



Dipartimento di scienze e innovazione tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

ELABORATO FINALE

**Caratterizzazione immunofenotipica del prodotto di
aferesi mediante citofluorimetria a flusso: associazione
con risposta terapeutica, espansione in vivo delle cellule
CAR-T e tossicità immunomediata in una coorte
retrospettiva monocentrica**

Candidata: Irene Doglioli

Relatore: Professor Marco Ladetto

Correlatore: Dottoressa Maria Matilde Ciriello

Stage svolto presso l'Ente Azienda
Ospedaliero-Universitaria SS. Antonio e Cesare Arrigo

Anno accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE	
1.1 Il sistema immunitario	4
1.2 Cellule linfoidi	4
1.2.1 Recettori immunitari	5
1.2.2 I linfociti T	7
1.2.2.1 Sviluppo	7
1.2.2.2 Il TCR	9
1.2.2.3 CD4 e CD8	10
1.2.2.4 Le cellule della memoria	13
1.2.2.5 La sinapsi immunologica	14
1.2.2.6 Recettori costimolatori	15
1.2.2.7 Spegnimento della risposta linfocitaria	16
1.3 Cellule mieloidi	17
1.4 Neoplasie ematologiche	18
1.4.1 I linfomi	19
1.4.1.1 Linfomi di Hodgkin	19
1.4.1.2 Linfomi non Hodgkin	19
1.4.2 Le leucemie	21
1.4.3 Il mieloma multiplo	22
1.5 CAR-T	23
1.5.1 Struttura, generazioni ed evoluzione della terapia	23
1.5.2 Effetti avversi	27
1.5.3 Tipologie di costrutti	29
2 MATERIALI E METODI	32
2.1 Procedura di produzione	33
2.2 La citofluorimetria	36
2.3 Preparazione del campione	41
2.4 La citofluorimetria	45
3. SCOPO DELLA TESI	47

4. RISULTATI	48
5. DISCUSSIONE	53
5.1 Efficacia ed utilizzo nelle emopatie	53
5.2 Associazione tra fenotipo T dell'aferesi, risposta clinica e tossicità CAR-T	55
5.3 Prospettive future	59
6. BIBLIOGRAFIA	62

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Sistema immunitario

Il termine immunità ha storicamente assunto il significato di protezione dalle infezioni; le cellule e le molecole responsabili dell'immunità costituiscono il sistema immunitario e la loro risposta coordinata contro sostanze estranee viene chiamata risposta immunitaria. La funzione fisiologica dell'organismo è la difesa contro agenti patogeni, nonostante ciò anche agenti non infettivi estranei e cellule proprie maligne o danneggiate possono stimolare la risposta immunitaria. L'immunità innata è fondamentale nella difesa da agenti patogeni, prima che le risposte adattive si sviluppino, ed è mediata da meccanismi insediati ancora prima che l'infezione avvenga. Le cellule che ne fanno parte sono in grado di rispondere rapidamente e con risposte stereotipate, riconoscendo PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) e DAMP (Danger-Associated Molecular Patterns)¹. Fra i mediatori dell'immunità innata vediamo macrofagi e mastociti, neutrofili, eosinofili e basofili, cellule natural killer (NK) e cellule dendritiche. L'immunità adattiva è capace di adattarsi progressivamente al patogeno presentatole ed è stimolata dall'esposizione ad agenti infettivi, aumentando le sue capacità difensive ad ogni esposizione. Il sistema immunitario adattivo è in grado di riconoscere e reagire a numerose sostanze microbiche e non, convenzionalmente definite antigeni: molecole proteiche, lipoproteiche o glicoproteiche in grado di indurre una risposta immunitaria da parte dell'organismo dell'ospite in cui si trova. La risposta adattiva è mediata da cellule chiamate linfociti e dai loro prodotti: essi riconoscono un vasto numero di antigeni grazie a recettori altamente differenziati: rispettivamente T-Cell Receptor o TCR per i linfociti T e B-Cell Receptor o BCR per i linfociti B. Essi sono in grado di produrre una risposta altamente specifica, che verrà inoltre memorizzata nel caso di ripresentazioni antigeniche future^{2,3}.

1.2 Cellule linfoidi

La maturazione delle cellule B e T avviene negli organi linfoidi primari. Lo sviluppo dei linfociti B si verifica prima della nascita nel fegato del feto, dopodiché avviene nel midollo osseo e, nelle fasi finali, nella milza. I precursori dei linfociti

T caratterizzati dall'espressione del recettore $\gamma\delta$ traggono origine dal fegato fetale, mentre quelli destinati a esprimere il recettore $\alpha\beta$ derivano dalle cellule staminali ematopoietiche localizzate nel midollo osseo. Lo sviluppo dei progenitori linfoidi comuni verso la linea dei linfociti B o dei linfociti T dipende da regolatori trascrizionali che indirizzano lo sviluppo verso una delle due linee².

1.2.1 Recettori immunitari

I recettori immunitari costituiscono una famiglia particolare di complessi recettoriali generalmente formati da proteine integrali di membrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline. Il loro dominio extracellulare è responsabile del riconoscimento del ligando, mentre la coda citoplasmatica contiene residui tirosinici che contribuiscono alla trasduzione del segnale.

I motivi contenenti tirosina (figura 1) presenti nella porzione citoplasmatica delle proteine di segnalazione dei recettori immunitari appartengono generalmente a tre tipi differenti:

- I motivi di attivazione ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Si trovano nei recettori e nelle proteine associate coinvolte nell'attivazione cellulare. Quando attivati dal ligando vengono fosforilati da delle chinasi che ne reclutano altre a cascata, inducendo una modificazione conformazionale che promuove l'attivazione delle cellule immunitarie. Le regioni costanti citoplasmatiche dei linfociti T sono troppo corte per permettere la trasduzione del segnale, per questo la funzione è assegnata proprio ai motivi ITAM.
- I motivi di inibizione ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Inibiscono le risposte cellulari reclutando delle fosfatasi e contrastando quindi l'attivazione mediata dagli ITAM.
- I Motivi misti ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motifs). In alcuni casi funzionano come segnali inibitori reclutando fosfatasi (un caso esempio è quello del recettore PD-1 per la morte cellulare programmata), in altri determinano il passaggio funzionale tra il legame alle fosfatasi e quello alle chinasi.

Questi motivi sono tipicamente presenti sui recettori antigenici di linfociti T e B, sui recettori Fc delle cellule B e sui recettori attivatori e inibitori delle cellule T, B, e NK.^{4,5}

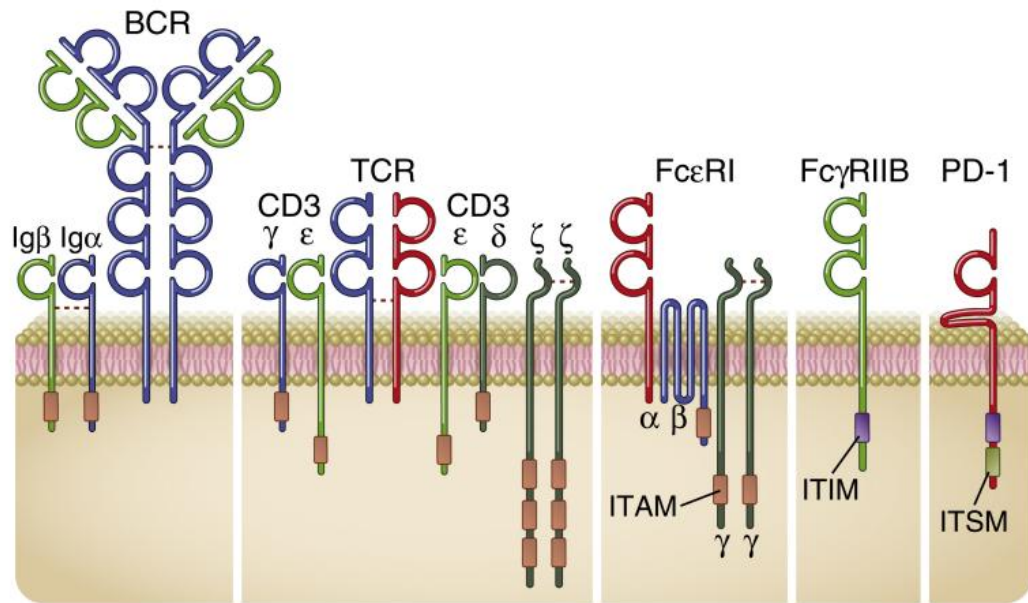


Fig. 1: Recettori immunitari ITAM, ITIM e ITSM², rispettivamente motivi di attivazione, inibizione e misti.

Le variazioni nell'intensità della segnalazione del TCR e del BCR influenzano le risposte dei linfociti durante il loro sviluppo e la loro attivazione. I linfociti interpretano in modo diverso la presenza di differenti quantità di molecole di segnalazione attivate, generate dal legame dell'antigene con i recettori. Durante il loro sviluppo un segnale debole del recettore antigenico è necessario per la sopravvivenza dei cloni che esprimono recettori funzionali (selezione positiva), mentre una segnalazione forte induce invece apoptosi nei cloni con recettori autoreattivi (selezione negativa). Nei linfociti maturi un segnale forte porta ad espansione clonale dei linfociti naïve, differenziamento cellulare e acquisizione di funzioni effettrici di difesa dell'ospite⁶.

1.2.2 I linfociti T

Lo sviluppo di linfociti T maturi a partire da progenitori già impegnati in questa linea cellulare comporta diversi processi sequenziali:

1. Riarrangiamento e l'espressione dei geni del TCR,
2. Proliferazione cellulare,
3. Selezione indotta dall'antigene,
4. Sviluppo in subset distinti fenotipicamente e funzionalmente.

1.2.2.1 Sviluppo

Il timo, il principale sito di maturazione delle cellule T, è un organo che va incontro a involuzione con l'avanzare dell'età e, dopo la pubertà, diventa pressoché non rilevabile, determinando una graduale riduzione nella produzione di cellule T mature. È comunque possibile che il residuo del timo involuto sia sufficiente per consentire una certa maturazione delle cellule T. Durante la permanenza nella corteccia timica, i timociti iniziano ad esprimere recettori TCR $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$ (queste ultime matureranno in cellule T CD4⁺ ristrette per MHC di classe II e cellule T CD8⁺ ristrette per MHC di classe I una volta lasciata la corteccia e raggiunta la midollare, per poi entrare nella circolazione sanguigna). L'ambiente timico fornisce gli stimoli necessari alla proliferazione e maturazione dei timociti (linfociti T immaturi): all'interno della corteccia, le cellule epiteliali corticali del timo formano una rete di lunghi prolungamenti citoplasmatici attraverso i quali i timociti devono passare per raggiungere la midollare. Nella giunzione cortico-midollare troviamo cellule dendritiche che esprimono molecole MHC I e MHC II, su cui espongono peptidi derivati da proteine self; se il TCR del timocita riconosce l'antigene self viene eliminato tramite apoptosi (selezione negativa)⁷. I geni del TCR vengono assemblati durante lo sviluppo per ricombinazione somatica di segmenti genici (V, D, J): questo genera un'enorme diversità potenziale, concentrata soprattutto nelle regioni CDR3 (in cui contribuiscono anche aggiunte/delezioni nucleotidiche). Il riarrangiamento funzionale della catena β rappresenta una prima soglia decisiva: se non si produce un TCR funzionale, il timocita va incontro a morte.^{1,8} Un singolo

precursore può dare origine a numerose cellule figlie, ma circa il 95% di queste cellule muore per apoptosi prima di raggiungere la midollare. Questa morte cellulare è dovuta a una combinazione di fattori, tra cui il fallimento nel riarrangiamento del gene della catena β del TCR (mancato superamento del checkpoint), una mancata selezione positiva mediata da molecole MHC-self nel timo e una selezione negativa mediata da antigeni self.^{9,10} I linfociti T naïve sono maturi, ma immunologicamente inesperti: hanno completato la maturazione nel timo e possiedono un recettore antigenico funzionale, ma devono ancora incontrare il loro antigene specifico. Sono quiescenti e metabolicamente inattivi, si attiveranno solamente in seguito al legame del loro TCR con il complesso peptide-MHC (I o II) mostrato da una cellula presentante l'antigene¹¹. Dopo l'attivazione, le cellule T naïve circolanti (TN) si dividono massivamente, fino a 50.000 volte, in cellule T effettrici (Teff), che si distribuiscono ampiamente per eliminare gli antigeni. Dopo la rimozione degli antigeni, la maggior parte delle Teff va incontro ad apoptosi, mentre un piccolo sottogruppo sopravvive e persiste per anni come cellule T di memoria, fornendo risposte di richiamo contro antigeni incontrati in precedenza. L'esaurimento delle cellule T si riferisce a una disfunzione post-timica delle cellule T in risposta a una stimolazione antigenica persistente durante infezioni croniche e cancro. Dal punto di vista funzionale, le cellule T esauste (Tex) mostrano una progressiva perdita della produzione di citochine, una scarsa capacità proliferativa e una funzione citotossica compromessa. Soprattutto, mostrano un'elevata espressione di recettori inibitori, che sono diventati i tratti distintivi delle Tex. Tra questi vi sono l'antigene 4 associato ai linfociti T citotossici (CTLA4), la proteina 1 di morte cellulare programmata (PD-1), il gene 3 di attivazione linfocitaria (LAG3), il recettore 3 mucina-immunoglobulina delle cellule T (TIM3) e il recettore immunitario delle cellule T con domini immunoglobulinici e ITIM. Sebbene l'esaurimento delle cellule T sia indispensabile per limitare i danni alle cellule sane e prevenire le malattie autoimmuni, esso restringe anche l'efficacia dell'immunoterapia oncologica¹².

1.2.2.2 Il TCR

Il recettore antigenico TCR (figura 2) è un eterodimero costituito da due catene polipeptidiche transmembrana, denominate TCR α e TCR β , legate covalentemente tra loro mediante un ponte disolfuro tra residui di cisteina extracellulari. Ciascuna catena TCR è costituita da un dominio variabile (V) N-terminale, un dominio costante (C), una regione transmembrana idrofobica ed una breve regione citoplasmatica. La porzione extracellulare dell'eterodimero TCR $\alpha\beta$ è strutturalmente simile al frammento legante l'antigene (Fab) di una molecola di immunoglobulina. Le regioni variabili delle catene α e β del TCR contengono brevi tratti di amminoacidi nei quali si concentra la variabilità tra diversi TCR; queste regioni costituiscono le regioni ipervariabili o regioni determinanti la complementarità (CDR, complementary determining regions). Tre CDR nella catena α e tre regioni analoghe nella catena β formano insieme la parte del TCR che riconosce specificamente i complessi peptide-MHC^{2,13}. Le regioni costanti invece possiedono regioni cerniera che formano ponti disolfuro fra cisteine per permettere il collegamento fra le due catene, ma sono troppo corte per permettere la trasduzione del segnale, che viene quindi affidata ai motivi ITAM. Le proteine CD3 e ζ (zeta) sono associate non covalentemente all'eterodimero TCR $\alpha\beta$ e insieme formano il complesso del TCR. Quando il TCR riconosce l'antigene, queste proteine associate trasmettono i segnali che portano all'attivazione delle cellule T. I segmenti transmembrana di tutte e tre le catene CD3 e della catena ζ contengono un residuo di acido aspartico carico negativamente, che si lega ai residui carichi positivamente di lisina e arginina presenti nei domini transmembrana delle catene TCR α e β , mantenendo così TCR, CD3 e ζ associati come complesso¹⁴.

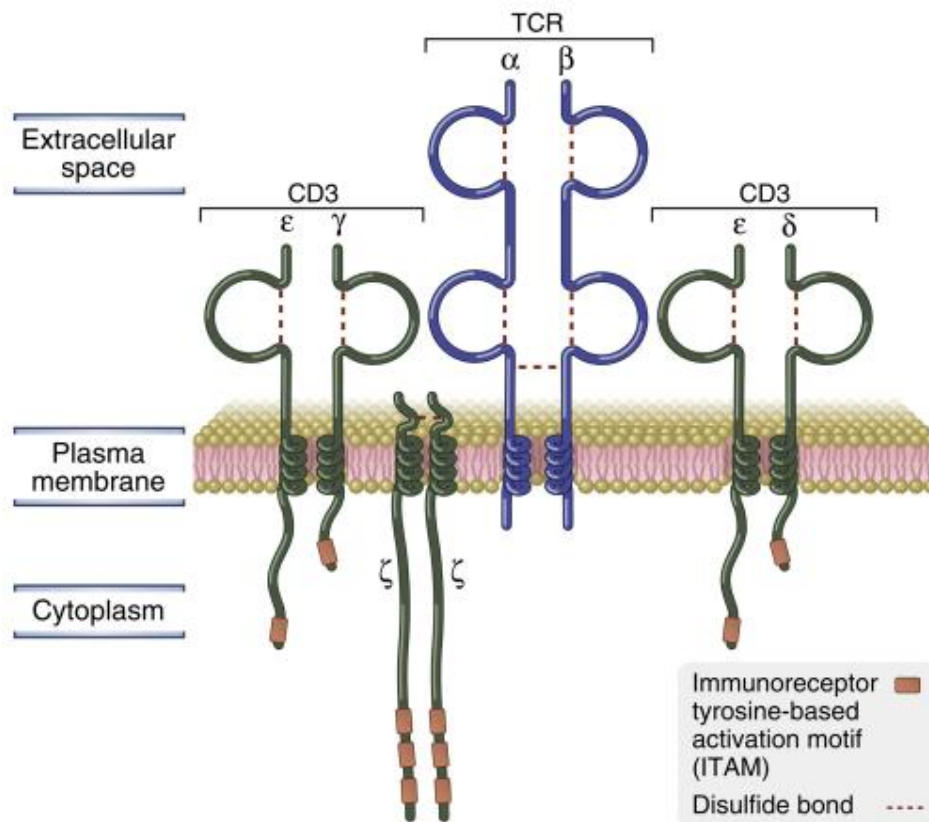


FIG. 2: componenti del TCR. Ogni complesso contiene un eterodimero TCR $\alpha\beta$, un eterodimero CD3 $\gamma\epsilon$, un eterodimero CD3 $\delta\epsilon$ e un omodimero $\zeta\zeta$ legato da ponte disolfuro².

1.2.2.3 CD4 e CD8

Il riconoscimento dei complessi peptide-MHC da parte del TCR può indurre una modificazione conformazionale, rendendo gli ITAM associati alle catene CD3 o ζ accessibili alla fosforilazione tirosinica da parte delle chinasi della famiglia SRC associate ai corecettori. CD4 e CD8 sono corecettori delle cellule T che si legano a regioni non polimorfiche delle molecole MHC e facilitano la segnalazione del complesso TCR durante l'attivazione delle cellule T. Le cellule T $\alpha\beta$ mature esprimono o CD4 oppure CD8, ma non entrambi. I recettori antigenici delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ (figura 3) sono specifici per antigeni peptidici presentati dalle molecole MHC, che legano e presentano esclusivamente peptidi alle cellule T. Per questo motivo questo tipo cellulare reagisce solamente ad antigeni proteici estranei, mentre le risposte umorali possono essere indotte sia da antigeni proteici che da antigeni non proteici. Sono glicoproteine transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline².

