO-1 è sovra espresso in diversi tipi di tumori, inclusi quelli pancreatici, e per questo motivo è stato considerato un possibile bersaglio per le terapie antitumorali. La terapia CAR-NK mirata a ROBO-1 è stata esaminata attraverso l'uso di modelli murini ortotopici di carcinoma pancreatico. Lo studio ha coinvolto tre gruppi di animali: uno non trattato, un altro trattato con frammenti di 125I (iodio-125) impiantati nel tumore e un terzo gruppo che ha ricevuto una combinazione di trattamento di 125I insieme a infusione di cellule CAR-NK dirette contro ROBO-1. Attraverso questo studio è emersa una riduzione significativa del volume tumorale nel braccio di trattamento combinato rispetto alla sola brachiterapia (tecnica di radioterapia che permette di posizionare in modo localizzato e specifico delle sorgenti radioattive) con 125I.

Di particolare rilevanza è lo studio clinico che vede coinvolte le cellule CAR-NK dirette contro ROBO-1 sperimentato in un caso clinico di un paziente affetto da carcinoma pancreatico. Utilizzando cellule NK92 trasdotte con CD8 e CD3 $\zeta$ .4-1BB, si è potuto constatare una stabilizzazione della malattia per 5 mesi con un'efficienza del 90%, attraverso infusioni settimanali e iniezioni intra tumorali (nelle metastasi epatiche). Questo approccio ha portato un unico evento avverso caratterizzato da episodi di febbre post-infusione. Successivamente sono stati avviati tre studi clinici di fase I/II per valutare la sicurezza e l'efficacia della terapia CAR-NK diretta contro questo antigene nel carcinoma pancreatico e in altri tumori solidi che presentano un'espressione di ROBO-1 sulle cellule tumorali. Questi studi sono attualmente in corso in Cina e stanno reclutando pazienti (NCT03941457, NCT03940820, NCT03931720). In particolare, uno dei bracci sperimentali nello studio NCT03931720 prevede l'impiego di una singola dose di infusioni di CAR-NK senza una precedente terapia di condizionamento.

### **4.11.3. CARCINOMA OVARICO**

Anche il carcinoma ovarico è stato oggetto di numerosi studi per valutare l'efficacia della terapia cellulare CAR-NK. La formazione del costrutto CAR-NK92 diretto contro la mesotelina (MSLN) ha dimostrato una capacità di eliminazione efficace nel distruggere linee cellulari che esprimevano l'antigene (come OVCAR-3 e SKOV3) sia in modelli murini sottocutanei che intraperitoneali, portando a un prolungamento della sopravvivenza nei topi coinvolti. In un altro studio, la terapia cellulare CAR-NK ha come bersaglio il recettore CD24 situato sulle cellule di carcinoma ovarico. Anche la formazione del costrutto anti-CD24.CAR-NK92 si è dimostrato molto attivo contro le linee cellulari di carcinoma ovarico che esprimono CD24 (come SKOV3, OVCAR-3). Infine, è stato osservato che un approccio dual-CAR che vede l'impiego di cellule NK92 che esprimono CD28.4-1BB.CAR diretto contro CD24 e MSLN garantisca un rendimento maggiore in vitro.

Le cellule CAR-NK92 dirette verso l'antigene  $\alpha$ FR, presente anche nel carcinoma pancreatico, hanno dimostrato efficacia nel contrastare i modelli di carcinoma ovarico attraverso l'eliminazione di questo bersaglio, rilevabile nel 90% dei casi. Tra i tre costrutti CAR testati: anti- $\alpha$ FR.CD3 $\zeta$ , anti- $\alpha$ FR.CD28.CD3 $\zeta$  e anti- $\alpha$ FR.CD28.4-1BB.CD3 $\zeta$  - quest'ultimo ha mostrato una maggiore citotossicità seguita da una migliore degranolazione e secrezione di citochine. Inoltre nei modelli murini di xenotrapianto, è emerso che la terapia anti- $\alpha$ FR.CD28.4-1BB.CD3 $\zeta$ .CAR-NK92 ha portato a un significativo prolungamento della sopravvivenza. [48]

### **4.11.4. ALTRI TUMORI**

I recenti sviluppi nelle terapie CAR-NK sono attualmente oggetto di indagine per ampliare le possibilità nel trattamento dei tumori solidi. Le cellule NK, come già evidenziato in precedenza, sono caratterizzate da numerosi vantaggi, tra cui il riconoscimento non MHC-limitato, l'abilità di infiltrarsi nei tessuti tumorali, la capacità citolitica e i minimi effetti collaterali (ad esempio, CRS, malattia del trapianto contro l'ospite (GvHD) e sindrome da neurotossicità associata alle cellule effettrici immunitarie (ICANS)). Di conseguenza, le cellule CAR-NK rappresentano una prospettiva terapeutica promettente per il trattamento dei tumori solidi. Al giorno d'oggi, è possibile accedere a diversi studi clinici che impiegano prodotti a base di cellule CAR-NK, derivate da linee cellulari immortalizzate NK92, PB-NK e UCB-NK con crescente interesse verso alcuni antigeni che sono comunemente bersagliati

nei tumori come ROBO1, NKG2D, MSLN, HER2, MICA/B, PSMA, 5T4, MUC1 e claudin6, registrati in ClinicalTrials.gov.

Riassunti nelle Tabelle sottostanti sono evidenziati i principali studi clinici di fase 1/2 con i rispettivi costrutti utilizzati, gli antigeni bersaglio, la malattia in cui sono stati impiegati e la fonte di cellule NK.

Come precedentemente osservato ROBO1 è un antigene bersaglio utilizzato per colpire diversi tumori. Nel dettaglio è stato dimostrato nello studio clinico di fase 1 NCT03940820 come ROBO1 sia espresso in vari tumori solidi, in particolare nel cancro del pancreas. Lo studio clinico ha mostrato una significativa diminuzione delle dimensioni e del volume del tumore nel modello murino ortotopico di cancro al pancreas trattato con CAR-NK anti-ROBO1. Sempre facendo riferimento alle tabelle riportate, altri bersagli impiegati comprendono il PSMA per il cancro alla prostata (NCT03692663), MSLN per il carcinoma ovarico epiteliale (NCT03692637) e Claudin6 mirato per neutralizzare il cancro dell'ovaio, del testicolo e dell'endometrio refrattario. Altresì lo studio NCT05410717, è una ricerca di fase 1/2 con un solo gruppo di trattamento, che sta valutando la sicurezza e la possibilità di utilizzare cellule CAR-NK autologhe mirate alla Claudina 6 (CLDN6) in pazienti con tumori solidi avanzati che presentano questo antigene, come tumori ovarici e testicolari. Le cellule prelevate direttamente dal paziente CLDN6-CAR-NK sono state ingegnerizzate per esprimere CCL19, IL7 e scFv mirando a PD-1/CTLA-4/Lag-3 al fine di aumentare l'efficacia antitumorale contro i tumori solidi CLDN6 positivi. In aggiunta ci sono altri studi clinici che stanno esaminando l'efficacia della terapia cellulare con CAR-NK92 in diverse condizioni. Uno di questi studi (NCT03383978) si concentra sulla terapia CAR-NK mirata a HER2 per il trattamento del glioblastoma, mentre un altro studio (NCT03656705) esplora l'utilizzo di CAR-NK con recettore chimerico di conversione co-stimolatoria (CCCR) per il carcinoma polmonare non a piccole cellule. Come già menzionato in precedenza lo studio NCT02839954 si occupa di dimostrare come le cellule CAR-NK specifiche per MUC-1 siano concepite per il trattamento di tumori solidi multipli recidivanti o refrattari. Lo studio, che indaga la sicurezza e l'efficacia delle cellule CAR-NK anti-MUC1 in pazienti con tumori come GBM, HCC, cancro al seno, pancreas, gastrico e colon rettale, ha dimostrato che degli 8 pazienti valutati, sette hanno raggiunto una malattia stabile senza eventi avversi gravi.