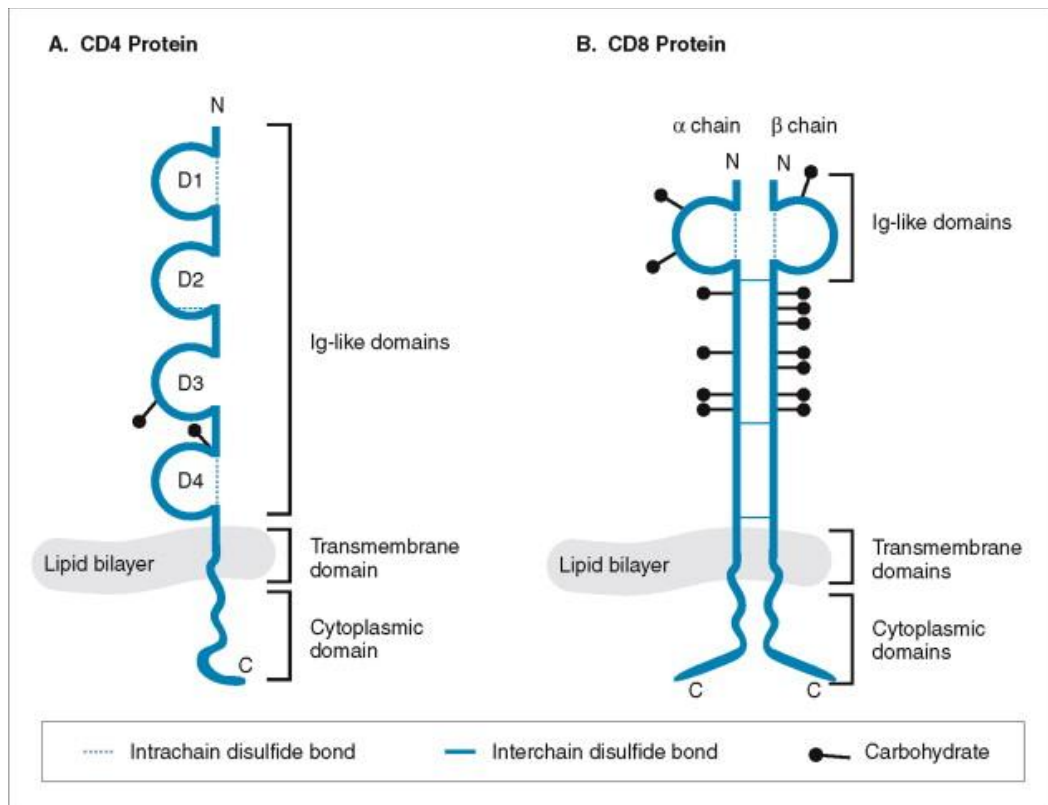


Fig. 3: Rappresentazione schematica della struttura dei corecettori CD4 e CD8, con evidenza dei domini extracellulari di tipo immunoglobulinico, della regione transmembrana e del dominio citoplasmatico.¹⁵

CD4 è espresso come monomero sulla superficie delle cellule T periferiche e dei timociti ed è presente anche, sebbene a livelli più bassi, su fagociti mononucleati e su alcune cellule dendritiche. Della sua struttura osserviamo quattro domini extracellulari simili alle immunoglobuline (di cui i due N-terminali si legano ai domini delle MHC II), una regione transmembrana idrofobica e una coda citoplasmatica fortemente basica.¹⁶ Le cellule T CD4⁺ effettrici vengono generate negli organi linfoidi secondari. La maggior parte di queste cellule lascia gli organi linfoidi e migra verso i siti periferici d'infezione, dove svolge la funzione di eliminare i microrganismi, grazie a meccanismi di adesione endoteliale e secrezione di chemochine nei siti infetti. Nei tessuti le cellule T incontrano antigeni microbici presentati da macrofagi e APC; se questi antigeni vengono riconosciuti, il TCR permette una migliore adesione cellulare aumentando l'affinità delle integrine per i loro ligandi. Al contrario, cellule T non specifiche per l'antigene tipicamente muoiono nel tessuto o ritornano in circolazione grazie ai vasi linfatici. Le cellule T follicolari helper (Tfh) vengono comunque attivate negli organi linfoidi secondari,

tuttavia non migrano verso i tessuti ma nei follicoli linfoidi, dove aiutano i linfociti B a produrre anticorpi ad alta affinità. Nelle risposte immunitarie cellulo-mediate contro microrganismi fagocitati, le cellule T riconoscono specificamente gli antigeni microbici, ma sono i fagociti reclutati e altre cellule mieloidi che distruggono effettivamente i patogeni. Pertanto, le cellule T CD4⁺ effettrici collegano il riconoscimento specifico dei microrganismi con l'attivazione di altri leucociti che li distruggono, in particolare attivano i fagociti mediante molecole di superficie come il CD40 e secernendo citochine².

Oltre alle cellule T_{fh} conosciamo altri 3 subset principali di cellule T CD4⁺ effettrici¹⁷:

- Th1, contro batteri e virus, producono IFN- γ (interferone- γ), una citochina che attiva i macrofagi e promuove la differenziazione delle cellule CD4⁺ in Th1 inibendo lo sviluppo degli altri subset.
- Th2, coinvolte nelle reazioni allergiche, producono IL-4, IL-5, IL-13.
- Th17, contro infezioni batteriche o fungine, producono IL-17, IL-22¹⁸.

Alcune delle citochine prodotte da ciascun sottotipo stimolano anche lo sviluppo dello stesso sottotipo e inibiscono la differenziazione degli altri, contribuendo all'amplificazione della risposta immunitaria specifica (polarizzazione)¹⁹. Le cellule T regolatorie (Treg) svolgono un ruolo essenziale nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria e della tolleranza verso il self, impiegano meccanismi immunosoppressivi come l'espressione del CD25, che induce anergia ed apoptosi delle cellule T effettrici e l'espressione di CTLA4, che inibisce l'attivazione delle cellule T¹¹.

La maggior parte delle molecole CD8 esiste come eterodimero legato da ponti disolfuro e sono costituite da due catene correlate chiamate CD8 α e CD8 β . Queste possiedono un solo dominio extracellulare simile alle immunoglobuline (che si legano alle molecole MHC I), una regione transmembrana idrofobica e una coda citoplasmatica fortemente basica²⁰. La linea CD8⁺ ha la funzione di eliminare le cellule che ospitano virus, i fagociti che contengono batteri ingeriti che sono sfuggiti dai fagosomi nel citosol e le cellule tumorali, producendo IFN- γ e quindi promuovendo la difesa immunitaria contro molti tumori. Le cellule T CD8⁺ naïve

sono in grado di riconoscere l'antigene, ma non sono capaci di uccidere le cellule bersaglio. Per questo motivo devono proliferare e differenziarsi, così da generare un numero sufficientemente grande di CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) funzionali in grado di eliminare la fonte dell'antigene. Nel citoplasma di CTL differenziati troviamo granuli che contengono perforina e granzimi a funzione citotossica responsabili dell'eliminazione delle cellule bersaglio²¹. Le cellule T helper CD4⁺ favoriscono l'attivazione delle cellule T CD8⁺ naïve attraverso la secrezione di citochine e l'espressione del ligando per CD40, che si lega al CD40 sulle cellule dendritiche portanti l'antigene e stimola a sua volta l'attivazione delle APC; questo permette un maggior stimolo di differenziazione delle cellule CD8⁺ e un aumento dell'espressione di molecole costimolatorie. Una volta che i CTL sono stati generati possono essere attivati senza bisogno di costimolazione. L'eliminazione mediata dai CTL comporta il riconoscimento specifico delle cellule bersaglio e la consegna di proteine nella cellula bersaglio che inducono la morte cellulare. I CTL rimuovono le cellule che espongono lo stesso complesso peptide-MHC di classe I che ha stimolato la proliferazione e la differenziazione delle cellule T CD8⁺ naïve in CTL funzionali. L'azione citotossica dei CTL è altamente specifica per l'antigene e le cellule non infettate adiacenti, che non presentano quel complesso peptide-MHC, non vengono danneggiate. Questa specificità è garantita dal fatto che tra il CTL e la cellula bersaglio che esprime l'antigene si forma una stretta zona di contatto, chiamata sinapsi immunologica, che verrà discussa nel paragrafo successivo. Le cellule bersaglio verranno eliminate per apoptosi²².

1.2.2.4 Le cellule della memoria

Le risposte immunitarie mediate dalle cellule T a un antigene portano generalmente alla generazione di cellule T della memoria specifiche per quell'antigene, che possono persistere per anni, talvolta per tutta la vita. Le cellule della memoria forniscono una difesa efficace contro patogeni presenti nell'ambiente, che possono essere incontrati ripetutamente. Esse esprimono livelli aumentati di proteine anti-apoptotiche, che possono essere responsabili della loro lunga sopravvivenza; sono inoltre in grado di rispondere più rapidamente all'antigene rispetto alle cellule naïve. È importante sottolineare come le cellule T migrino soprattutto negli organi

linfoidi secondari, mentre le cellule della memoria possono migrare in quasi tutti i tessuti. Conosciamo 3 principali subset di cellule di memoria:

- TCM (central memory T cells): migrano principalmente nei linfonodi, proliferano molto e generano molte cellule effettrici dopo la stimolazione antigenica.
- TEM (effector memory T cells): danno risposta rapida ma hanno minore proliferazione.
- TEMRA (Terminally Differentiated Effector Memory T cells), agenti citotossici contro tumori ed infezioni croniche²³.
- TRM (tissue-resident memory T-cells): presenti nei tessuti non linfoidi, si adoperano nella difesa locale rapida²⁴.
- TSCM (Stem cell-like memory T cells), sono un raro sottotipo di cellule T della memoria a lunga durata, che combinano la capacità di auto-rinnovarsi con quella di differenziarsi rapidamente in cellule effettrici²⁵.

1.2.2.5 La sinapsi immunologica

Quando il complesso TCR riconosce peptidi associati alle molecole MHC su una cellula presentante l'antigene (APC), diverse proteine di superficie delle cellule T e molecole di segnalazione intracellulari vengono rapidamente mobilitate nel punto di contatto tra la cellula T e l'APC. Questa regione di contatto fisico tra la cellula T e l'APC forma una struttura simile a un bersaglio chiamata sinapsi immunologica o SMAC (supramolecular activation cluster).²⁶ Le sinapsi immunologiche stabilizzano il contatto tra i linfociti e le cellule presentanti l'antigene e facilitano una segnalazione prolungata ed efficace delle cellule T. Garantiscono inoltre la secrezione di citochine, perforine e granzimi verso la cellula bersaglio, sono utili infine a un'efficiente terminazione del segnale per ubiquitinazione^{2,27}.

1.2.2.6 Recettori costimolatori

I segnali costimolatori sono generati da recettori che riconoscono ligandi presenti sulle cellule presentanti l'antigene (APC) e cooperano con i segnali del TCR per promuovere l'attivazione delle cellule T. I costimolatori meglio caratterizzati per i linfociti T sono la coppia di proteine correlate B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) delle cellule APC, si legano al CD28 presente sulle cellule T e che costituisce il principale segnale stimolatorio di attivazione. CD28 è espresso nella grande maggioranza delle cellule T CD4⁺. Negli adulti quasi il 50% delle cellule T CD8⁺ circolanti nel sangue, in particolare cellule effettrici e della memoria, esprime livelli molto bassi o assenti di CD28. Le cellule T CD4⁺ attivate possono a loro volta aumentare l'espressione dei costimolatori B7 sulle APC attraverso una via dipendente da CD40, contribuendo ad amplificare le risposte delle cellule T. I segnali mediati da CD28 promuovono la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione cellulare delle cellule T (figura 4).²⁸

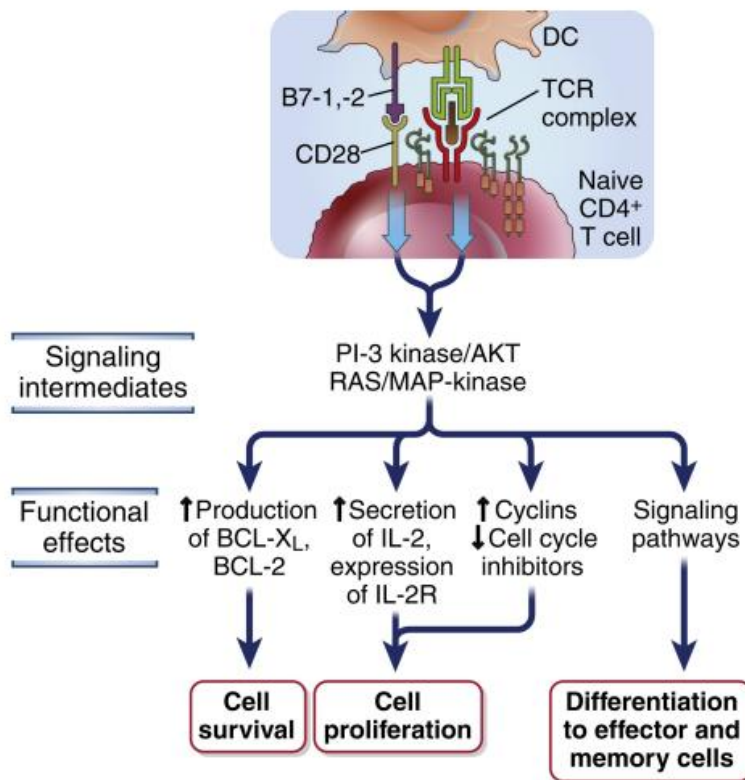


Fig. 4: Schema del meccanismo di costimolazione mediato da CD28 durante l'attivazione dei linfociti T naïve, con attivazione delle principali vie di segnalazione intracellulari coinvolte nella sopravvivenza, proliferazione e differenziazione cellulare.²

Le cellule T e della memoria precedentemente attivate sono meno dipendenti dalla costimolazione mediata dalla via B7-CD28 rispetto alle cellule T naïve. Questa caratteristica delle cellule effettrici e della memoria consente loro di rispondere agli antigeni presentati da diverse APC, che possono trovarsi in tessuti non linfoidi e che possono esprimere livelli bassi o nulli di molecole B7. La differenziazione delle cellule T CD8⁺ in linfociti T citotossici effettrici ad esempio richiede costimolazione, ma una volta differenziati, i CTL effettrici possono riconoscere e uccidere altre cellule anche se queste non esprimono costimolatori. L'esito dell'attivazione delle cellule T è influenzato da un equilibrio tra l'attivazione di recettori attivatori e recettori inibitori (CTLA-4, inibitore competitivo su B7 e PD-1, blocca la segnalazione attivando una fosfatasi) appartenenti alla famiglia CD28.^{29,30} La proliferazione delle cellule T in risposta al riconoscimento dell'antigene è quindi mediata da una combinazione di segnali provenienti dal recettore per l'antigene, dai costimolatori e da fattori di crescita autocrini, principalmente l'interleuchina-2. L'espansione clonale delle cellule specifiche per l'antigene, che deriva da questa proliferazione, trasforma il piccolo pool iniziale di linfociti naïve specifici per quell'antigene in un grande numero di cellule in grado di eliminarlo. Prima dell'esposizione all'antigene, la frequenza delle cellule T naïve specifiche per un determinato antigene è circa 1 su 10⁵–10⁶ linfociti, dopo l'esposizione invece la frequenza delle cellule T CD8⁺ specifiche per quel microrganismo può aumentare fino 50.000 volte. Anche il numero delle cellule T CD4⁺ specifiche aumenta, arrivando fino a un'espansione di circa 1000 volte².

1.2.2.7 Spegnimento della risposta linfocitaria

L'eliminazione dell'antigene porta alla contrazione della risposta delle cellule T; questa diminuzione è responsabile del mantenimento dell'omeostasi del sistema immunitario ed è mediata da diversi meccanismi, fra cui quello della morte cellulare. Quando l'antigene viene eliminato e la risposta immunitaria innata associata all'esposizione all'antigene diminuisce, i segnali che normalmente mantengono vivi e proliferanti i linfociti attivati non sono più presenti. Una diminuzione nella stimolazione e nella quantità di IL-2 disponibile diminuisce a sua volta i livelli di proteine anti-apoptotiche nelle cellule. Viene innescata la via

mitocondriale dell'apoptosi e questo ha due conseguenze: la maggior parte delle cellule prodotte durante l'attivazione muore e contemporaneamente la generazione di nuove cellule attivate diminuisce. Enzimi intracellulari come fosfatasi (che defosforilano i substrati della segnalazione) ed E3-ubiquitina ligasi limitano la durata o l'intensità delle risposte di attivazione delle cellule T².

1.3 Cellule mieloidi

Le cellule mieloidi derivano da cellule staminali ematopoietiche nel midollo osseo, e da queste originano granulociti (neutrofili, eosinofili, basofili), monociti, macrofagi e cellule dendritiche. Essi sono cruciali per la difesa innata (fagocitosi, degranulazione, produzione di mediatori e citochine) e, tramite presentazione dell'antigene e modulazione del microambiente, influenzano profondamente l'immunità adattativa³¹. I fagociti (neutrofili e macrofagi) sono cellule la cui funzione primaria è quella di fagocitare e distruggere i microbi e rimuovere i tessuti danneggiati. Le risposte funzionali dei fagociti nella difesa dell'ospite consistono in fasi sequenziali: reclutamento delle cellule nei siti di infezione, riconoscimento e attivazione dopo il riconoscimento microbico, ingestione dei patogeni attraverso il processo di fagocitosi e distruzione degli stessi. Inoltre, attraverso il contatto diretto e mediante la secrezione di citochine, i fagociti comunicano con altre cellule promuovendo o regolando le risposte immunitarie. I neutrofili sono la popolazione più abbondante di globuli bianchi circolanti e il principale tipo cellulare nelle reazioni infiammatorie acute; hanno risposta rapida e vita breve, possiedono inoltre granuli specifici ricchi di enzimi. La loro principale funzione è quella di fagocitare i microbi e i prodotti delle cellule necrotiche, distruggendoli nei fagolisosomi. Possono secernere il contenuto dei granuli ed espellere il loro contenuto nucleare, formando trappole extracellulari dei neutrofili (NET), che servono a immobilizzare e uccidere i microbi extracellulari. I monociti entreranno nel circolo sanguigno, dove verranno reclutati nei siti di infezione o danno; per questo motivo, la maggior parte dei macrofagi che si trovano nei siti d'infiammazione derivano da monociti. La maggior parte dei macrofagi a lunga vita residenti nei tessuti non deriva dal midollo osseo, ma da precursori del sacco vitellino o del fegato fetale. I mastociti sono le cellule più abbondanti nella pelle e negli epiteli mucosali: quando attivati,

rilasciano potenti mediatori infiammatori che difendono contro le infezioni da parassiti elminti o causano i sintomi delle malattie allergiche. Essi esprimono recettori di membrana plasmatica ad alta affinità per un tipo di anticorpo chiamato IgE e sono solitamente rivestiti da questi anticorpi. Quando gli anticorpi presenti sulla superficie dei mastociti legano l'antigene, si inducono eventi di segnalazione che portano all'attivazione dei mastociti e dei basofili. I mastociti vengono anche attivati quando riconoscono prodotti microbici, indipendentemente dalle IgE, e in questo modo funzionano come cellule sentinella tissutali del sistema immunitario innato. Gli eosinofili sono granulociti che esprimono granuli citoplasmatici contenenti enzimi dannosi per le pareti cellulari dei parassiti, ma che possono anche danneggiare i tessuti dell'ospite, sono normalmente presenti in tessuti periferici (principalmente in tratto respiratorio, gastrointestinale e genitourinario) e il loro numero può aumentare in condizioni di infiammazione. Le cellule dendritiche sono cellule residenti nei tessuti e circolanti che rilevano la presenza di microbi e avviano le reazioni di difesa immunitaria innata, catturano proteine microbiche per presentarle alle cellule T al fine di avviare le risposte immunitarie adattative e istruiscono i linfociti T naïve^{1,2}.