Un ulteriore studio denominato NCT03941457 vede l'uso di una terapia di combinazione che impiega costrutti biCAR-NK-92 anti-ROBO1 in pazienti affetti da carcinoma

pancreatico. Successive sperimentazioni cliniche comprendono lo studio NCT05528341 il quale ha investigato gli effetti delle cellule NKG2D CAR-NK92 nel trattamento dei tumori solidi recidivanti/refrattari e un trial clinico di fase I NCT03415100 volto a reclutare pazienti con tumori solidi metastatici al fine di esaminare la sicurezza delle cellule CAR-NK allogeniche o autologhe, trasfettate mediante elettroporazione dell'mRNA per mirare ai ligandi NKG2DL. In ultima analisi sono presenti due studi clinici di fase I denominati NCT05137275 e NCT05194709 che hanno come bersaglio l'antigene oncofetale 5 T4 risultato essere espresso nei tumori solidi avanzati o metastatici. [49]

Prodotto CAR-NK	Identificatore dello studio clinico	Antigene mirato	Malattia	Fonte cellulare	Fase di sperimentazione clinica
Celle ROBO1 CAR-NK	<a href="#">NCT03940820</a>	ROBO1	Tumore solido	Cellule NK primarie umane	Fase 1 Fase 2
Cellule MUC1 CAR-NK	<a href="#">NCT02839954</a>	MUC1	Tumore solido recidivante o refrattario MUC1 positivo	Cellule NK primarie umane	Fase 1 Fase 2
Cellule BiCAR-NK Cellule ROBO1 CAR-NK	<a href="#">NCT03941457</a>	ROBO1	Cancro al pancreas	Linea cellulare NK92	Fase 1 Fase 2
Claudin6 cellule CAR-NK	<a href="#">NCT05410717</a>	Claudin6	Carcinoma ovarico in stadio IV Cancro del testicolo Carcinoma endometriale refrattario	Cellule NK primarie umane	Fase 1 Fase 2

CCCR-NK92	<a href="#">NCT03656705</a>		Carcinoma polmonare non a piccole cellule	Linea cellulare NK-92	Fase 1
Cellule MUC1 CAR-pNK	<a href="#">NCT02839954</a>	MUC1	Carcinoma epatocellulare Carcinoma polmonare non a piccole cellule Carcinoma pancreatico Carcinoma mammario invasivo triplo negativo Glioma maligno del cervello Carcinoma coloretale Carcinoma gastrico	Linea cellulare NK92	Fase 1 Fase 2
Celle MICA/B CAR-NK	<a href="#">NCT05395052</a>	MICA/B	Carcinoma polmonare non a piccole cellule	Killer naturale allogenico	Fase 1
Celle NKG2D-CAR-NK92	<a href="#">NCT05528341</a>	NKG2D	Tumori solidi recidivanti/refrattari	Linea cellulare NK92	Fase 1
Celle NKG2DL CAR-NK	<a href="#">NCT03415100</a>	NKG2D	Tumori solidi metastatici	Cellule NK autologhe o allogeniche	Fase 1
5 T4 CAR-NK	<a href="#">NCT05194709</a>		Tumori solidi avanzati	N/A	Fase iniziale 1
5 cellule T4 CAR-NK	<a href="#">NCT05137275</a>	5 T4	Tumori solidi localmente avanzati o metastatici	N/A	Fase iniziale 1
Cellule CAR NK della mesotelina	<a href="#">NCT03692637</a>	Mesotelina	Carcinoma ovarico epiteliale	Cellule NK primarie umane	Fase iniziale 1
Cella PSMA CAR NK	<a href="#">NCT03692663</a>	PSMA (Registro delle Imprese)	Carcinoma prostatico metastatico resistente alla castrazione	Cellule NK primarie umane	Fase iniziale 1
HER2-CAR-NK	<a href="#">NCT03383978</a>	HER2	Glioblastoma	Linea cellulare NK92	Fase 1

Figura 4: Sperimentazioni cliniche di terapia cellulare CAR-NK nei tumori solidi (ClinicalTrials.gov). Maalej KM, Merhi M, Inchakalody VP, Mestiri S, Alam M, Maccalli C, Cherif H, Uddin S, Steinhoff M, Marincola FM, Dermime S. CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances. *Mol Cancer*. 2023 Jan 30;22(1):20. doi: 10.1186/s12943-023-01723-z. PMID: 36717905; PMCID: PMC9885707.

Ovviamente è necessario tenere presente che gli studi precedentemente elencati sono ancora in una fase di sperimentazione clinica iniziale, prevalentemente a causa della complessità di trattamento che caratterizza i tumori solidi e al fatto che la terapia in questione sia ancora emergente. Il microambiente tumorale condiziona l'impiego dell'uso di costrutti CAR a causa di fattori come l'ipossia, l'acidità, la presenza elevata di adenosina, i recettori di superficie delle cellule NK e il TGF- $\beta$  che impattano sull'azione e sull'efficacia antitumorale delle CAR-NK. Affrontare queste sfide potrebbe rivelarsi la strategia opportuna per contrastare l'evasione immunitaria attraverso la neutralizzazione dell'influenza inibitoria del TME unita al miglioramento della capacità di infiltrazione delle cellule CAR-NK nei tessuti. Tuttavia, è essenziale condurre ulteriori ricerche per ottimizzare le prestazioni di questa terapia, al fine di massimizzare il tasso di sopravvivenza e migliorare la qualità della vita dei pazienti.

## 5. CONCLUSIONI

Come si può evincere dall'elaborato la terapia con cellule CAR-NK si presenta come un'innovativa strategia finalizzata a fornire nuove speranze nella lotta contro il cancro. I risultati finora ottenuti e pubblicati dimostrano l'efficacia e il potenziale di questo approccio nel trattamento di diversi tipi di tumori, aprendo la strada a terapie personalizzate e mirate. Le cellule CAR-NK, ingegnerizzate per riconoscere e attaccare specifici antigeni, hanno dimostrato una notevole capacità di distruggere le cellule tumorali senza causare gravi effetti collaterali. Questo è particolarmente promettente, poiché risolve alcune delle sfide associate alle terapie convenzionali, come gli effetti collaterali relativi alla chemioterapia.

Tuttavia, nonostante i risultati incoraggianti, sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere appieno il potenziale delle cellule CAR-NK e ottimizzare le loro prestazioni. Studi approfonditi sono indispensabili per affrontare dubbi ancora presenti come la sicurezza, la durata della risposta terapeutica, la resistenza tumorale e la gestione degli eventuali effetti collaterali.

La ricerca futura dovrebbe esaminare approcci combinati che integrino la terapia CAR-NK con altre modalità di trattamento, come la chemioterapia, l'immunoterapia e la radioterapia, per massimizzare l'efficacia e ridurre la resistenza tumorale. È altresì essenziale continuare a investire in tecnologie innovative e infrastrutture di ricerca per consentire lo sviluppo e la produzione su larga scala delle cellule CAR-NK, rendendo questa terapia accessibile a un numero sempre maggiore di pazienti.

In conclusione, mentre ci si avventura nel futuro della terapia CAR-NK, è necessario abbracciare un impegno continuo verso la ricerca, l'innovazione e la collaborazione.