1.4 Neoplasie ematologiche

Le neoplasie ematologiche sono tumori del sangue, del midollo osseo e del sistema linfatico, derivanti dalla proliferazione incontrollata di cellule mieloidi o linfoidi. Si dividono principalmente in leucemie, linfomi e mielomi, rappresentando circa il 10% di tutti i tumori. Tradizionalmente il trattamento per questo tipo di patologie si basa sull'utilizzo di radioterapia, chemioterapia e trapianto di cellule staminali, ma l'impiego di una terapia immunitaria mirata è diventata una nuova possibilità di cura. In particolare, le cellule CAR-T vengono utilizzate come trattamento di terza linea per la maggior parte delle neoplasie ematologiche; di seguito vengono riportate le principali.

1.4.1 I linfomi

I linfomi sono tumori che interessano il sistema linfatico, in particolare i linfociti. Si distinguono principalmente in Linfoma di Hodgkin (HL) e Linfomi non-Hodgkin (LNH).

1.4.1.1 Linfomi di Hodgkin (HL).

Il linfoma di Hodgkin è una neoplasia del sistema linfatico caratterizzata dalla presenza di cellule tumorali tipiche chiamate cellule di Reed-Sternberg. Si presenta come un tumore dei linfociti B che presenta poche cellule tumorali grandi, binucleate, immerse in un ampio ambiente infiammatorio. La sua epidemiologia ha distribuzione bimodale, con due picchi caratteristici: uno fra i 15 ed i 35 anni, l'altro dopo i 55. Viene diviso in linfoma classico, che interessa il 95% dei casi e presenta cellularità mista, o nodulare a predominanza linfocitaria (NLPHL), più raro e caratterizzato dalle tipiche cellule "pop corn". È spesso associato all'infezione da virus di Epstein-Barr e origina dai linfociti B nel centro germinativo; si manifesta con linfadenopatia, sintomi "B" (febbre, sudorazioni notturne, perdita di peso), prurito e astenia³².

1.4.1.2 Linfomi non-Hodgkin (NHL)

I linfomi non-Hodgkin (NHL) rappresentano un gruppo eterogeneo di tumori del sistema linfatico derivati da linfociti B, T o NK, molto diversi tra loro per comportamento clinico, prognosi e risposta alla terapia. Sono più frequenti dei linfomi di Hodgkin e hanno maggiore incidenza negli uomini e con l'aumentare dell'età.

1- Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL)

Nel gruppo dei linfomi aggressivi, il linfoma diffuso a grandi cellule B è descritto come il tipo più comune di linfoma non-Hodgkin, a crescita rapida, con possibile interessamento di milza, fegato o midollo. È caratterizzato da una proliferazione rapida di linfociti B maligni di grandi dimensioni, visibili istologicamente, e interessa soprattutto la popolazione sopra i sessant'anni. Si divide in due sottotipi principali: GCB (Germinal Center B-cell like), che origina dal centro germinativo

e ha prognosi migliore; ABC (Activated B-cell like), che origina da cellule B attivate e ha una maggiore resistenza terapeutica. È causato da traslocazioni di BCL2, BCL6 e MYC e si manifesta mediante linfonodi ingrossati, ma indolenti sintomi B³³.

2- Linfoma primitivo mediastinico (PMBCL)

Il linfoma primitivo mediastinico a grandi cellule B è un linfoma B aggressivo che nasce tipicamente nel mediastino anteriore. Dal punto di vista biologico e clinico condivide alcune caratteristiche sia con il DLBCL sia con il linfoma di Hodgkin classico, motivo per cui viene spesso descritto come una forma “di confine” tra queste due categorie³⁴. Colpisce soprattutto adolescenti e giovani adulti, con una predominanza femminile, si manifesta con tosse, dispnea, dolore toracico e più raramente versamento pleurico o pericardico.

3- Linfoma follicolare (FL)

Il linfoma follicolare (FL) è un linfoma non-Hodgkin a cellule B indolente, originato dai linfociti del centro germinativo, con crescita lenta e decorso cronico. Origina da cellule B del centro germinativo e può trasformarsi in una forma più aggressiva, come il DLBCL³⁵. Compare tipicamente dopo i 50 anni, è caratterizzato dalla traslocazione t(14;18)(q32;q21) e conseguente iperespressione di BCL-2, portando a blocco apoptotico e sopravvivenza prolungata delle cellule tumorali³⁵.

4- Linfoma mantellare (MCL)

Il linfoma mantellare (MCL) è un linfoma non-Hodgkin a cellule B con comportamento generalmente aggressivo, origina da linfociti B della zona del mantello del follicolo linfonodale e interessa tipicamente uomini dopo i sessant'anni. Si manifesta in seguito alla traslocazione t(11;14)(q13;q32), con iperespressione della ciclina D1 e conseguente attivazione del ciclo cellulare e proliferazione incontrollata. Coinvolge il midollo osseo e il tratto gastrointestinale, il paziente manifesta sintomi B ma spesso la malattia è già avanzata al momento della diagnosi³⁵.

1.4.2 Le leucemie

Le leucemie sono neoplasie ematologiche caratterizzate dalla proliferazione clonale di cellule emopoietiche nel midollo osseo e spesso nel sangue periferico, derivano da linee mieloidi o linfoidei e presentano andamento acuto o cronico. Cellule immature o mature proliferano in modo incontrollato compromettendo la normale emopoiesi; le cellule neoplastiche possono poi diffondere nel sangue ed in altri organi.

1- Leucemia linfoblastica acuta (LLA)

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) è una neoplasia caratterizzata dalla proliferazione di linfoblasti immaturi (B o T) nel midollo osseo. È un tumore più comune nei bambini, con picco fra i 2 ed i 5 anni, mentre negli adulti è più rara, ma anche più aggressiva. Le alterazioni genetiche che la caratterizzano sono t(9;22) (BCR-ABL1) e t(12;21) (TEL-AML) e si manifesta con anemia, stanchezza, infezioni frequenti, piastrinopenia, sanguinamenti e dolore osseo³⁵.

2- Leucemia mieloide acuta (LMA)

La leucemia mieloide acuta (LMA) è una neoplasia ematologica caratterizzata dalla proliferazione di precursori mieloidi immaturi (mieloblasti) nel midollo osseo, con rapido blocco della normale emopoiesi. È una delle leucemie acute più frequenti negli adulti dopo i 65 anni, che origina da molteplici alterazioni genetiche e si manifesta con anemia, stanchezza, infezioni ricorrenti e sanguinamenti (tipici dell'insufficienza midollare).

1.4.3 La leucemia linfatica cronica (LLC)

Rappresenta un caso particolare ed appartiene rigorosamente a entrambe le categorie: si classifica come leucemia quando le cellule neoplastiche si trovano in concentrazione elevata nel sangue periferico (superiore a 5.000 linfociti clonali per microlitro) e nel midollo osseo; si classifica come linfoma quando le cellule neoplastiche si accumulano prevalentemente nei linfonodi e nella milza, con un numero minimo o assente di cellule tumorali circolanti nel sangue. È la leucemia più comune negli adulti dei paesi

occidentali, si manifesta tipicamente dopo i 70 anni ed è spesso asintomatica e caratterizzata dall'accumulo di linfociti B maturi ma disfunzionali. Le due alterazioni principali ne determinano la prognosi: la delezione del braccio lungo q del cromosoma 13 ha prognosi più favorevole rispetto alla delezione del braccio corto p del cromosoma 17.

1.4.4 Il mieloma multiplo

Il mieloma multiplo è una neoplasia ematologica caratterizzata dalla proliferazione clonale di plasmacellule nel midollo osseo, con produzione di immunoglobuline monoclonali e danno d'organo. L'accumulo di mutazioni (t(11;14) e t(4;14)) che culminano nel mieloma multiplo richiede solitamente decenni, rendendo la malattia clinicamente visibile solamente negli adulti più anziani, in assenza di altre mutazioni o fattori di rischio che ne causino predisposizione (l'età mediana alla diagnosi è di circa 70 anni). La quasi totalità dei casi di mieloma multiplo è preceduta dalla gammopatia monoclonale di significato incerto (MGUS); il tasso di evoluzione da MGUS a mieloma multiplo sintomatico si mantiene costante nel tempo^{36,37}. Alcune infezioni e malattie autoimmuni sono associate allo sviluppo del mieloma multiplo, come l'HIV, l'anemia perniziosa o la spondilite anchilosante; anche l'esposizione professionale a particolari sostanze ne può essere causa, come nei casi di contatto con benzene, pesticidi, asbesto o radiazioni ionizzanti³⁸. Si manifesta con sintomi tipici detti "CRAB": ipercalcemia, danno renale, anemia e lesioni ossee.

1.5 CAR-T

Le terapie cellulari basate sull'impiego delle cellule CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-cell therapy) rappresentano una delle frontiere più promettenti e innovative della medicina moderna. Questa strategia terapeutica combina i principi dell'immunoterapia con le tecnologie di ingegneria genetica, consentendo di reindirizzare in modo altamente specifico la risposta immunitaria del paziente contro cellule tumorali che esprimono antigeni bersaglio selezionati.

1.5.1 Struttura, generazioni ed evoluzione della terapia

Le prime immunoterapie antitumorali con cellule T si basarono sull'impiego di un TCR indirizzato contro epitopi d'interesse, che potevano però essere presenti anche sulle superfici di cellule non tumorali. Questo causò neurotossicità e cardiotossicità on-target/off-tumor (venivano riconosciuti antigeni presenti anche su tessuti e cellule non tumorali) che resero evidente una limitazione della finestra terapeutica di questi trattamenti, soprattutto sui tumori solidi³⁹. Le terapie con CAR-T rappresentano un'innovazione radicale nell'immunoterapia antitumorale: i linfociti T del paziente vengono prelevati ed ingegnerizzati *ex vivo* inserendo un gene che codifica un recettore artificiale (CAR, chimeric antigen receptor)(figura 5) con dominio anticorpale e dominio di segnale TCR/CD3 ζ ⁴⁰; questo conferisce alle CAR-T la capacità di riconoscere antigeni tumorali sulla superficie cellulare in modo indipendente dall'MHC⁴¹. Il dominio extracellulare è il responsabile del riconoscimento dell'antigene da parte della cellula CAR-T e può essere di due tipi:

- ScFv (single-chain variable fragment), un segmento variabile a singola catena derivante dall'unione, mediante un linker, di un segmento della catena leggera e di uno della catena pesante delle immunoglobuline. È derivato da anticorpi monoclonali, ed è il formato più utilizzato nelle CAR attualmente approvate⁴².

- sdAB, (single-domain antibody) sono anticorpi costituiti da un solo dominio variabile, spesso anche chiamati “nanobodies”. Provengono dalle catene pesanti di anticorpi presenti in camelidi o alcuni pesci cartilaginei, danno una maggiore stabilità strutturale e permettono l’accesso a epitopi nascosti. Abbiamo tuttavia una minore esperienza clinica a riguardo e quelli di origine camelide possono essere maggiormente immunogenici^{43,44}.

Il dominio transmembrana, che collega la parte extracellulare a quella intracellulare, può derivare da diverse molecole (CD8 α , CD28, o altri recettori di membrana), che influenzano la stabilità e la funzione del recettore stesso⁴⁵. È costituito da un’ α -elica idrofobica che attraversa il doppio strato lipidico, contribuisce ad ancorare il recettore alla membrana e ne stabilizza la struttura, in alcuni casi può amplificare la segnalazione cellulare⁴⁶. Il dominio intracellulare è invece deputato all’attivazione della cellula T e si basa sulla fosforilazione di ITAM presenti nel dominio citoplasmatico di CD-3 ζ .

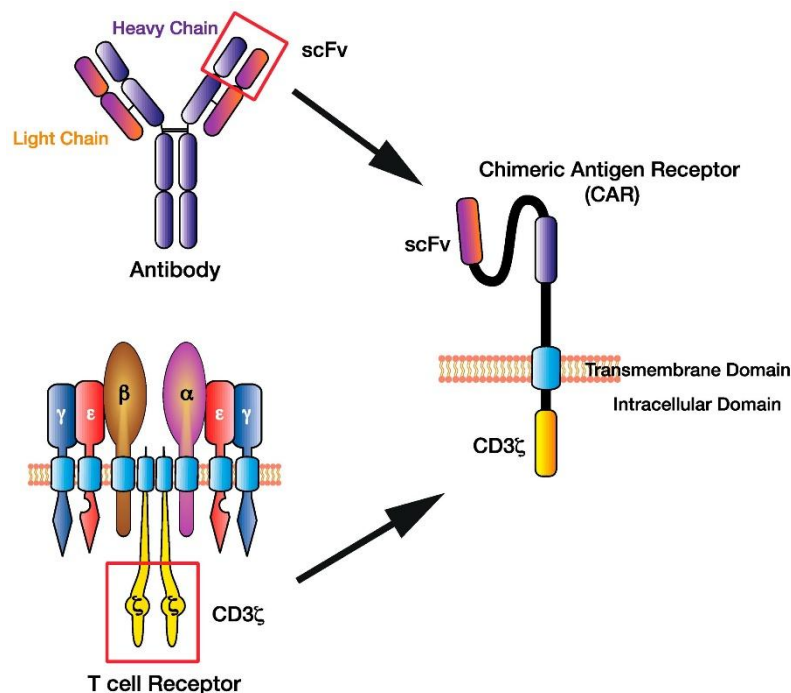


Fig 5: Rappresentazione schematica della struttura di un recettore chimerico per l’antigene (CAR), costituito da una porzione extracellulare di riconoscimento antigenico derivata dall’anticorpo, un dominio transmembrana e domini intracellulari di segnalazione, tra cui CD3 ζ .⁴⁷.

La composizione strutturale differente del dominio intracellulare determina CAR-T di differenti generazioni (figura 6). Le CAR-T di prima generazione non presentano un segnale costimolatorio e hanno mostrato scarsa persistenza *in vivo*. Quelle di seconda generazione invece integrano un dominio costimolatorio accanto a CD3 ζ migliorandone le caratteristiche antitumorali e di resistenza: CD28 causa una maggiore attivazione e proliferazione, 4-1BB (CD137), permette maggiore persistenza e memoria e OX40 (CD134) promuove la sopravvivenza cellulare⁴⁸. CAR-T di terza generazione contengono due domini costimolatori, anche se non si è osservato un miglioramento significativo delle loro proprietà, mentre quelle di quarta generazione sono progettate per rilasciare citochine pro-infiammatorie nel sito tumorale (TRUCKs, T cells Redirected for Universal Cytokine Killing). Le TRUCKs sono basate sulla struttura delle CAR di seconda generazione, ma contengono un gene aggiuntivo per una citochina, controllato da un promotore inducibile. Quando il CAR riconosce l'antigene tumorale viene attivato NFAT (Nuclear Factor of activated T-cells), un fattore di trascrizione coinvolto nell'attivazione dei linfociti T e nella produzione di interleuchina-2, che viene rilasciata localmente nel sito del tumore⁴⁹. Questo meccanismo permette un miglior reclutamento delle cellule immunitarie innate e un aumento della citotossicità delle CAR-T, mediato anche dal rilascio di altre citochine come IL-15, IL-18 e IL-7. Recenti studi stanno indagando su come utilizzare questo tipo di terapia anche su tumori solidi, cercando di eludere potenziali effetti collaterali come il rischio di sindrome da tempesta citochinica (discussa nel capitolo 1.4.3) e una possibile citotossicità⁵⁰. Le CAR-T di quinta generazione includono un dominio del recettore delle citochine con un motivo di legame STAT3/STAT5, che attiva la via JAK-STAT dopo il riconoscimento dell'antigene, consentendo l'attivazione del segnale TCR-like, del segnale costimolatorio e anche del segnale citochinico⁵¹.

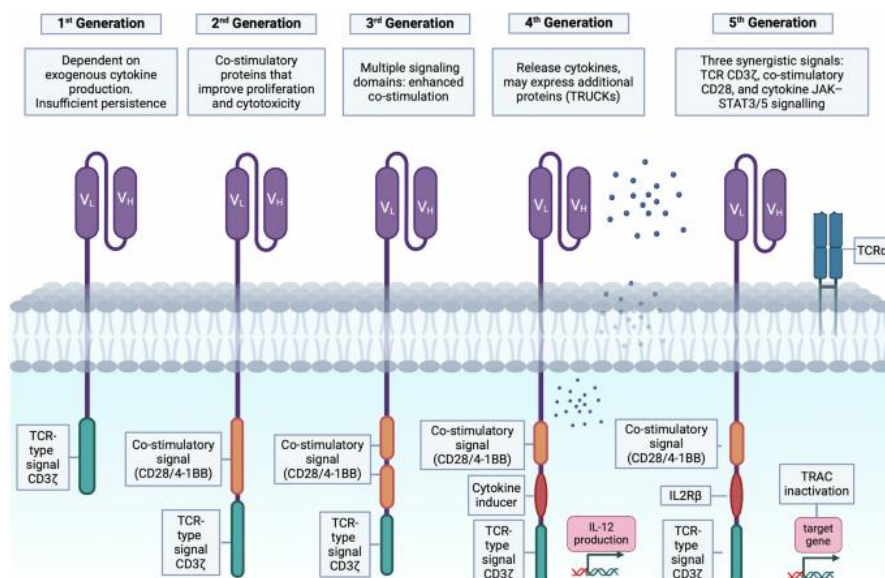


Fig 6: Evoluzione delle diverse generazioni di recettori CAR-T, dalla prima generazione, dotata del solo dominio di segnalazione CD3ζ, fino alle generazioni successive caratterizzate dall'integrazione di domini costimolatori, sistemi inducibili e moduli aggiuntivi per potenziare l'attività antitumorale⁵².

Le terapie CAR-T rientrano nella categoria dei medicinali per terapie avanzate, prodotti biologici complessi che utilizzano materiale genetico o cellule per trattare diverse patologie, seguendo quindi lo stesso rigoroso iter di approvazione dei farmaci tradizionali. Secondo le definizioni dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e dell'EMA (European Medicines Agency), quando le cellule umane subiscono una manipolazione sostanziale (come l'ingegneria genetica) per alterarne le funzioni biologiche, il prodotto finale cessa di essere un semplice tessuto trapiantato e diventa un medicinale⁵³. La loro preparazione deve avvenire esclusivamente in laboratori certificati GMP (Good Manufacturing Practice), ovvero centri di produzione farmaceutica. Ogni "dose" (che corrisponde alle cellule del singolo paziente) deve rispettare standard precisi di purezza, potenza e sterilità, garantendo la tracciabilità e la qualità richiesta per la sicurezza del paziente⁵⁴. I risultati dei primi studi clinici che utilizzavano CAR di prima generazione in pazienti con diversi tipi di tumore sono stati deludenti; tuttavia, nel 2011, le CAR-T di seconda generazione dirette contro CD19 e contenenti domini costimolatori sono emerse come paradigma principale delle terapie con cellule T ingegnerizzate contro il cancro⁵⁵. Il CD19 presenta infatti espressione frequente e ad alto livello nelle neoplasie delle cellule B, è necessario per il loro normale sviluppo e non è espresso

al di fuori di quella linea cellulare. Due farmaci anti-CD19 su cui porre particolare attenzione sono Kymriah (tisagenlecleucel) e Yescarta (axicabtagene ciloleucel), costrutti autologhi di seconda generazione con diversi domini costimolatori (rispettivamente 4-1BB e CD28), differenti per persistenza e successo nell'espansione. Sono principalmente utilizzate in linfomi B aggressivi come il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), la leucemia linfoblastica acuta (B-ALL) e nel linfoma primario a grandi cellule B del mediastino^{56,57}. Terapie con CAR anti-CD19 hanno però mostrato aplasia profonda dei linfociti B e sviluppo di due forme di resistenza: la perdita dell'epitopo antigenico CD19 (antigen escape) e la mancata proliferazione delle CAR-T dopo l'infusione. Dopo le terapie anti-CD19 sono stati testati altri bersagli dipendenti dalla linea cellulare, come BCMA (B cell maturation antigen o CD269) e CD22.