Solo attraverso uno sforzo congiunto e una dedizione costante sarà possibile sfruttare pienamente il potenziale di questa straordinaria modalità di trattamento.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] «Jan Černý, Ilja Stříž; Adaptive innate immunity or innate adaptive immunity?. *Clin Sci (Lond)* 31 July 2019; 133 (14): 1549–1565. doi: <https://doi.org/10.1042/CS20180548>».
- [2] «Schreiber RD, Vecchio LJ, Smyth MJ. Immunoediting del cancro: integrare il ruolo dell'immunità nella soppressione e nella promozione del cancro. *Scienza*. 25 marzo 2011; 331(6024):1565-70. DOI: 10.1126/science.1203486. PMID: 21436444.».
- [3] «Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Immunità naturale innata e adattativa al cancro. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324. PMID: 21219185.».
- [4] «Jacobs JF, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJ, Adema GJ. Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol*. 2012 Jan;13(1):e32-42. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70155-3. PMID: 22225723.».
- [5] «Zou W. Cellule T regolatorie, immunità tumorale e immunoterapia. *Nat Rev Immunol*. 2006 aprile; 6(4):295-307. DOI: 10.1038/nri1806. PMID: 16557261.».
- [6] R. E. P. G. T. W. S. J. E. E. L. T. D. W. W. R. K. H. S. E. H. K. G. A. A. A. H. W. B. C. G. G. C. M. C. S. M. S. A. A. K. W. B. A. B. Vinay DS, « Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. 2015 Dec;35 Suppl:S185-S198. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25818339.».
- [7] «Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Strategie immunosoppressive mediate dalle cellule tumorali. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-96. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609. PMID: 17134371; PMCID: PMC2895922.».
- [8] R. E. P. G. T. W. S. J. E. E. L. T. D. W. W. R. K. H. S. E. H. K. G. A. A. A. H. W. B. C. G. G. C. M. C. S. M. S. A. A. K. W. B. A. B. Vinay DS, «Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. 2015 Dec;35 Suppl:S185-S198. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25818339.».
- [9] «Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-96. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609. PMID: 17134371; PMCID: PMC2895922.».
- [10] B. I. T. E. A. J. L. H. Sotomayor EM, «In vivo blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11476-81. doi: 10.1073/pnas.96.20.11476. PMID: 10500201;».
- [11] «Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996 Mar 22;271(5256):1734-6. doi: 10.1126/science.271.5256.1734. PMID: 8596936.».

- [12] «Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:267-96. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609. PMID: 17134371; PMCID: PMC2895922.».
- [13] R. R. F. M. S. A. D. R. H. M. G. H. Mehrabadi AZ, «Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: A scoping review. *Biomed Pharmacother.* 2022 Feb;146:112512. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112512. Epub 2021 Dec 9. PMID: 34894519.».
- [14] L. J. K. J. Zheng PP, «Breakthroughs in modern cancer therapy and elusive cardiotoxicity: Critical research-practice gaps, challenges, and insights. *Med Res Rev.* 2018 Jan;38(1):325-376. doi: 10.1002/med.21463. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28862319; PMCID: PMC5763363.».
- [15] «Mishra AK, Ali A, Dutta S, Banday S, Malonia SK. Emerging Trends in Immunotherapy for Cancer. *Diseases.* 2022 Sep 6;10(3):60. doi: 10.3390/diseases10030060. PMID: 36135216; PMCID: PMC9498256.».
- [16] L. A. R. C. S. P. P. S. Michielin O, «Defining unique clinical hallmarks for immune checkpoint inhibitor-based therapies. *J Immunother Cancer.* 2022 Jan;10(1):e003024. doi: 10.1136/jitc-2021-003024. Erratum in: *J Immunother Cancer.* 2022 Dec;10(12): PMID: 35078922; PMCID: PMC8796265.».
- [17] «Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep.* 2018 Dec;45(6):2935-2940. doi: 10.1007/s11033-018-4427-x. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30311129.».
- [18] K. K. G. A. R. A. S. V. Chulpanova DS, «Molecular Aspects and Future Perspectives of Cytokine-Based Anti-cancer Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jun 3;8:402. doi: 10.3389/fcell.2020.00402. PMID: 32582698; PMCID: PMC7283917.».
- [19] «Zheng M, Huang J, Tong A, Yang H. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances. *Mol Ther Oncolytics.* 2019 Nov 2;15:234-247. doi: 10.1016/j.omto.2019.10.007. PMID: 31872046; PMCID: PMC6911943.».
- [20] «Hollingsworth RE, Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ Vaccines.* 2019 Feb 8;4:7. doi: 10.1038/s41541-019-0103-y. PMID: 30774998; PMCID: PMC6368616.».
- [21] «Golay J, Taylor RP. The Role of Complement in the Mechanism of Action of Therapeutic Anti-Cancer mAbs. *Antibodies (Basel).* 2020 Oct 28;9(4):58. doi: 10.3390/antib9040058. PMID: 33126570; PMCID: PMC7709112.».
- [22] v. B.-B. M. H. A. Subklewe M, «Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Race to Revolutionize Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother.* 2019 Feb;46(1):15-24. doi: 10.1159/000496870. Epub 2019 Feb 5. PMID: 31244578; PMCID: PMC6558337.».
- [23] F. H. C. V. X. H. P. C. Z. Z. Pan K, «CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022 Mar 31;41(1):119. doi: 10.1186/s13046-022-02327-z. PMID: 35361234; PMCID: PMC8969382.».