I.5.2 Effetti avversi

Oltre agli alti tassi di risposta, è stato osservato che la terapia CAR-T comporta un rischio di tossicità sistemiche potenzialmente gravi, caratterizzate da un'attivazione massiva e generalizzata del sistema immunitario. Le terapie cellulari possono essere associate a reazioni crociate off-tumor e distruzione di cellule non tumorali; questo porta ad aplasia delle cellule B e delle plasmacellule con CAR-T dirette contro CD19 e BCMA, tossicità polmonare, epatica e miocardite. Anche in presenza di un target tumorale efficace, il rapido aumento dell'attività delle cellule T sostenuto dalla segnalazione CAR durante il trattamento può provocare effetti collaterali sistemici dovuti al rilascio massivo di citochine. La combinazione di febbre, ipotensione e distress respiratorio è diventata la definizione clinica della sindrome da rilascio di citochine (CRS, figura 7), osservata in tutti i primi studi sulle CAR-T in pazienti trattati con CAR-T anti-CD19 per leucemia linfoblastica acuta a cellule B recidivante/refrattaria (B-ALL)⁵⁸. La CAR-T si lega infatti al suo antigene bersaglio, la segnalazione cellulare porta all'espansione della cellula T e al rilascio massivo di citochine, il cui numero aumenta in seguito alla distruzione della cellula tumorale. Questo causa febbre, brividi, tachicardia, ipotensione, tachipnea, ipossiemia, sintomi che insorgono tipicamente entro 7 giorni; alcuni effetti meno comuni sono rash cutanei, danni multiorgano, aritmie e cardiomiopatie⁵⁹. La

sindrome da rilascio citochinico viene classificata secondo un sistema di grading che ne permette l'identificazione in stadi, tra le terapie principali si osservano: antipiretici, idratazione endovenosa, tolicizumab contro IL-6, desametasone per un'immunosoppressione più ampia e metilprednisolone in emergenza⁶⁰.

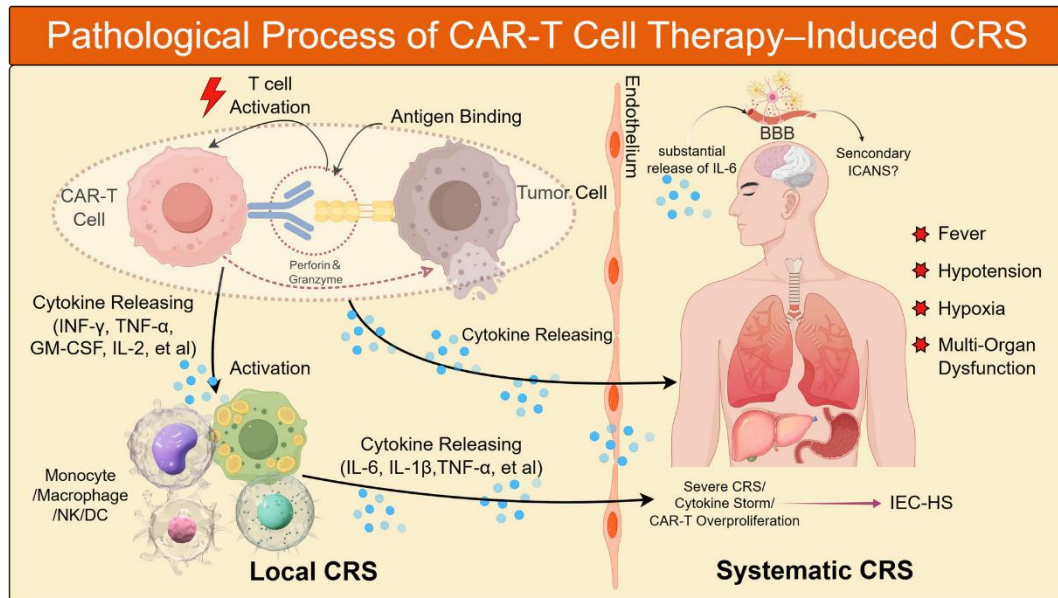


Fig. 7: Rappresentazione schematica del processo patologico alla base della sindrome da rilascio di citochine (CRS) indotta dalla terapia CAR-T, dalla fase locale di attivazione immunitaria e produzione di citochine fino alla possibile comparsa di manifestazioni sistemiche quali febbre, ipotensione, ipossia e disfunzione multiorgano⁶⁰.

Una percentuale minore di pazienti sviluppa tossicità neurologiche aspecifiche e variabili, oggi note come sindrome da neurotossicità associata alle cellule effettrici immunitarie (ICANS). Queste possono verificarsi in concomitanza con la CRS o dopo la sua risoluzione: si manifestano solitamente entro 4 settimane dall'infusione con confusione, delirio, letargia, afasia e tremori, probabilmente causati dalla presenza di CAR-T nel sistema nervoso centrale presentante CD19 a livello delle cellule murali cerebrali⁶¹. Viene trattata clinicamente con terapia di supporto, corticosteroidi se in concomitanza con CRS, ricovero in terapia intensiva se in emergenza. L'uso precoce di steroidi sembra ridurre l'incidenza della CRS correlata al trattamento con CAR-T e degli eventi neurologici ed è raccomandato per alcuni prodotti come Yescarta. Uno degli effetti avversi della terapia con CAR-T è la linfocitosi emofagocitica (HLH), caratterizzata da un'attivazione disregolata dei linfociti T citotossici, delle cellule natural killer e dei macrofagi, che porta a

ipercitochinemia ed a un danno immuno-mediato a carico di molteplici organi. Si tratta con terapia di supporto e corticosteroidi per ridurre il rilascio citochinico⁶⁰. La rapida eliminazione di un gran numero di cellule tumorali in un breve intervallo di tempo può inoltre causare la sindrome da lisi tumorale: le cellule tumorali lisate rilasciano nel torrente ematico grandi quantità di potassio, fosfato e acidi nucleici, portando a iperkaliemia, iperfosfatemia, ipocalcemia e rischio di insufficienza renale acuta⁶². Pazienti che hanno subito un trapianto allogenico possono andare incontro alla graft versus host disease (GvHD): le cellule derivate dal donatore possono riconoscere gli organi del ricevente come estranei e scatenare una risposta immunitaria contro i tessuti del paziente. Si manifesta fino a 100 giorni dopo il trapianto e ha effetti principalmente su cute, fegato e tratto gastrointestinale⁶³. Le variazioni interindividuali nella risposta delle cellule T e nel rischio di tossicità rendono difficile prevedere il numero ottimale di cellule da infondere, per questo motivo lo sviluppo di sistemi regolatori che permettano di controllare la dose e la tempistica dell'attività delle cellule T rappresenta una priorità fondamentale.

1.5.3 Tipologie di costrutti

L'ingegnerizzazione delle cellule T per riconoscere una singola molecola nelle neoplasie può portare alla proliferazione di cellule tumorali prive di antigene, che sfuggono al riconoscimento immunitario⁶⁴. Per contrastare l'eterogeneità antigenica e prevenirne l'escape sono in sviluppo CAR-T che non fungono più solamente da recettori, ma sono dei veri e propri circuiti biologici programmabili. Queste utilizzano logiche computazionali come "OR", "AND" e "NOT". In una porta logica "OR" possono essere presenti più segnali di input (in questo caso, più antigeni), e ciascuno di essi può attivare l'esito desiderato.

- CAR-T tradizionali utilizzano una logica "OR" e si attivano in seguito al riconoscimento di un solo antigene, hanno quindi massima sensibilità.
- CAR-T bispecifiche possiedono un recettore che contiene due distinti domini di riconoscimento dell'antigene, associati a due distinti domini intracellulari di segnalazione, ed è espresso come due diversi CAR sulla superficie della stessa cellula. Questo permette di compensare i meccanismi di evasione tumorale riconoscendo un secondo antigene nel caso in cui il

primo venga perso. BiTE (Bispecific T-cell Engagers) sono farmaci anticorpali bispecifici solubili che collegano, ad esempio, il CD3 del linfocita T con il CD19 della cellula tumorale, avvicinandoli⁶⁵. Una singola CAR-T codifica quindi per due scFv distinti per due antigeni diversi (ad esempio CD19+CD22), segue una logica “OR” potenziata permettendo di uccidere cellule che esprimono almeno uno dei due target⁶⁶.

- CAR tandem possiedono un unico CAR con due scFv concatenati, mostrando un’attività antitumorale sinergica quando entrambi gli antigeni vengono riconosciuti simultaneamente. Hanno maggiore avidità, migliorando quindi la forza di interazione tra le molecole⁶⁷.
- uCAR (CAR universali) sono state create per superare i limiti di riconoscimento delle catene scFv: CAR associati a biotina o uno scFv anti-fluorescina istiocianato (FITC) vengono legati a un dominio transmembrana e un dominio intracellulare di segnalazione. Le cellule ottenute riconoscono ed eliminano efficacemente le cellule tumorali grazie al legame con anticorpi monoclonali specifici per l’antigene marcati con FITC o biotinilati. Questi anticorpi fungono da ponte e stimolano la proliferazione dei linfociti T e la produzione citochinica.
- NK-CAR sono CAR basati su cellule natural killer (NK), in grado di riconoscere cellule infette in assenza di MHC ed anticorpi e attivare una risposta immunitaria rapida. Producono TNF- α , IFN- γ e IL-10 e reclutano cellule dendritiche e macrofagi che contribuiscono a potenziare linfociti T e B. Il principale recettore coinvolto è NKG2, espresso dalle cellule tumorali e riconosciuto dalle cellule NK. CAR-NK presentano alcuni vantaggi rispetto alle CAR-T, hanno minore tossicità e riducono il rischio di effetti avversi come la sindrome da rilascio citochinico e il graft versus host disease (GvHD).

Nella logica “AND” la cellula esprime due recettori separati, ciascuno con metà del segnale (uno con CD3 ζ , l’altro con dominio costimolatorio) e solo il riconoscimento simultaneo dei due antigeni attiva pienamente la cellula T (split CAR, figura 8). Questo meccanismo permette di ridurre significativamente la tossicità associata alla terapia⁶⁷.

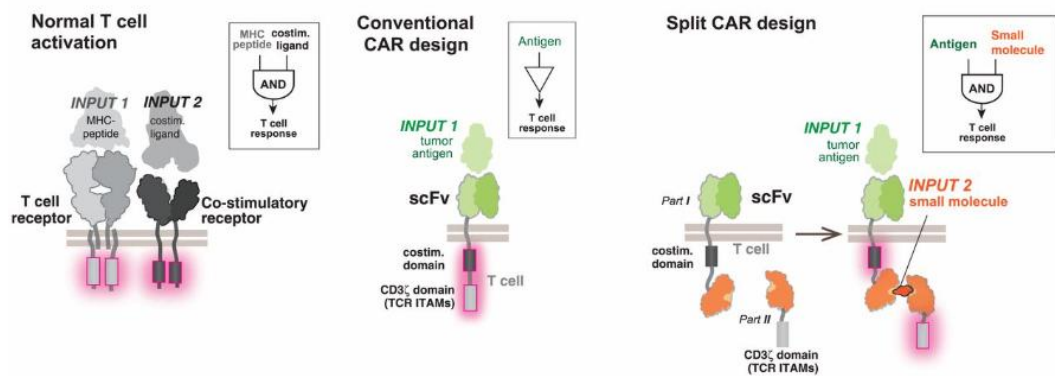


Fig. 8: a sinistra, doppia attivazione di TCR e di un recettore costimolatorio che innescano produzione di citochine e proliferazione cellulare. Al centro, un CAR convenzionale combina scFv, ITAM e domini costimolatori in un'unica molecola. A destra due polipeptidi fisicamente separati (split) possono essere riassemblati in presenza di una piccola molecola in grado di indurre dimerizzazione⁶⁸.

La logica “NOT” prevede il riconoscimento di antigeni che si trovano sui tessuti normali ma non sulle cellule tumorali.

- iCAR (CAR inibitorie) prevengono l'attivazione della cellula T in presenza dell'antigene tissutale, grazie a domini di corecettori inibitori come PD-1, o CTLA4 che permettono una riduzione della citotossicità e della produzione di citochine. Integrano due recettori chimerici, uno attivatorio ed uno inibitorio: quest'ultimo genera un segnale dominante negativo che limita la risposta delle CAR-T attivate contro le cellule sane, permettendo la loro distinzione da quelle tumorali. iCAR targettizzano specificatamente l'antigene di interesse per prevenire la tossicità on-target/off-tumor.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Criteri e limiti nella selezione del paziente e nella produzione della terapia

Le terapie con CAR-T sono di recente introduzione e molto costose (il prezzo è compreso fra i 373.00 e i 475.000 dollari) e vengono tipicamente utilizzate su pazienti recidivanti o che non hanno risposto ai trattamenti precedenti. Alcuni pazienti tuttavia non sono eligibili a questo tipo di trattamento, a causa di lunghi tempi d'attesa per l'ingegnerizzazione del recettore, un'eventuale intolleranza alle tossicità della terapia stessa o per la presenza di popolazioni a rischio non ancora osservate (pazienti HIV+, pazienti con epatite, malati in rapida progressione). L'eleggibilità del paziente viene inoltre definita sul rischio individuale comparato alla possibilità di seguire altre opzioni terapeutiche⁶⁹. Ogni nuova generazione di cellule CAR-T si è concentrata sull'incorporare strategie di ingegneria sempre più sofisticate nella costruzione del CAR, con l'obiettivo di ottenere una maggiore persistenza delle cellule CAR-T nei pazienti e una migliore efficacia clinica. Nonostante la continua evoluzione nella progettazione delle cellule CAR-T, una frazione significativa dei pazienti oncologici va incontro a recidiva dopo il trattamento e infine soccombe alla malattia; permangono inoltre importanti ostacoli prima che successi comparabili possano essere ottenuti anche nei tumori solidi⁷⁰. Gli sforzi più recenti nella produzione delle cellule CAR-T si sono concentrati sull'affrontare ostacoli ancora presenti, tra cui: migliorarne la persistenza, ridurre la tossicità e mantenere le cellule in uno stato altamente funzionale dopo l'infusione. Sulla base di studi retrospettivi derivati dall'applicazione clinica delle CAR-T, sta diventando sempre più evidente che le differenze nei processi di produzione possono influenzare direttamente la composizione del prodotto finale, come la percentuale di cellule che esprimono il CAR, il rapporto tra cellule T CD4 e CD8 e la frequenza relativa delle cellule T nei diversi stadi di differenziazione⁷¹.

2.1 Procedura di produzione

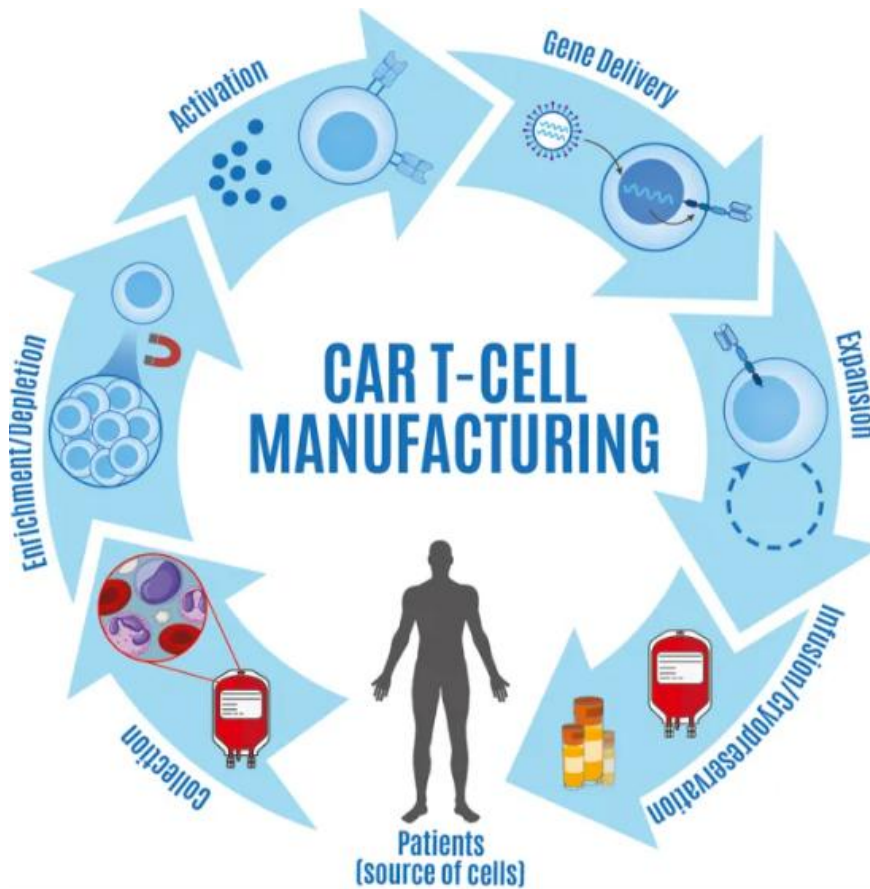


Fig. 9: Schema delle principali fasi di produzione delle cellule CAR-T, dalla raccolta delle cellule del paziente alla loro attivazione, modificazione genetica, espansione in vitro, preparazione all'infusione e successiva somministrazione al paziente.⁷²

Le principali fasi (figura 9) di tutti gli attuali processi di produzione delle cellule CAR-T includono:

- 1- *Prelievo e criopreservazione.* L'aferesi è una procedura medica che permette, in seguito al prelievo di sangue dal paziente, di separare le diverse componenti ematiche per ottenerne una di selezione (in questo caso vengono selezionati i linfociti, tramite la procedura della leucoafèresi, mentre le altre componenti ematiche vengono reinfuse). Questa è una fase critica del processo, in quanto diventa cruciale la raccolta di un numero adeguato di linfociti CD3 positivi che garantisca il successo della produzione. Utilizzando il prodotto fresco di leucoafèresi la finestra di produzione diventa limitata alle 24 o 48 ore successive. I pazienti che

attendono la realizzazione del farmaco da prodotto fresco devono avere slot di produzione riservati oppure attendere che se ne liberi uno. In alternativa, la crioconservazione permette una flessibilità maggiore di programmazione e una migliore capacità di far fronte ad eventuali ritardi nella spedizione del prodotto⁷³. L'isolamento e/o la deplezione di specifiche sottopopolazioni cellulari svolge un ruolo importante nel processo di produzione delle cellule CAR-T (la rimozione delle cellule Treg, ad esempio, determina un aumento complessivo dell'attività antitumorale⁷⁴), in particolare quando l'obiettivo è aumentare la rappresentazione di una determinata popolazione cellulare nel prodotto finale. L'arricchimento di specifici sottotipi CD8⁺ e CD4⁺ è stato esplorato come strategia per migliorare le caratteristiche desiderate delle cellule CAR-T (tisa-cel detta anche Kymriah e axi-cel, Yescarta, sono prodotte da popolazioni miste CD8⁺ e CD4⁺)⁷⁵.