- [24] S. D. R. J. E. A. W. K. F. T. L. D. M. C. C.-C. C. Allen ES, « Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. *Transfusion*. 2017 May;57(5):1133-1141. doi: 10.1111/trf.14003. Epub 2017 Feb 24. PMID: 28236305; PMCID: PMC5398918.».
- [25] R. I. G. M. W. X. S. B. C. K. S. C. W. Y. S. B. M. E. R. M. M. P. D. M. B. R. S. M. Park JH, «Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018 Feb 1;378(5):449-459. doi: 10.1056/NEJMoa1709919. PMID: 29385376; PMCID: PMC6637939.».
- [26] S. B. L. F. G. A. T. C. B. J. M. M. P. J. M. E. P. S. G. W. E. L. G. R. F. N. C. K. P. K. P. M. D. J. v. d. B. M. K. K. G. S. N. S. Lee DW, «ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 Apr;25(4):625-638. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.12.758. Epub 2018 Dec 25. PMID: 30592986.».
- [27] F. M. V. M. C. C. V. C. M. E. B. A. M. F. D. Z. G. P. G. M. M. L. F. M. L. Pende D, «Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol*. 2019 May 28;10:1179. doi: 10.3389/fimmu.2019.01179. PMID: 31231370; PMCID: PMC6558367.».
- [28] «Merino A, Maakaron J, Bachanova V. Advances in NK cell therapy for hematologic malignancies: NK source, persistence and tumor targeting. *Blood Rev*. 2023 Jul;60:101073. doi: 10.1016/j.blre.2023.101073. Epub 2023 Mar 12. PMID: 36959057; PMCID: PMC10979648.».
- [29] «Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., ... & Velardi, A. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 295(5562), 2097-2100.».
- [30] «Klingemann H, Boissel L, Toneguzzo F. Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Front Immunol*. 2016 Mar 14;7:91. doi: 10.3389/fimmu.2016.00091. PMID: 27014270; PMCID: PMC4789404.».
- [31] K. W. R. W. J. B. G. G. W. Gong Y, «Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2021 May 1;14(1):73. doi: 10.1186/s13045-021-01083-5. PMID: 33933160; PMCID: PMC8088725.».
- [32] F. H. C. D. M. M. L. T. E. P. L. W. C. D. Shimasaki N, «A clinically adaptable method to enhance the cytotoxicity of natural killer cells against B-cell malignancies. *Cytotherapy*. 2012 Aug;14(7):830-40. doi: 10.3109/14653249.2012.671519. Epub 2012 Mar 29. PMID: 22458956.».
- [33] D. Y. B. D. H. S. H. T. Z. J. P. Y. M. H. Y. L. G. K. H. X. D. S. Z. X. C. M. H. C. Y. J. Chu J, «CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia*. 2014 Apr;28(4):917-27. doi: 10.1038/leu.2013.279. Epub 2013 Sep 26. PMID: 24067492;».
- [34] Z. W. S. P. Z. H. F. W. Y. F. Z. T. H. H. Z. X. S. W. M.-Y. S. D. Y. Q. H. J. Jiang H, «Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple

- myeloma cells. *Mol Oncol.* 2014 Mar;8(2):297-310. doi: 10.1016/j.molonc.2013.12.001. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24388357; PMCID: PMC5528539.».
- [35] C. J. H. W. C. J. X. Y. L. H. Q. X. X. H. X. Z. L. M. Z. X. L. J. Xia W, «Engineering a HER2-CAR-NK Cell Secreting Soluble Programmed Cell Death Protein with Superior Antitumor Efficacy. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 6;24(7):6843. doi: 10.3390/ijms24076843. PMID: 37047817; PMCID: PMC10094803.».
- [36] S. A. S. N. W. W. R. C. H. N. L. H. Seidel D, «Disialoganglioside-specific human natural killer cells are effective against drug-resistant neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 May;64(5):621-34. doi: 10.1007/s00262-015-1669-5. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25711293.».
- [37] C. J. K. C. W. Z. J. W. Y. C. J. V. A. M. W. K. S. G. P. W. Q. H. X. N. I. C. E. G. I. J. K. B. C. M. Y. J. Han J, «CAR-Engineered NK Cells Targeting Wild-Type EGFR and EGFRvIII Enhance Killing of Glioblastoma and Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells. *Sci Rep.* 2015 Jul 9;5:11483. doi: 10.1038/srep11483. PMID: 26155832; PMCID: PMC4496728.».
- [38] P. A. F. G. C. D. D. P. A. B. V. Z. G. R. A. Montagner IM, «Anti-PSMA CAR-engineered NK-92 Cells: An Off-the-shelf Cell Therapy for Prostate Cancer. *Cells.* 2020 Jun 2;9(6):1382. doi: 10.3390/cells9061382. PMID: 32498368; PMCID: PMC7349573.».
- [39] C. H. C. M. Y. J. Yilmaz A, «Chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2020 Dec 7;13(1):168. doi: 10.1186/s13045-020-00998-9. PMID: 33287875; PMCID: PMC7720606.».
- [40] «Li H, Song W, Li Z, Zhang M. Preclinical and clinical studies of CAR-NK-cell therapies for malignancies. *Front Immunol.* 2022 Oct 24;13:992232. doi: 10.3389/fimmu.2022.992232. PMID: 36353643; PMCID: PMC9637940.».
- [41] M. G. M. F. a. P. B. Alberti, «I linfomi non Hodgkin.,» Medical Systems, 1993.
- [42] R. D. Gaidano G, « The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017;2017(1):329-337.».
- [43] A. Colombini, «Leucemia linfoblastica acuta dell'età pediatrica. RELAZIONI SESSIONE PLENARIA, 4(s2), s2.,» 2012.
- [44] «Basar R, Daher M, Rezvani K. Next-generation cell therapies: the emerging role of CAR-NK cells. *Blood Adv.* 2020 Nov 24;4(22):5868-5876. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002547. PMID: 33232480; PMCID: PMC7686910.».
- [45] M. D. B. P. M. H. T. P. B. R. N. K. L. O. B. T. P. K. M. N. V. K. I. N. C. A. C. K. D. M. H. C. C. E. K. P. M. R. N. S. N. Y. W. M. W. W. K. M. Liu E, «Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med.* 2020 Feb 6;382(6):545-553. doi: 10.1056/NEJMoa1910607. PMID: 32023374; PMCID: PMC7101242.».