- 2- *Ingegnerizzazione genetica*. L'attivazione dei linfociti T è fondamentale per il successo del processo di ingegnerizzazione cellulare, poiché influisce direttamente sia sull'efficienza di integrazione del transgene CAR sia sull'espansione delle cellule T durante la coltura *ex vivo*⁷⁶. Viene comunemente ottenuta tramite stimolazione di CD3 e CD28 che, rispettivamente, attivano i linfociti T e forniscono la costimolazione necessaria ad evitare l'anergia. L'integrazione del transgene CAR prevede la trasduzione lentivirale (in introni o regioni intergeniche) o retrovirale (in promotori, esoni o regioni non tradotte)⁷⁷, che permette una lunga persistenza, ma potrebbe portare ad un'integrazione non specifica del sito e conseguente rischio di mutagenesi inserzionale o attivazione oncogenica. Un'altra tecnica prevede l'utilizzo di trasposoni che, attraverso l'enzima trasposasi, integrano il CAR nella cellula T grazie ad un processo detto elettroporazione (una scarica elettrica che apre la membrana plasmatica permettendo la penetrazione delle sequenze di DNA)⁷³. Metodi di trasferimento non virali vedono l'utilizzo di Cas9 integrato con sgRNA (figura 10), insieme permettono il riconoscimento della sequenza target e la rottura del doppio filamento, in cui è possibile inserire il gene tramite

ricombinazione omologa. CRISPR viene utilizzato per il knockout di PD1 o per l'integrazione virale del CAR.

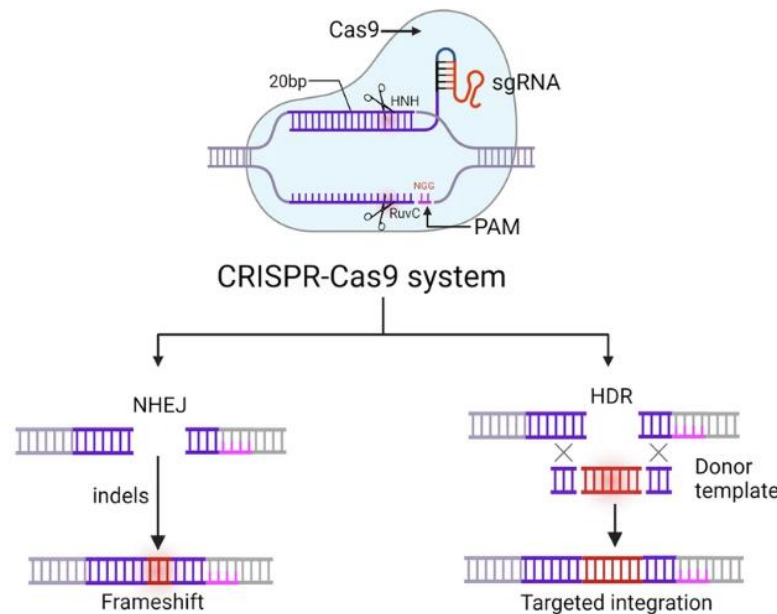


Fig. 10: quando Cas9 ibridizza con il sito target induce rotture a doppio filamento del DNA che verranno riparate attraverso meccanismi come il non-homologous end joining (NHEJ) e la homology-directed repair (HDR)⁷⁸.

Tutti i prodotti CAR-T devono rispettare i parametri di sicurezza, purezza, potenza, identità (espressione del CAR e vitalità), stabilità, riproducibilità ed efficacia, stabiliti dall'FDA (US Food and Drug Administration) e dall'EMA (Agenzia Europea per i Medicinali). Guardando al futuro, i processi di produzione di nuova generazione avanzata potrebbero eliminare completamente la manipolazione e l'espansione cellulare *ex vivo*, producendo invece popolazioni cellulari terapeutiche direttamente *in vivo*.

- 3- *Chemioterapia linfodepletiva*. Solitamente somministrata in regime di day hospital, riduce temporaneamente i linfociti del paziente per dare spazio alle CAR-T che dovranno essere infuse.
- 4- *Infusione*.
- 5- *Monitoraggio*. Il paziente resta ricoverato per alcuni giorni per il controllo degli effetti avversi al trattamento. Anche dopo la dimissione è prioritario che il soggetto rimanga nei pressi della struttura qualificata per essere sottoposto a controlli regolari.

2.2 La citofluorimetria

La citofluorimetria è una tecnologia di laboratorio che si basa sulla dispersione della luce: una sospensione cellulare monodispersa (come può essere un campione di midollo osseo o di sangue periferico) viene iniettata in un sistema fluidico che, in opportune condizioni idrodinamiche, trasporta le cellule in modo separato e ordinato fino al punto di misura, dove vengono colpite da un fascio di luce focalizzata proveniente da un laser. L'incontro fra quest'ultimo e la cellula permette di generare segnali sulla base delle caratteristiche della cellula stessa e/o in base alla presenza di molecole fluorescenti presenti sulla superficie cellulare. I segnali verranno raccolti da un sistema ottico di lenti e inviati ai corrispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. Il segnale emesso dal sensore infine viene amplificato, digitalizzato e visualizzato su monitor, con rappresentazione grafica e definizione statistica. Le cellule vengono tipicamente marcate con anticorpi legati a fluorocromi che si legano a molecole presenti sulla membrana cellulare o all'interno della cellula e, quando investite dal fascio laser, viene misurata poi la quantità di fluorescenza emessa^{79,80}.

La citofluorimetria può essere riassunta in quattro passaggi:

- 1- Cellule appartenenti ad una popolazione eterogenea vengono marcate e aspirate nella provetta e immerse in una camera di flusso, dove si dispongono in fila indiana,
- 2- Ogni singola cellula viene attraversata da un fascio di luce, emesso da un laser, che eccita i fluorocromi e determina l'emissione di un segnale fluorescente
- 3- Il segnale passa attraverso filtri e specchi fino a raggiungere un rivelatore
- 4- Il segnale viene processato elettronicamente, trasformato da analogico a digitale e inviato all'analizzatore, che elabora il dato e lo visualizza tramite un grafico.

Il citofluorimetro (figura 11) può rilevare i parametri fisici e la fluorescenza emessi da una singola cellula, permettendo di individuare la percentuale di cellule che hanno una specifica dimensione o granulosità, o che esprimono una determinata molecola a cui è legato un determinato fluorocromo. I citofluorimetri moderni

analizzano fino a 50.000 cellule al secondo e possono modificare i parametri di analisi durante l'acquisizione. Tutti i citofluorimetri sono costituiti da tre componenti:

- 1- Un sistema fluidico, per il trasporto del campione e la sua focalizzazione idrodinamica. Questo sistema crea un flusso di corrente liquida, viene chiamato liquido di sheath (=guaina) in quanto ha la funzione di avvolgere le cellule affinché vengano spinte e organizzate in un flusso ordinato, costante e continuo, per disporsi in fila indiana ed essere rilevate dal sistema ottico (focalizzazione idrodinamica, permette di ottenere un flusso laminare in canali contornati dal liquido di sheath, che obbliga le cellule a disporsi impilate all'interno del canale stesso). È importante, dopo ogni saggio, effettuare lavaggi di questo sistema in modo che non ci siano contaminazioni da parte di liquidi diversi o che non si formino incrostazioni che potrebbero interrompere la fluidità del flusso.
- 2- Un sistema ottico, per l'indirizzamento dei fasci luminosi verso un sistema di specchi e prismi che li reindirizzano ai rivelatori. Comprende sia la fonte luminosa che il sistema di indirizzamento dei fasci luminosi verso il sistema di specchi e prismi, costituendo un vero e proprio cammino ottico. Vengono tipicamente utilizzati laser a diodi, che emettono fasci di luce monocromatica a determinate lunghezze d'onda. All'interno del sistema ottico uno o più fasci luminosi colpiscono le cellule, la luce viene diffratta dalle cellule stesse fornendo dati morfologici di queste, contemporaneamente eccita i fluorocromi che emettono segnali luminosi a lunghezze d'onda definite. La luce diffratta o emessa dai fluorocromi incontra poi un sistema di lenti poste ortogonalmente al fascio di eccitazione, rivelando le diverse lunghezze d'onda.

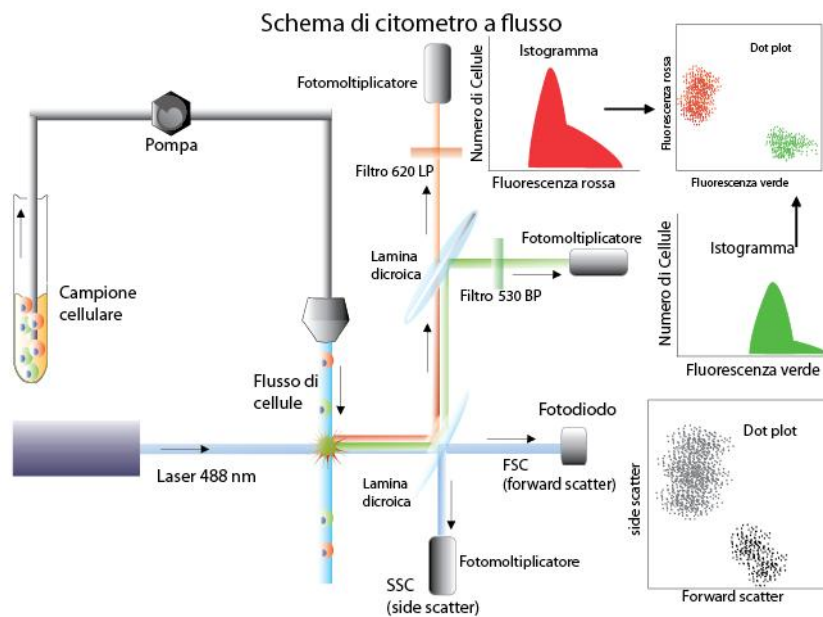


Fig. 11: schema di funzionamento di un citofluorimetro a flusso, con rappresentazione del passaggio delle cellule attraverso il fascio laser, della rilevazione dei segnali di scattering e fluorescenza e della successiva elaborazione dei dati sotto forma di istogrammi e dot plot.⁸¹

La luce attraversa le cellule e viene distribuita secondo due modalità: può essere sulla stessa linea del fascio di luce (dispersione frontale o forward scatter, FSC) ma anche lateralmente (dispersione laterale o side scatter, SSC); questi due parametri forniscono informazioni rispettivamente sulle dimensioni (volume) e sulla complessità cellulare. I fasci di luce vengono poi inviati a fotorivelatori che trasformano le informazioni analogiche in segnale elettrico (detti fotomoltiplicatori, in quanto sono in grado di amplificare il segnale prima di inviarlo). In questo modo è dunque possibile analizzare diversi fenotipi di cellule che sono molto simili fra loro, ad esempio i diversi tipi di linfociti T.

- 3- Un sistema elettronico, che converte le misurazioni analogiche in segnali elettrici. I dati provenienti dai fotomoltiplicatori vengono elaborati e convertiti in segnali digitali che verranno gestiti da un computer. La conversione viene gestita da un convertitore analogico digitale (ADC); i vari eventi vengono elaborati e riportati su un display video in tempo reale, sottoforma di diverse rappresentazioni grafiche. La rappresentazione più semplice è costituita dall'istogramma, dove l'ascissa riporta l'intensità di fluorescenza e l'ordinata il numero di cellule che esprimono o meno un

determinato marcatore. È inoltre possibile utilizzare grafici bidimensionali o tridimensionali che mettono a paragone due fluorescenze tra di loro. Gli eventi possono essere rappresentati come punti (dot-plot), linee concentriche di aree aventi la stessa densità (contour-plot) o in cui l'intensità del colore è proporzionale alla densità degli eventi (density-plot)(figura 12).

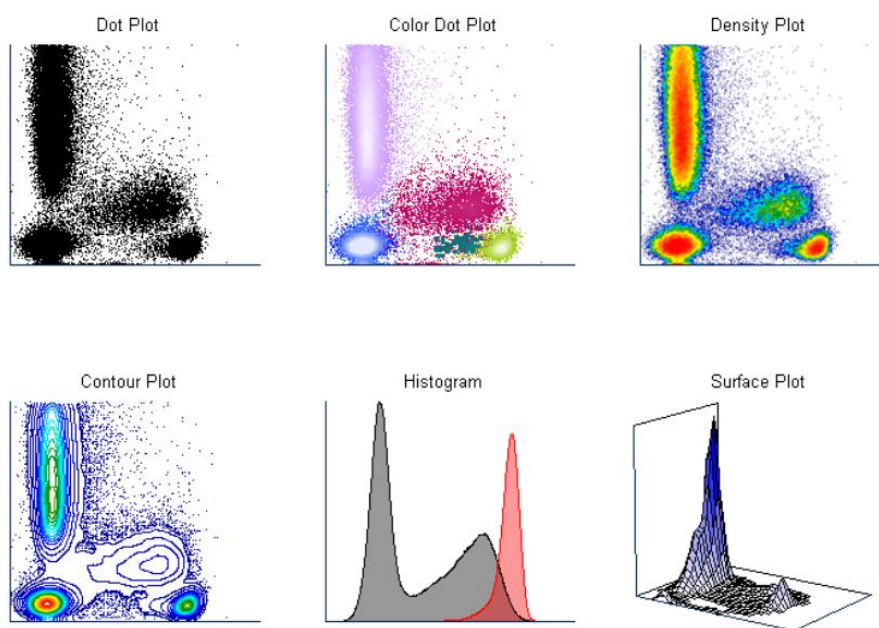


Fig. 12: Esempi di rappresentazione grafica dei dati citofluorimetrici, visualizzati mediante dot plot, color dot plot, density plot, contour plot, istogramma e surface plot, utili per l'identificazione e la caratterizzazione delle diverse popolazioni cellulari⁸².

I fluorocromi vengono eccitati da laser e subiscono una transizione elettronica che determina un rilascio di energia sotto forma di fotoni, i quali emettono a lunghezze d'onda maggiori rispetto a quelle a cui vengono eccitati. Fluorocromi diversi possiedono lunghezze d'onda diverse. Il sistema di filtri e specchi del sistema ottico separa le diverse lunghezze d'onda, ma poiché gli spettri di emissione sono spesso sovrapponibili, la combinazione di marcatori fluorescenti che possono essere utilizzati dipende dalla lunghezza d'onda dei laser utilizzati per eccitare i fluorocromi e dai rivelatori disponibili. I fluorocromi possono legarsi direttamente e in maniera stechiometrica a determinate sostanze, ma solitamente sono legati ad un anticorpo specifico per antigeni bersaglio. Alcune sonde cellulari ci permettono di individuare mitocondri o anche specie reattive all'ossigeno. I fluorocromi storicamente più utilizzati sono il FITC (istiocianato di fluorescina), PE

(ficoeritrina), APC (alloficocianina); a questi sono aggiunti fluorocromi tandem (PE-Cy5, PE-Cy7 etc...)(figura 13)⁸³.

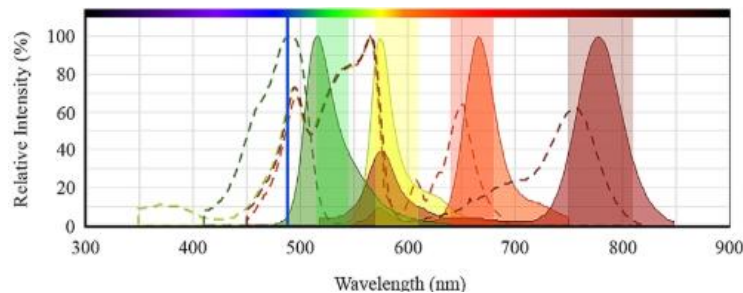


Fig. 13: spettri di assorbanza ed emissione di FITC (verde), PE (giallo), PE-Cy5 (arancione) e PE-Cy7 (rosso). Tutti i fluorofori sono stati eccitati con un laser argon a 488nm (linea blu)⁸⁴.

Le analisi al citofluorimetro ci permettono quindi l'identificazione di popolazioni cellulari, anche solo basandosi sulle loro caratteristiche fisiche. È possibile misurare le intensità medie di fluorescenza (MFI) di un marcatore poco o molto espresso, per poi paragonare gli istogrammi delle intensità medie con quelli ottenuti dopo la citofluorimetria di cellule che esprimono un determinato marcatore. Il confronto viene effettuato rispetto al picco del controllo isotipico, che definisce la soglia negativa di un determinato marcatore. Combinando i due segnali forward e side scatter si ottiene un grafico detto citogramma, caratterizzato da numerosissimi punti, ognuno dei quali rappresenta una singola cellula, raggruppati in base al tipo cellulare. Per poter separare e distinguere le diverse popolazioni gli operatori, per mezzo dei software di analisi, creano un'estrazione di sottoinsiemi e finestre chiamate gate. Ogni gate può poi essere trasposto in un istogramma.

2.3 Preparazione del campione

Tab.1 Principali marcatori CD di interesse.

Categoria	CD	Nome	Funzione	Ruolo nelle CAR-T
ATTIVAZIONE T	CD3	Complesso TCR	Trasduzione del segnale antigenico	Dominio intracellulare (CD3ζ nelle CAR-T)
ATTIVAZIONE T	CD4	Corecettore MHC II	Attivazione linfociti T helper	Produzione citochine
ATTIVAZIONE T	CD8	Corecettore MHC I	Attività citotossica	Effettori principali della citotossicità CAR-T
ATTIVAZIONE T	CD25	IL-2Rα	Recettore ad alta affinità per IL-2	Promuove espansione e proliferazione CAR-T
ATTIVAZIONE T	CD127	IL-7Rα	Sopravvivenza e mantenimento T	Associato a lunga persistenza CAR-T
CO-STIMOLAZIONE	CD28	Recettore co-stimolatorio	Attivazione e proliferazione T	Espansione rapida ma maggiore esaurimento
CO-STIMOLAZIONE	CD80	B7-1	Ligando di CD28	Attivazione T tramite APC
CO-STIMOLAZIONE	CD86	B7-2	Ligando di CD28	Attivazione T tramite APC
CO-STIMOLAZIONE	CD40	Recettore APC	Attivazione delle cellule presentanti l'antigene	Migliora risposta immunitaria e presentazione antigenica
CO-STIMOLAZIONE	CD137	4-1BB	Recettore costimolatorio	Maggiore persistenza e memoria
DIFFERENZIAZIONE/MEMORIA	CD45	Panleucocitario	Regolazione segnalazione TCR	Identificazione popolazione leucocitaria
DIFFERENZIAZIONE/MEMORIA	CD45RA	Isoforma naïve	Marker linfociti T naïve	Associato a CAR-T più persistenti (Tscm)
DIFFERENZIAZIONE/MEMORIA	CD27	Recettore TNF	Sopravvivenza e memoria T	Marker di cellule T memory (Tcm)
DIFFERENZIAZIONE/MEMORIA	CD197 (CCR7)	Chemokine receptor	Homing ai linfonodi	Favorisce persistenza e traffico CAR-T
DIFFERENZIAZIONE/MEMORIA	CD57	Marker senescenza	Differenziazione terminale	Indicatore negativo di cellule meno efficaci
EXHAUSTION	CD279	PD-1	Checkpoint inibitorio	Inibitore CAR-T
BERSAGLI CAR-T	CD19	Antigene B	Espresso su cellule B	Target principale nelle CAR-T anti-CD19
BERSAGLI CAR-T	CD22	Antigene B	Espresso su cellule B	Target alternativo in caso di escape da CD19
BERSAGLI CAR-T	CD269	BCMA	Recettore TNF	Espresso su plasmacellule, target principale CAR-T nel mieloma multiplo
REGOLAZIONE, IMMUNITÀ	CD25	IL-2Rα	Espresso anche su Treg	Possibile effetto negativo, causa espansione delle Treg
REGOLAZIONE, IMMUNITÀ	CD40	Recettore TNF	Interazione con CD40L	Migliora attivazione immunitaria globale
APOPTOSI	CD95	Fas	Induzione apoptosi	Controllo morte cellulare CAR-T

Il paziente giunge all'ambulatorio del reparto Trasfusionale dove viene sottoposto ad un prelievo di sangue venoso periferico (analizzato entro 24 ore) e ad una successiva procedura aferetica prolungata, per riempire la sacca di raccolta con il volume cellulare necessario alla successiva ingegnerizzazione. Per le analisi sul sangue intero vengono dispensati 100µl di sangue periferico diluito in PBS al fine di ottenere una concentrazione di globuli bianchi di 10.000 cellule/µl. Dopo un'incubazione al buio per 15 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo marcato appropriato, viene aggiunto alla provetta in cui è avvenuta la marcatura un lisante a base di cloruro di ammonio per eliminare le emazie e gli anticorpi non legati, le cellule marcate sono centrifugate e risospese in PBS. Dopo la centrifugazione vengono risospese in 500µl di PBS. Le cellule vengono quindi acquisite al citofluorimetro con target di acquisizione 100.000 eventi. Il passaggio successivo consiste nell'analisi di una piccola aliquota prelevata dalla sacca di raccolta, da cui verrà effettuata una conta delle cellule CD3+, la cui quantità sarà fondamentale per la produzione di un costrutto ottimale. Si utilizza DURAClone IM Count per il conteggio delle cellule CD45⁺ e dei linfociti T nel sangue intero differenziando le cellule vive e quelle morte. La combinazione di CD45, 7-Aminoactinomicina e sfere fluorescenti permette di determinare il numero e la vitalità delle cellule in maniera affidabile.

Tab.2: tubo DURAClone IM Count⁸⁵

FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC ₇₀₀	APC ₇₅₀	PB	KO
CD45			7-AAD						

In seguito alla valutazione, il campione viene inviato ai laboratori di ingegnerizzazione, dove i linfociti vengono modificati per far sì che esprimano le strutture necessarie per diventare costrutti della terapia CAR-T. Infine si procede all'infusione della terapia. Il protocollo di follow-up prevede un monitoraggio post-infusione differenziato in base alla patologia oncologica sottostante: per i pazienti affetti da linfoma, i controlli sono programmati a 3, 7, 10 e 30 giorni, mentre per i soggetti con mieloma multiplo la valutazione si estende a 60, 180 e 360 giorni. In corrispondenza di tali time-point, il paziente viene sottoposto a campionamenti

seriali di sangue periferico destinati all'analisi citofluorimetrica; tale metodica consente la quantificazione immunofenotipica delle sottopopolazioni linfocitarie e la determinazione della quota percentuale di cellule CAR-T persistenti. (Tab.3).

Tab. 3: CAR-T tube

FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC ₇₀₀	APC ₇₅₀	PB	KO
CARmAb			CD3	CD4			CD8	45	

Il pannello DURAClone IM T Cell viene utilizzato per indicare gli stadi di maturazione delle cellule T, coprendo gli stadi di differenziazione naïve, effettore, memoria e terminale (Tab. 4); utilizza 10 marcatori in combinazioni fluorocromatiche: CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45, CD45RA, CD57, CD197 (CCR7), CD279 (PD-1).

Tab. 4: DURAClone IM T Cell

FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC ₇₀₀	APC ₇₅₀	PB	KO
CD45RA	CD197/ CCR7	CD28	CD279 / PD-1	CD27	CD4	CD8	CD3	CD57	CD45

Dopo l'acquisizione dei campioni al citofluorimetro, i dati vengono analizzati mediante una strategia di gating sequenziale, finalizzata a selezionare progressivamente la popolazione cellulare di interesse ed escludere eventi non informativi o artefatti. La suddivisione delle cellule secondo forward e side scatter ci permette di escludere detriti o particelle non cellulari; quando previsto dal pannello, può essere inoltre utilizzato un marker di vitalità per escludere le cellule morte, caratterizzate da maggiore permeabilità di membrana e possibile legame aspecifico degli anticorpi. Una volta definita la popolazione cellulare valida, si procede con l'identificazione delle cellule leucocitarie, spesso mediante espressione di CD45, e successivamente con la selezione delle sottopopolazioni linfocitarie tramite marcatori specifici, come CD3 per i linfociti T, CD4 e CD8 per distinguere le principali sottopopolazioni T helper e citotossiche. Ulteriori marcatori

permettono poi di caratterizzare lo stato differenziativo o funzionale delle cellule, ad esempio distinguendo cellule naïve, memoria centrale, memoria effettrice ed effettrici terminali (figura 14).

Fenotipi dei linfociti T e marker CD ricercabili

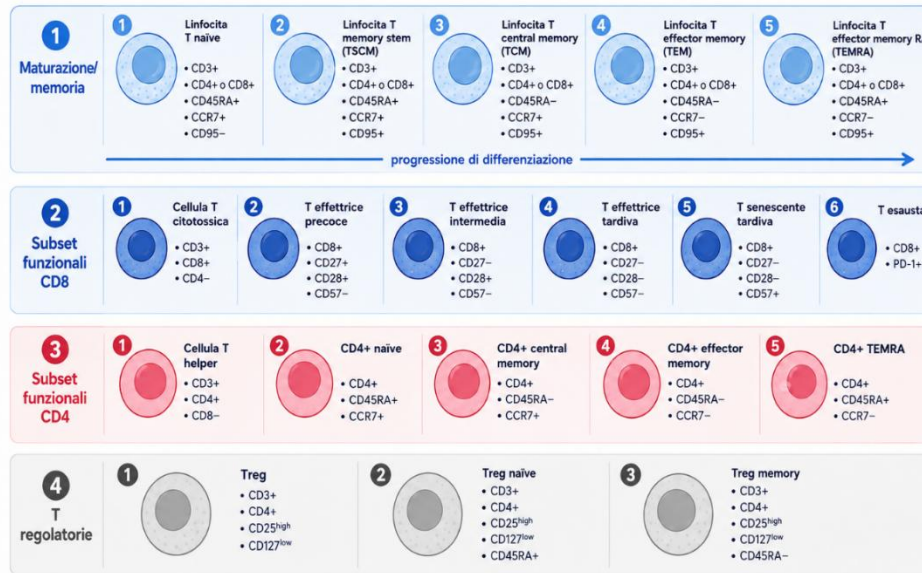


Fig. 14: Schema riassuntivo dei principali fenotipi linfocitari T identificabili mediante marcatori CD, con distinzione tra sottopopolazioni naïve, memory, effettrici, senescenti, esauste e regolatorie.

L'applicazione coerente della stessa strategia di gating a tutti i campioni risulta fondamentale per garantire confrontabilità, riproducibilità e accuratezza nell'interpretazione dei dati citofluorimetrici (figura 15).

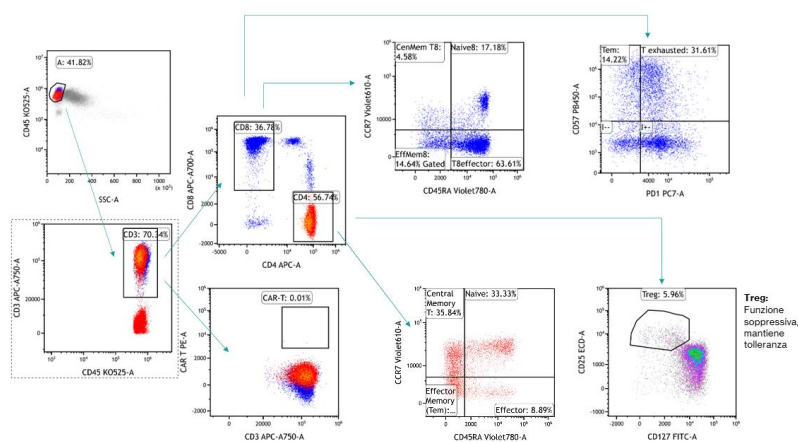


Fig. 15: Esempio di strategia di gating citofluorimetrico per l'identificazione e la caratterizzazione delle popolazioni cellulari T, con selezione progressiva dei linfociti,

distinzione delle sottopopolazioni CD4⁺ e CD8⁺, valutazione delle cellule CAR-T e analisi dei fenotipi di memoria, attivazione/esaurimento e popolazioni T regolatorie.

2.4 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata impostata come analisi esplorativa univariata, con l'obiettivo di valutare se le caratteristiche immunofenotipiche del prodotto di aferesi, espresse sia come percentuali sia come valori assoluti delle principali sottopopolazioni T CD4 e CD8, fossero associate agli outcome clinici successivi alla terapia CAR-T. In primo luogo, il database è stato sottoposto a una fase di preparazione e pulizia dei dati: sono stati considerati i pazienti unici presenti nella coorte, eliminando eventuali duplicati, e sono state analizzate le variabili citofluorimetriche relative a CD3, CD4, CD8 e ai rispettivi sottogruppi funzionali, disponibili sia come proporzione percentuale sia come conta assoluta. Il test di Mann-Whitney U, è stato utilizzato per confrontare le variabili citofluorimetriche continue tra due gruppi indipendenti di pazienti. Le variabili confrontate erano rappresentate dalle percentuali e dalle conte assolute delle diverse sottopopolazioni linfocitarie T, come CD3, CD4, CD8, cellule naïve, central memory, effector memory, TEMRA ed exhausted. Poiché queste variabili biologiche possono presentare una distribuzione non normale, valori estremi e numerosità campionarie ridotte, è stato scelto un approccio non parametrico. Il test di Mann-Whitney, infatti, non richiede che i dati seguano una distribuzione gaussiana e non confronta direttamente le medie dei due gruppi, ma valuta se i valori osservati in un gruppo tendono complessivamente a essere più alti o più bassi rispetto all'altro. Per farlo, tutti i valori vengono ordinati insieme e trasformati in ranghi; successivamente il test verifica se la somma dei ranghi di un gruppo differisce da quella attesa nel caso in cui le due popolazioni fossero sovrapponibili. In termini pratici, quindi, il Mann-Whitney permette di stabilire se una determinata sottopopolazione cellulare sia distribuita in modo significativamente diverso tra due gruppi clinici, senza assumere normalità dei dati. La mediana rappresenta un indice più robusto della tendenza centrale quando il campione è piccolo o quando sono presenti valori molto alti o molto bassi, condizione frequente nelle analisi citofluorimetriche e nelle conte cellulari. L'interpretazione del p-value ottenuto con il test di Mann-Whitney deve essere fatta considerando il carattere esplorativo dello studio. Un valore di p

inferiore alla soglia convenzionale di 0,05 indica che la distribuzione della variabile analizzata differisce tra i due gruppi in modo difficilmente attribuibile al caso, ma non dimostra necessariamente un rapporto causale tra quella sottopopolazione cellulare e l'outcome clinico.

3. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è valutare, in una coorte retrospettiva monocentrica di pazienti sottoposti a terapia CAR-T, l'eventuale associazione tra la composizione immunofenotipica del prodotto di aferesi e gli outcome clinici, con particolare attenzione alla risposta terapeutica, all'espansione in vivo delle CAR-T e allo sviluppo di tossicità immuno-mediate, quali CRS e ICANS.

4. RISULTATI

Lo studio è stato realizzato nella sezione Citometria del Laboratorio Analisi dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria ed è stato condotto su campioni di sangue periferico inviati al laboratorio dal reparto di Ematologia. L'analisi statistica e citofluorimetrica di screening sulla percentuale e persistenza delle CAR-T è stata eseguita su 48 pazienti arruolati dall'inizio del 2025 (di cui 43 con almeno un'analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni T) così suddivisi: 16 pazienti con mieloma multiplo (MM), 25 pazienti con Linfoma Diffuso a Grandi Cellule B (DLBCL), 3 pazienti con linfoma mantellare (MCL), 3 pazienti con linfoma follicolare (FL) e 1 paziente con linfoma primario a grandi cellule B del mediastino (PMBCL).

Al fine della valutazione della risposta clinica alla terapia CAR-T i pazienti sono stati classificati in due categorie principali: responder e non-responder. Sono stati considerati responder i pazienti che hanno ottenuto una risposta completa (CR), una risposta parziale molto buona (VGPR) o una risposta parziale (PR). Sono stati invece classificati come non-responder i pazienti con malattia stabile (SD) o progressione di malattia (PD). Questa classificazione è stata applicata alla migliore risposta ottenuta (best response) e alla rivalutazione al giorno +30. La rivalutazione al giorno +90 non è stata invece considerata adeguata per un confronto statistico robusto, poiché era presente un solo paziente non-responder valutabile.

Tab.5: suddivisione dei pazienti secondo le categorie responder e non responder

Coorte	N totale	N responder	N non-responder
Inclusi (MM + DLBCL)	30	26	4
MM	14	12	2
DLBCL (incl. FL/PMBCL/MCL)	16	14	2

Alcune analisi hanno incluso un numero inferiore di pazienti rispetto alla coorte iniziale perché non tutti disponevano contemporaneamente del dato clinico e del corrispondente dato citofluorimetrico. I dati disponibili su 30 pazienti hanno mostrato una tendenza verso valori mediani più elevati nei responder rispetto ai non-responder. Tuttavia nessuna di queste differenze ha raggiunto la significatività

statistica, probabilmente a causa del numero molto basso di non-responder valutabili, pari complessivamente a 4.

È stata valutata la dinamica di espansione sui soggetti divisi in due gruppi: un gruppo di pazienti affetti da mieloma multiplo ed un gruppo di pazienti affetti da DLBCL. Nei pazienti con MM si osserva una crescita progressiva più marcata nelle prime fasi: la mediana delle CAR-T passa da circa 1,9 cellule/ μ L al giorno 3, a 29,4 cellule/ μ L al giorno 7, fino a raggiungere un picco intorno al giorno 10, con una mediana di circa 153,5 cellule/ μ L. Successivamente si osserva una riduzione progressiva, con valori mediani di circa 43 cellule/ μ L al giorno 30, 3,5 al giorno 60, 1,8 al giorno 90 e 1,1 al giorno 180. Nei pazienti del gruppo DLBCL, invece, l'espansione appare più precoce ma meno persistente: la mediana è molto bassa al giorno 3 (0,43 cellule/ μ L), aumenta nettamente al giorno 7 (31,3 cellule/ μ L), ma già al giorno 10 risulta inferiore rispetto al MM (24,0 cellule/ μ L) e cala ulteriormente al giorno 30 (3,1 cellule/ μ L). I dati disponibili oltre il giorno 30 nel gruppo DLBCL sono molto limitati, quindi non consentono una valutazione robusta della persistenza a lungo termine (figura 16).

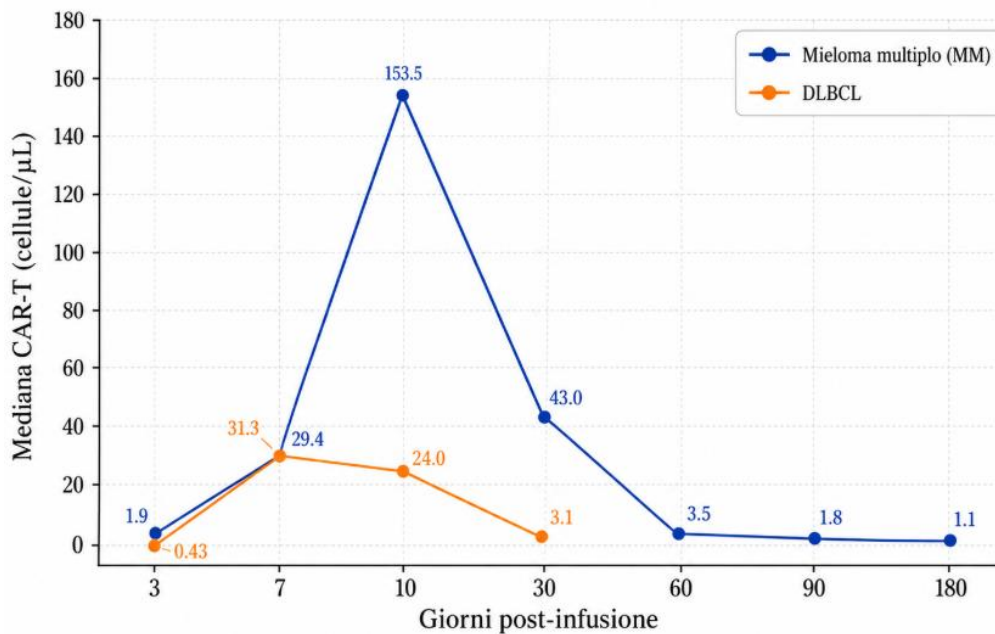


Fig. 16: dinamica di espansione CAR-T *in vivo* in pazienti affetti da MM (in blu) e DLBCL (in giallo)

Pazienti con MM sembrano mostrare una fase espansiva più tardiva e intensa, con picco al giorno 10 e persistenza misurabile fino ai controlli successivi, mentre

pazienti con DLBCL presentano un picco più precoce, già evidente al giorno 7, seguito da una contrazione più rapida. La suddivisione in due gruppi ha permesso inoltre lo studio della dinamica di espansione delle diverse sottopopolazioni indagate con l'esame citofluorimetrico: di 16 pazienti affetti da MM 14 possedevano dati relativi alle sottopopolazioni linfocitarie, mentre di 32 pazienti affetti da linfomi, 29 possedevano tutte le informazioni necessarie per procedere con il test statistico. Il confronto tra pazienti affetti da mieloma multiplo e pazienti affetti da linfoma mediante test di Mann–Whitney ha evidenziato alcune differenze nominalmente significative nei sottogruppi linfocitari, in particolare per CD4 totali, CD4 naïve e CD8 central memory assolute e relative. Tra le variabili analizzate, le CD8 central memory assolute (N=conta assoluta) mostrano una differenza nominalmente significativa tra mieloma e linfomi, mentre le CD4 naïve e totali della sacca e le CD8 central memory relative mostrano un andamento borderline o di trend. Tuttavia, non emergono differenze statisticamente robuste dopo correzione multipla pertanto i risultati devono essere considerati esplorativi (figura 17).