- [46] G.-O. A. C. E. C. L. M.-M. E. E. J. L. A. R. P. M.-L. J. Valeri A, «Overcoming tumor resistance mechanisms in CAR-NK cell therapy. *Front Immunol.* 2022 Aug 3;13:953849. doi: 10.3389/fimmu.2022.953849. PMID: 35990652; PMCID: PMC9381932.».
- [47] L. K. C. A. M. S. Wang J, «Purinergic targeting enhances immunotherapy of CD73+ solid tumors with piggyBac-engineered chimeric antigen receptor natural killer cells. *J Immunother Cancer.* 2018 Dec 4;6(1):136. doi: 10.1186/s40425-018-0441-8. PMID: 30514403; PMCID: PMC6278070.».
- [48] «Wrona E, Borowiec M, Potemski P. CAR-NK Cells in the Treatment of Solid Tumors. *Int J Mol Sci.* 2021 May 31;22(11):5899. doi: 10.3390/ijms22115899. PMID: 34072732; PMCID: PMC8197981.».
- [49] M. M. I. V. M. S. A. M. M. C. C. H. U. S. S. M. M. F. D. S. Maalej KM, «CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances. *Mol Cancer.* 2023 Jan 30;22(1):20. doi: 10.1186/s12943-023-01723-z. PMID: 36717905; PMCID: PMC9885707.».

## RINGRAZIAMENTI

Desidero esprimere la mia più sincera gratitudine a tutte le persone che sono state al mio fianco in questi anni di università. Senza di voi non avrei saputo con chi lamentarmi.

Un grazie ai miei genitori per l'amore incondizionato che mi hanno sempre dato, per il supporto e per essere sempre stati presenti nella mia vita. In particolare un grazie alla mia mamma Lucia, che con tutte le materie che le ho ripetuto si è laureata anche lei. Non sarei mai riuscita a raggiungere questo traguardo senza la sua comicità e la sua capacità di sdrammatizzare ogni problema. Un grazie al mio papà Sisto, che ha sempre creduto in me e fin da piccola mi ha sempre spronato a dare il massimo. Vi ringrazio per avermi sempre sostenuta e permesso di seguire i miei sogni. Il mio più grande ringraziamento va a voi.

Un grazie al mio ragazzo Hamdi, che in questi 5 anni è stato ed è il sole che illumina le mie giornate. Sei sempre stato il mio punto di riferimento e la mia dose giornaliera di allegria. Grazie per il tuo sostegno costante e per avermi sempre fatta sentire capace di raggiungere i miei obiettivi. Sei la mia metà, la mia parte mancante, quella che riesce a rendermi una persona migliore. Ti amo.

Un grazie alla mia amica nonché sorella Jessica. “non è il sangue a fare di te una sorella, ma il modo in cui comprendi il mio cuore come se lo portassi nel tuo corpo”. Grazie per essere cresciuta con me e per dimostrarmi ogni giorno che non importa se saremo vicine o lontane, il filo che ci unisce è più resistente.

Un grazie speciale lo voglio dedicare ai miei nonni, a chi c'è, a chi se n'è andato e a chi, purtroppo, non ha fatto in tempo a conoscermi. Sono sicura che sareste stati fieri di me. Questo traguardo è anche vostro.

Infine voglio esprimere la mia più sincera gratitudine a tutte le persone che fanno parte della mia vita. Alcuni di voi mi hanno visto crescere fin da bambina, altri mi hanno conosciuta durante gli anni scolastici, e molti di voi, invece, sono diventati importanti in tempi più recenti. Tutti voi rappresentate un frammento prezioso del mosaico della mia vita, e insieme avete tessuto l'essenza di chi sono oggi. Orgogliosa di poter condividere questo traguardo con ognuno di voi.

Ultimo ma non meno importante il regalo più grande della mia vita, Aki. Quando torno a casa e mi corri incontro mi fai capire che non c'è posto dove vorrei essere se non con te.