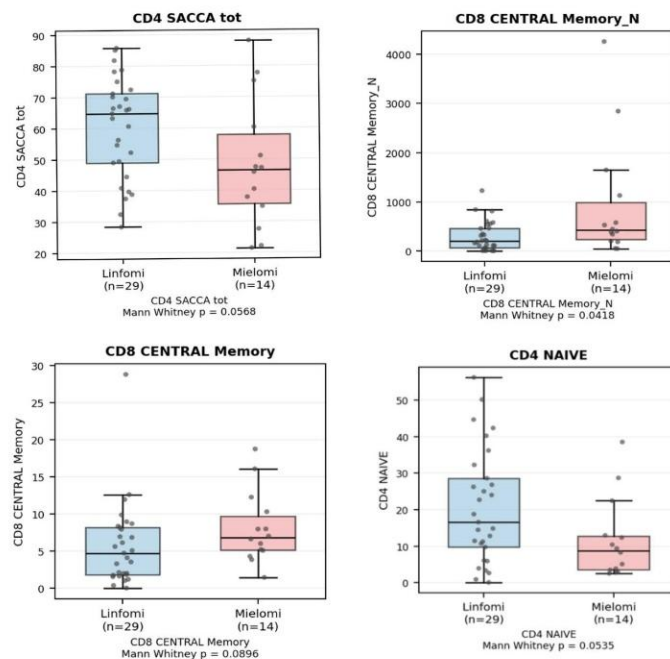


Fig. 17: confronto tra pazienti con linfoma e pazienti con mieloma nell'espressione di diverse sottopopolazioni linfocitarie T. Per ciascun confronto è riportato il valore di significatività ottenuto mediante test di Mann–Whitney. Tra le popolazioni analizzate, le CD8 Central Memory N risultano significativamente aumentate nei pazienti con mieloma rispetto ai linfomi ($p = 0,0418$), mentre le CD4 totali della sacca e le CD4 naïve mostrano una tendenza alla significatività, con valori di p prossimi alla soglia convenzionale di 0,05.

Lo studio ha inoltre valutato la relazione tra sottopopolazioni CD4 e CD8, risposta al trattamento, tossicità immuno-mediata, in particolare CRS e ICANS e sopravvivenza libera da progressione e globale. I pazienti responder hanno mostrato valori significativamente più elevati di cellule Tcm CD4 e CD8, Tem CD4, CD8 TEMRA, CD8 totali, CD8 naïve e CD3 totali rispetto ai non-responder (figura 17). Questo andamento è stato osservato sia considerando la migliore risposta ottenuta, sia la risposta al giorno +30. Le percentuali relative delle sottopopolazioni non hanno mostrato un'associazione evidente (figura 18).

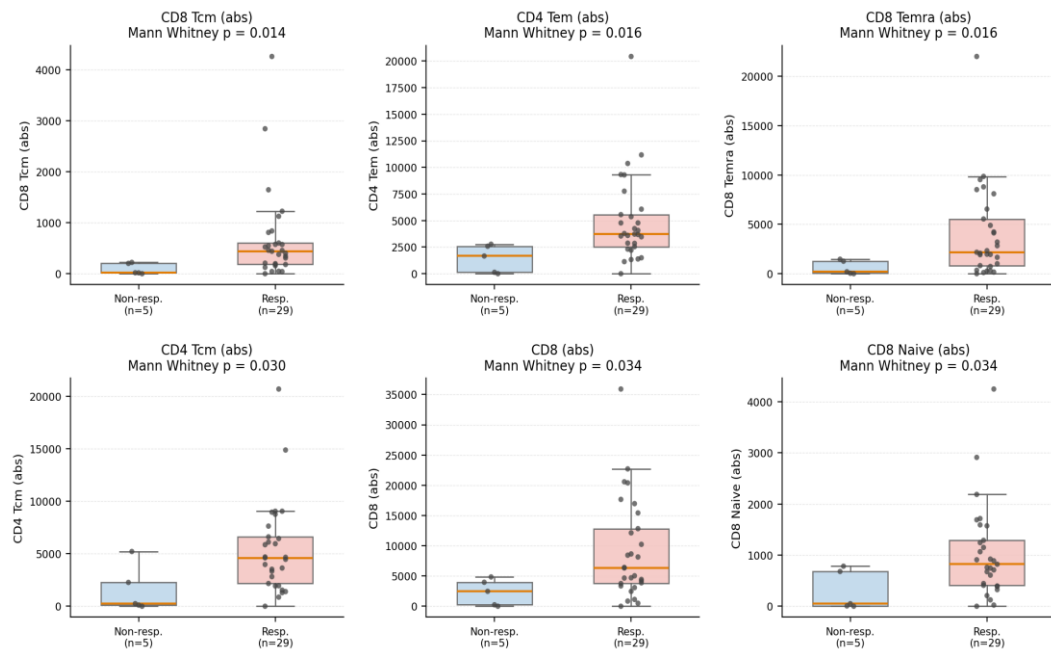


Fig. 18: confronto dell'espressione assoluta di diverse sottopopolazioni linfocitarie T tra pazienti responder e non responder. Le sottopopolazioni analizzate risultano complessivamente più rappresentate nei pazienti responder rispetto ai non responder, con differenze statisticamente significative per tutti i parametri mostrati (p compreso tra 0,014 e 0,034), suggerendo una maggiore espansione/persistenza delle popolazioni T nei pazienti con risposta clinica.

Le associazioni significative al test di Mann-Whitney, con $p < 0,05$, relative alla risposta clinica (migliore risposta, responder vs non-responder) comprendevano: CD8 Tcm assolute ($p=0,014$), CD4 Tem assolute ($p=0,016$), CD8 TEMRA assolute ($p=0,016$), CD4 Tcm assolute ($p=0,030$), CD8 assolute ($p=0,034$), CD8 naïve assolute ($p=0,034$) e CD3 assolute ($p=0,047$). Risultati simili sono stati osservati anche al giorno +30. La risposta al giorno +90, invece, presentava un numero troppo basso di pazienti non-responder ($n=1$) per consentire un confronto significativo.

Particolarmente interessante è il ruolo delle cellule Tcm, caratterizzate da elevata capacità proliferativa e dalla possibilità di generare cellule effettrici dopo nuova stimolazione antigenica. Nel modello di Cox continuo, una maggiore percentuale di Tcm CD4 è risultata associata a una migliore sopravvivenza, con HR 0,87 per ogni incremento dell'1%, IC 95% 0,76–0,99 e $p=0,033$ (per ogni aumento dell'1% di Tcm CD4 il rischio di morte si riduceva circa del 13%).

Le correlazioni di Spearman mostrano come la percentuale di Tem CD8 sia positivamente correlata al grado di CRS: $\rho = +0,44$ (positivo, le due variabili aumentano insieme), $p=0,012$, così come anche la percentuale di Tem CD4: $\rho = +0,38$, $p=0,033$. Questo suggerisce che, all'aumentare della percentuale di queste cellule, tendeva ad aumentare anche la gravità della CRS. È stata osservata anche una correlazione negativa tra percentuale di CD3 e grado di CRS: $\rho = -0,37$, $p=0,036$, lasciando supporre che, nei pazienti con CRS più severa, la percentuale complessiva di cellule CD3+ tendeva a essere più bassa (figura 19).

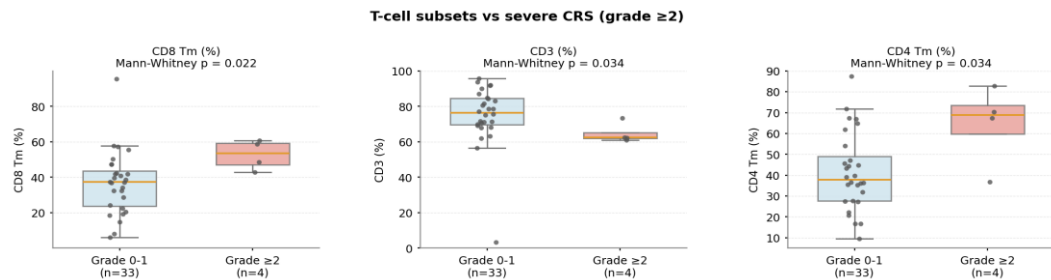


Fig. 19: confronto delle sottopopolazioni T tra pazienti con CRS di grado 0–1 e pazienti con CRS severa/grado ≥ 2 . I boxplot mostrano la distribuzione percentuale di CD8 Tem, CD3 e CD4 Tem nei due gruppi; i singoli punti rappresentano i valori individuali dei pazienti.

5. DISCUSSIONE

5.1 Efficacia ed utilizzo nelle emopatie

L'efficacia clinica delle CAR-T è risultata particolarmente evidente nelle emopatie maligne a cellule B, dove la presenza di antigeni ben definiti e uniformemente espressi, come CD19 e BCMA, ha reso possibile ottenere tassi di risposta senza precedenti. Studi clinici e revisioni sistematiche hanno dimostrato che, nei pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL) refrattaria o recidivante, le CAR-T anti-CD19 sono in grado di indurre remissioni complete nel 70-80% dei casi, rappresentando spesso un'opzione terapeutica salvavita o un ponte verso il trapianto di cellule staminali emopoietiche⁸⁶. Analogamente, nei linfomi non-Hodgkin aggressivi, in particolare nel linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), questa terapia ha mostrato tassi di risposta globale elevati, con percentuali di remissione completa che possono superare il 50% nei pazienti refrattari alle terapie convenzionali. Un ulteriore ambito di grande rilevanza è rappresentato dal mieloma multiplo, in cui le CAR-T dirette contro l'antigene BCMA hanno dimostrato tassi di risposta globale compresi tra il 70% e l'80%, con una quota significativa di remissioni profonde e durature anche in pazienti fortemente pretrattati. Rispetto alle cellule CAR-T anti-CD19 però sono disponibili meno dati sugli esiti a lungo termine dei pazienti con mieloma multiplo recidivante/refrattario trattati con CAR-T dirette contro BCMA⁸⁷. Questi risultati hanno portato all'approvazione di diversi prodotti CAR-T da parte delle principali agenzie regolatorie, consolidando il ruolo di questa terapia come standard di cura in specifiche condizioni cliniche (tab. 6)⁸⁸.

Tab.6: alcuni prodotti CAR-T in commercio

CAR T cell	Farmaco	Azienda	Target	Approvazione	Indicazione
Tisagen-lecleucel	Kymriah	Novartis	CD19	FDA/EMA	B-ALL, DLBCL
axicabtagene ciloleucel	Yescarta	Kite Pharma / Gilead	CD19	FDA/EMA	DLBCL, follicular lymphoma
Brexucabtagene-autoleucel	Tecartus	Kite Pharma / Gilead	CD19	FDA/EMA	MCL
lisocabtagene maraleucel	Breyanzi	Juno Therapeutics / BMS	CD19	FDA/EMA	DLBCL
idecabtagene vicleucel	Abecma	Celgene / Bristol Myers Squibb	BCMA	FDA/EMA	MM

L'elevata efficacia delle CAR-T nelle emopatie è attribuibile a diversi fattori biologici e immunologici. In primo luogo, i tumori ematologici presentano antigeni di superficie (figura 20) ben caratterizzati e relativamente omogenei, che rappresentano bersagli ideali per il riconoscimento da parte delle cellule CAR-T. Inoltre, la localizzazione sistemica di queste neoplasie che coinvolgono sangue, midollo osseo e tessuti linfoidei, facilita l'interazione tra cellule effettrici e bersagli tumorali. Infine, rispetto ai tumori solidi, il microambiente tumorale nelle emopatie risulta generalmente meno immunosoppressivo, consentendo una maggiore espansione e persistenza delle CAR-T in vivo.

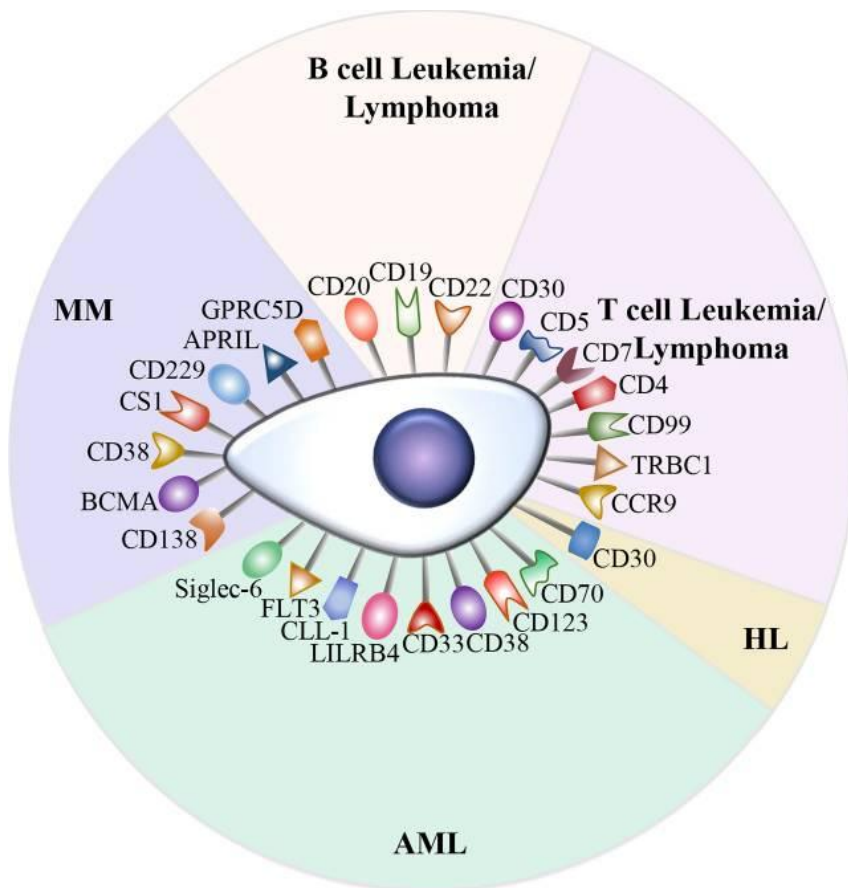


Fig. 20: target terapeutici possibili per malattie ematologiche, fra cui mieloma multiplo (MM), linfomi a cellule B e T, leucemia mieloide acuta (AML) e linfoma di Hodgkin (HL).

5.2 Associazione tra fenotipo T dell'aferesi, risposta clinica e tossicità CAR-T

I risultati ottenuti nella nostra analisi retrospettiva monocentrica suggeriscono che la composizione immunofenotipica del prodotto di aferesi possa rappresentare un elemento rilevante nel condizionare l'efficacia clinica della terapia CAR-T e, in parte, anche il profilo di tossicità. In particolare, nei pazienti responder è stata osservata una maggiore disponibilità assoluta di cellule T nel prodotto iniziale, con valori significativamente più elevati di diverse sottopopolazioni, tra cui cellule T central memory CD4 e CD8, cellule effector memory CD4, cellule CD8 TEMRA, cellule CD8 naïve, CD8 totali e CD3 totali. Questo dato è particolarmente interessante perché le differenze significative riguardano soprattutto i valori assoluti, mentre le percentuali relative dei singoli subset non mostrano un'associazione altrettanto evidente con la risposta clinica. Tale osservazione

suggerisce che, nella coorte analizzata, non sia tanto la semplice distribuzione percentuale delle sottopopolazioni linfocitarie a risultare determinante, quanto piuttosto la quantità complessiva di cellule T disponibili nel materiale di partenza. Un prodotto di aferesi quantitativamente più ricco di cellule T potrebbe riflettere una migliore fitness immunologica del paziente e una maggiore capacità del prodotto cellulare di espandersi durante le fasi di produzione e dopo l'infusione. Le cellule central memory, in particolare, rappresentano un subset funzionalmente favorevole, poiché possiedono elevata capacità proliferativa, maggiore potenziale di sopravvivenza e possibilità di generare cellule effettrici dopo nuova stimolazione antigenica; la loro maggiore presenza nei responder può quindi essere interpretata come un indice di migliore qualità del compartimento T di partenza. Nella sezione dei risultati della tesi viene infatti riportato che i responder presentavano valori più elevati di Tcm CD4 e CD8, Tem CD4, CD8 TEMRA, CD8 totali, CD8 naïve e CD3 totali rispetto ai non-responder, con associazioni significative al test di Mann-Whitney per CD8 Tcm assolute, CD4 Tem assolute, CD8 TEMRA assolute, CD4 Tcm assolute, CD8 assolute, CD8 naïve assolute e CD3 assolute. Questo andamento, osservato sia considerando la migliore risposta ottenuta sia la rivalutazione al giorno +30, rafforza l'ipotesi che la qualità e la numerosità del compartimento linfocitario T al momento dell'aferesi possano influenzare la successiva efficacia terapeutica. Al contrario, la rivalutazione al giorno +90 non consente conclusioni robuste, poiché il numero di non-responder valutabili era estremamente basso. Nel loro studio Wang et al.⁸⁹ hanno analizzato retrospettivamente 58 pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B recidivato/refrattario, trattati con CAR-T anti-CD19/CD20, confrontando le cellule T raccolte prima della produzione, il prodotto CAR-T finale e l'esito clinico dopo infusione. Nella loro analisi dimostrano che le differenze osservate nel prodotto CAR-T finale erano già presenti, almeno in parte, nel materiale di partenza. In particolare, nei pazienti con risposta duratura era maggiore la presenza di cellule T CD8+ naïve e di cellule con espressione di CCR7, un marcatore associato a fenotipi meno differenziati e più "memory-like". Nei pazienti resistenti, invece, le cellule T CD8+ naïve del materiale di partenza mostravano perdita di CCR7 e maggiore espressione di geni legati ad attivazione/inibizione, tra cui TIGIT e LAG3. Fraietta

et al.⁹⁰ analizzano pazienti con leucemia linfatica cronica trattati con CAR-T anti-CD19, confrontando pazienti in risposta completa, risposta parziale o mancata risposta. Le CAR-T dei pazienti con risposta completa non erano solamente più numerose, ma biologicamente diverse, mostrando un profilo trascrizionale arricchito di geni legati alla memoria precoce. I costrutti dei non responder invece erano più orientati verso programmi di differenziazione effettrice tardiva, glicolisi, esaurimento ed apoptosi, suggerendo che la qualità funzionale del prodotto cellulare sia un determinante essenziale della risposta clinica. Anche le cellule Tcm, con elevata capacità proliferativa e di generazione di cellule in seguito a stimolazione antigenica, sono biologicamente favorevoli nel contesto CAR-T, dove espansione e persistenza cellulare rappresentano due elementi fondamentali per il mantenimento della risposta clinica. La significativa associazione tra CD8 Tcm assolute e risposta, insieme alla relazione tra percentuale di CD4 Tcm e migliore sopravvivenza globale, rafforza quindi l'ipotesi che un prodotto di partenza più ricco di cellule con fenotipo memoria possa contribuire a una maggiore efficacia terapeutica.

Le cellule T effettrici e di memoria effettrice sono più differenziate e più rapidamente capaci di produrre citochine e mediare funzioni effettrici rispetto alle cellule naïve o central memory. Un prodotto di aferesi relativamente più sbilanciato verso fenotipi effector memory potrebbe quindi favorire una risposta infiammatoria più intensa dopo l'infusione, contribuendo allo sviluppo di CRS di grado più elevato. Tale osservazione è coerente con la fisiopatologia della CRS, che deriva da un'attivazione immunitaria sistemica e da un'elevata produzione di citochine in seguito all'attivazione delle cellule CAR-T e delle cellule immunitarie dell'ospite. Un secondo elemento emerso riguarda il rapporto tra fenotipo linfocitario e tossicità immuno-mediata. La CRS è risultata molto frequente nella coorte, mentre la CRS severa, definita come grado ≥ 2 , ha interessato un numero limitato di pazienti; nonostante questo limite, è evidenziata un'associazione tra CRS più severa e maggiore proporzione di cellule effector memory nei compartimenti CD4 e CD8, insieme a una minore percentuale complessiva di cellule CD3+. Questo dato appare biologicamente plausibile, poiché le cellule effector memory rappresentano un compartimento più differenziato e funzionalmente pronto alla produzione di citochine rispetto alle cellule naïve o central memory. Un prodotto di aferesi

maggiormente sbilanciato verso fenotipi effettori o memoria-effettori potrebbe quindi favorire una risposta immunitaria più rapida e intensa dopo l'infusione, contribuendo allo sviluppo di una sindrome da rilascio di citochine di grado più elevato. La correlazione positiva tra percentuale di Tem CD8 e grado di CRS, così come quella tra percentuale di Tem CD4 e grado di CRS, sostiene questa interpretazione; parallelamente, la correlazione negativa tra CD3% e grado di CRS suggerisce che la tossicità non dipenda semplicemente dalla quantità globale di cellule T, ma anche dalla loro composizione funzionale. Tao et al.⁹¹ mostrano come man mano che le cellule diventano più differenziate, perdono capacità proliferativa e di lunga persistenza, ma acquisiscono funzioni effettrici più immediate, come produzione rapida di citochine, citotossicità e risposta funzionale più pronta. Da un lato, le cellule Tem ed effettrici sono più reattive dal punto di vista funzionale: hanno già acquisito programmi citotossici e infiammatori, rispondono rapidamente allo stimolo antigenico e sono quindi potenzialmente capaci di un'attività antitumorale immediata. Questo può spiegare perché, in alcuni contesti, una quota di cellule Tem o effettrici possa associarsi a una risposta iniziale vigorosa. Tuttavia, proprio perché più differenziate, queste cellule tendono ad avere minore capacità di auto-rinnovamento e minore persistenza a lungo termine rispetto ai subset meno differenziati. In questo contesto, i dati relativi alla CRS possono essere interpretati alla luce della fisiopatologia descritta da Morris et al.⁹², secondo cui le tossicità immuno-mediate delle terapie CAR-T, in particolare CRS e ICANS, derivano da una potente attivazione delle cellule effettrici e da una successiva amplificazione della risposta infiammatoria sistemica, mediata anche da monociti/macrofagi e cellule endoteliali. Tale modello risulta coerente con l'associazione osservata nella presente coorte tra maggiore percentuale di cellule CD4/CD8 Tem e CRS di grado più elevato. Per quanto riguarda ICANS, invece, il numero di eventi è risultato troppo basso per trarre conclusioni attendibili, e nessuna sottopopolazione T ha raggiunto significatività statistica.

Infine, l'analisi dell'espansione *in vivo* delle CAR-T al giorno +7 mostra una tendenza numerica verso valori mediani più elevati nei pazienti responder rispetto ai non-responder, sia nella coorte complessiva sia nel sottogruppo dei pazienti con mieloma multiplo; tuttavia, nessuna di queste differenze ha raggiunto la

significatività statistica. L'assenza di significatività sembra dipendere soprattutto dal numero molto ridotto di non-responder valutabili, pari complessivamente a quattro pazienti, e dalla conseguente bassa potenza statistica dell'analisi. La maggiore presenza di cellule T nei pazienti responder potrebbe riflettere una migliore "fitness immunologica" del paziente al momento dell'aferesi. Pazienti meno immunocompromessi o meno danneggiati da linee terapeutiche precedenti potrebbero disporre di un compartimento T quantitativamente e funzionalmente più favorevole alla produzione di cellule CAR-T efficaci. In questo senso, la conta assoluta di specifiche sottopopolazioni T potrebbe rappresentare un indicatore indiretto della capacità delle cellule di espandersi, persistere e mediare una risposta antitumorale efficace dopo l'infusione. Per questa ragione risulterebbe importante ottenere l'approvazione da parte del comitato etico per analizzare la sacca prima dell'infusione della stessa.

5.3 Prospettive future

Le prospettive future della terapia CAR-T si orientano verso diverse direzioni complementari. Da un lato, l'obiettivo rimane migliorare l'efficacia nelle neoplasie ematologiche, riducendo recidive, perdita dell'antigene bersaglio, esaurimento cellulare e tossicità immuno-mediate; dall'altro, la ricerca sta cercando di estendere questa strategia a contesti ancora poco efficaci, come i tumori solidi, nei quali l'eterogeneità antigenica, il microambiente tumorale immunosoppressivo e la difficoltà di infiltrazione rappresentano ostacoli rilevanti. Zugasti et al.⁹³ evidenziano come le CAR-T abbiano profondamente modificato il trattamento delle neoplasie ematologiche B recidivanti/refrattarie e del mieloma multiplo, ma sottolineano che la loro applicazione rimane più complessa in altri contesti, quali AML e tumori solidi. In tali scenari, l'efficacia è limitata da molteplici fattori, tra cui assenza di antigeni tumorali realmente specifici, eterogeneità antigenica, rischio di tossicità on-target/off-tumor, microambiente immunosoppressivo, ridotta infiltrazione tumorale, esaurimento e scarsa persistenza cellulare. Questi elementi confermano che l'efficacia delle CAR-T non dipende esclusivamente dal riconoscimento antigenico, ma anche dalla qualità del prodotto cellulare, dalla capacità proliferativa, dalla persistenza in vivo e dall'interazione con il

microambiente tumorale. Loney et al.⁹⁴ descrivono le CAR-T allogeneiche “off-the-shelf” (prelevate da donatori sani e conservate in banche cellulari) come una possibile evoluzione delle attuali terapie autologhe. Questo approccio mira a superare alcuni limiti del modello personalizzato, tra cui i lunghi tempi di produzione, l’elevato costo, il rischio di fallimento del manufacturing e la variabilità qualitativa delle cellule T del paziente, spesso compromesse da malattia e trattamenti precedenti. L’impiego di donatori sani potrebbe consentire la generazione di prodotti più standardizzati, immediatamente disponibili e potenzialmente caratterizzati da maggiore fitness cellulare. Tuttavia, le CAR-T allogeneiche pongono specifiche criticità immunologiche, in particolare il rischio di GVHD mediata dal TCR del donatore e il rigetto host-versus-graft da parte del sistema immunitario del ricevente. Per questo motivo, lo sviluppo di prodotti off-the-shelf richiede strategie di editing genetico finalizzate a ridurre l’alloreattività e migliorare la persistenza, pur introducendo nuove problematiche di sicurezza legate agli effetti off-target e alle modificazioni genomiche. In un ambito diverso da quello oncologico, Müller et al.⁹⁵ hanno dimostrato il potenziale delle CAR-T anti-CD19 nel trattamento di malattie autoimmuni severe e refrattarie, tra cui lupus eritematoso sistemico, miopatie infiammatorie idiopatiche e sclerosi sistemica. In questa casistica, la deplezione profonda delle cellule B CD19+ è stata associata a remissione clinica, riduzione degli autoanticorpi e sospensione delle terapie immunosoppressive, suggerendo un possibile “reset” del compartimento immunitario autoreattivo. Sebbene il contesto biologico sia differente rispetto alle neoplasie ematologiche, questi dati confermano che l’efficacia delle CAR-T dipende dalla capacità delle cellule ingegnerizzate di espandersi, esercitare una funzione effettrice adeguata e persistere per un tempo sufficiente a rimodellare il sistema immunitario.

Alla luce di queste prospettive più recenti, appare evidente come la terapia CAR-T rappresenti oggi non solo una strategia terapeutica consolidata in alcune neoplasie ematologiche, ma anche una piattaforma cellulare in continua evoluzione, destinata ad ampliare progressivamente i propri campi di applicazione. La caratterizzazione immunofenotipica del prodotto di partenza, con particolare attenzione al bilanciamento tra subset più pronti funzionalmente, come Tem/effector, e subset

meno differenziati, come naïve, Tcm e Tscm, potenzialmente più favorevoli per persistenza ed efficacia duratura, assume un ruolo sempre più rilevante nella comprensione della risposta clinica e nella futura personalizzazione delle terapie cellulari. L'evoluzione della terapia dovrà comunque procedere insieme ad un attento bilanciamento fra efficacia, sicurezza e sostenibilità clinica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Murphy, K. M. & Weaver, C. *Janeway's Immunobiology*. (GS, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York London, 2017).
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., Sozzani, S. & Annunziato, F. *Immunologia cellulare e molecolare*. (Edra, Milano, 2025).
3. Parham, P. *The Immune System*. (W.W. Norton & Company, New York, NY, 2021).
4. Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P. & Owen, J. *Kuby Immunology*. (Macmillan Education, New York, 2019).
5. Bu, J. Y., Shaw, A. S. & Chan, A. C. Analysis of the interaction of ZAP-70 and syk protein-tyrosine kinases with the T-cell antigen receptor by plasmon resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 5106–5110 (1995).
6. Tourdot, B. E. *et al.* Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif (ITIM)-Mediated Inhibitory Signaling Is Regulated by Sequential Phosphorylation Mediated by Distinct Nonreceptor Tyrosine Kinases: A Case Study Involving PECAM-1. *Biochemistry* **52**, 2597–2608 (2013).
7. Baldwin, K. K., Trenchak, B. P., Altman, J. D. & Davis, M. M. Negative Selection of T Cells Occurs Throughout Thymic Development. *J. Immunol.* **163**, 689–698 (1999).
8. Kondo, K., Ohigashi, I. & Takahama, Y. Thymus machinery for T-cell selection. *Int. Immunol.* **31**, 119–125 (2019).
9. Böhm, T. *Thymic Development and Selection of T Lymphocytes*. (Springer Berlin Heidelberg Imprint: Springer, Berlin, Heidelberg s.l, 2014). doi:10.1007/978-3-642-40252-4.
10. Takaba, H. & Takayanagi, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* **38**, 805–816 (2017).

11. Tao, Z. *et al.* Impact of T cell characteristics on CAR-T cell therapy in hematological malignancies. *Blood Cancer J.* **14**, 213 (2024).
12. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).
13. Wong, W. K., Leem, J. & Deane, C. M. Comparative Analysis of the CDR Loops of Antigen Receptors. *Front. Immunol.* **10**, 2454 (2019).
14. Bettini, M. L. *et al.* Cutting Edge: CD3 ITAM Diversity Is Required for Optimal TCR Signaling and Thymocyte Development. *J. Immunol.* **199**, 1555–1560 (2017).
15. Mak, T. W. & Saunders, M. *The Immune Response: Basic and Clinical Principles*. (Academic, Oxford, 2006).
16. Wang, J. *et al.* Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10799–10804 (2001).
17. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348–2357 (1986).
18. Paiva, I. A., Badolato-Corrêa, J., Familiar-Macedo, D. & de-Oliveira-Pinto, L. M. Th17 Cells in Viral Infections—Friend or Foe? *Cells* **10**, 1159 (2021).
19. Schmitt, N. & Ueno, H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **34**, 130–136 (2015).
20. Wang, R., Natarajan, K. & Margulies, D. H. Structural Basis of the CD8 $\alpha\beta$ /MHC Class I Interaction: Focused Recognition Orients CD8 β to a T Cell Proximal Position. *J. Immunol.* **183**, 2554–2564 (2009).
21. Halle, S., Halle, O. & Förster, R. Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends Immunol.* **38**, 432–443 (2017).

22. Golstein, P. & Griffiths, G. M. An early history of T cell-mediated cytotoxicity. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 527–535 (2018).
23. Guo, L., Liu, X. & Su, X. The role of TEMRA cell-mediated immune senescence in the development and treatment of HIV disease. *Front. Immunol.* **14**, 1284293 (2023).
24. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
25. Wang, Y. *et al.* Stem cell-like memory T cells: The generation and application. *J. Leukoc. Biol.* **110**, 1209–1223 (2021).
26. Dustin, M. L., Chakraborty, A. K. & Shaw, A. S. Understanding the Structure and Function of the Immunological Synapse. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a002311–a002311 (2010).
27. Dieckmann, N. M. G., Frazer, G. L., Asano, Y., Stinchcombe, J. C. & Griffiths, G. M. The cytotoxic T lymphocyte immune synapse at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 2881–2886 (2016).
28. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A. & Bluestone, J. A. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973–988 (2016).
29. Rowshanravan, B., Halliday, N. & Sansom, D. M. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* **131**, 58–67 (2018).
30. Hui, E. *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. *Science* **355**, 1428–1433 (2017).
31. Guillelliams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 571–578 (2014).
32. Bröckelmann, P. J. *et al.* Hodgkin Lymphoma in Adults. *Dtsch. Ärztebl. Int.* <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0535> (2018) doi:10.3238/arztebl.2018.0535.

33. Kim, J., Cho, J., Yoon, S. E., Kim, W. S. & Kim, S. J. Efficacy of Salvage Treatments in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma Including Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Res. Treat.* **55**, 1031–1047 (2023).
34. Yu, Y., Dong, X., Tu, M. & Wang, H. Primary mediastinal large B cell lymphoma. *Thorac. Cancer* **12**, 2831–2837 (2021).
35. Li, W. The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Hematolymphoid Tumors. in *Leukemia* (eds Department of Pathology and Laboratory Medicine, Children’s Mercy Hospital, University of Missouri-Kansas City School of Medicine, Kansas City, USA & Weijie, L.) 1–21 (Exon Publications, 2022).
doi:10.36255/exon-publications-leukemia-who-5th-edition-hematolymphoid-tumors.
36. Landgren, O. *et al.* Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* **113**, 5412–5417 (2009).
37. Weiss, B. M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R. S. & Kuehl, W. M. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* **113**, 5418–5422 (2009).
38. Boccadoro, M. & Mina, R. Le emopatologie.
<https://www.ematologiainprogress.it/mieloma-multiplo/> (2023).
39. Morgan, R. A. *et al.* Cancer Regression and Neurological Toxicity Following Anti-MAGE-A3 TCR Gene Therapy. *J. Immunother.* **36**, 133–151 (2013).
40. Chmielewski, M., Hombach, A. A. & Abken, H. Antigen-Specific T-Cell Activation Independently of the MHC: Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells. *Front. Immunol.* **4**, (2013).

41. Chmielewski, M., Hombach, A. A. & Abken, H. Antigen-Specific T-Cell Activation Independently of the MHC: Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
42. Safarzadeh Kozani, P., Safarzadeh Kozani, P. & Rahbarizadeh, F. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: An Overview of the Changing Face of Cancer Immunotherapy. *Trends Med. Sci.* **2**, (2021).
43. Eisa, A. R., Tavassoli Razavi, F., Hoseinzadeh, A., Haghmorad, D. & Baharlou, R. Nanobody CAR-T cells in cancer: From molecular design to clinical translation. *Biomed. Pharmacother.* **193**, 118819 (2025).
44. Rahbarizadeh, F., Ahmadvand, D. & Moghimi, S. M. CAR T-cell bioengineering: Single variable domain of heavy chain antibody targeted CARs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **141**, 41–46 (2019).
45. Hartmann, J., Schüßler-Lenz, M., Bondanza, A. & Buchholz, C. J. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol. Med.* **9**, 1183–1197 (2017).
46. Honikel, M. M. & Olejniczak, S. H. Co-Stimulatory Receptor Signaling in CAR-T Cells. *Biomolecules* **12**, 1303 (2022).
47. Sergio Barocci. Le cellule CAR-T: una cronistoria. (2024).
48. Kawalekar, O. U. *et al.* Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* **44**, 380–390 (2016).
49. Uscanga-Palomeque, A. C. *et al.* CAR-T Cell Therapy: From the Shop to Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 15688 (2023).
50. Chen, T., Wang, M., Chen, Y. & Liu, Y. Current challenges and therapeutic advances of CAR-T cell therapy for solid tumors. *Cancer Cell Int.* **24**, 133 (2024).

51. Alsaieedi, A. A. & Zaher, K. A. Tracing the development of CAR-T cell design: from concept to next-generation platforms. *Front. Immunol.* **16**, 1615212 (2025).
52. Zugasti, I. *et al.* CAR-T cell therapy for cancer: current challenges and future directions. *Signal Transduct. Target. Ther.* **10**, 210 (2025).
53. Agenzia Italiana del Farmaco. Terapie avanzate.
54. European Medicines Agency. First two CAR-T cell medicines recommended for approval in the European Union. (2018).
55. Grupp, S. A. *et al.* Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1509–1518 (2013).
56. Schuster, S. J. *et al.* Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **380**, 45–56 (2019).
57. Neelapu, S. S. *et al.* Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2531–2544 (2017).
58. Sheth, V. S. & Gauthier, J. Taming the beast: CRS and ICANS after CAR T-cell therapy for ALL. *Bone Marrow Transplant.* **56**, 552–566 (2021).
59. Peters, D. T., Savoldo, B. & Grover, N. S. Building safety into CAR-T therapy. *Hum. Vaccines Immunother.* **19**, 2275457 (2023).
60. Zhang, Y. & Han, W. Management of Cytokine Release Syndrome (CRS) following CAR T-cell therapy: a comprehensive review. *Clin. Cancer Bull.* **4**, 15 (2025).
61. Parker, K. R. *et al.* Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies. *Cell* **183**, 126-142.e17 (2020).
62. Peters, D. T., Savoldo, B. & Grover, N. S. Building safety into CAR-T therapy. *Hum. Vaccines Immunother.* **19**, 2275457 (2023).

63. Sung, A. D. & Chao, N. J. Concise Review: Acute Graft-Versus-Host Disease: Immunobiology, Prevention, and Treatment. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 25–32 (2013).
64. Sotillo, E. *et al.* Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of *CD19* Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov.* **5**, 1282–1295 (2015).
65. Mohanty, R. *et al.* CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). *Oncol. Rep.* <https://doi.org/10.3892/or.2019.7335> (2019) doi:10.3892/or.2019.7335.
66. Simon, S., Bugos, G., Salter, A. I. & Riddell, S. R. Synthetic receptors for logic gated T cell recognition and function. *Curr. Opin. Immunol.* **74**, 9–17 (2022).
67. Asmamaw Dejenie, T. *et al.* Current updates on generations, approvals, and clinical trials of CAR T-cell therapy. *Hum. Vaccines Immunother.* **18**, 2114254 (2022).
68. Scheller, L. *et al.* Drug-controlled CAR T cells through the regulation of cell–cell interactions. *Nat. Chem. Biol.* <https://doi.org/10.1038/s41589-026-02152-x> (2026) doi:10.1038/s41589-026-02152-x.
69. *Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapies for Cancer: A Practical Guide.* (Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2020).
70. Melenhorst, J. J. *et al.* Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells. *Nature* **602**, 503–509 (2022).
71. Zurko, J. C. *et al.* Bispecific targeting of CD20 and CD19 increases polyfunctionality of chimeric antigen receptor T-cell products in B-cell malignancies. *Cytotherapy* **24**, 767–773 (2022).
72. Colina, A. S. *et al.* Current advances in experimental and computational approaches to enhance CAR T cell manufacturing protocols and improve clinical efficacy. *Front. Mol. Med.* **4**, 1310002 (2024).

73. Neri, R., Patrone, M. & Mele, L. La terapia CAR-T: il ruolo del laboratorio di processazione cellule staminali emopoietiche. (UPO, 2021).
74. Onda, M., Kobayashi, K. & Pastan, I. Depletion of regulatory T cells in tumors with an anti-CD25 immunotoxin induces CD8 T cell-mediated systemic antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 4575–4582 (2019).
75. Kim-Hoehamer, Y.-I. *et al.* Development of a cGMP-compliant process to manufacture donor-derived, CD45RA-depleted memory CD19-CAR T cells. *Gene Ther.* **30**, 222–231 (2023).
76. Noaks, E., Peticone, C., Kotsopoulou, E. & Bracewell, D. G. Enriching leukapheresis improves T cell activation and transduction efficiency during CAR T processing. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **20**, 675–687 (2021).
77. Shao, L. *et al.* Genome-wide profiling of retroviral DNA integration and its effect on clinical pre-infusion CAR T-cell products. *J. Transl. Med.* **20**, 514 (2022).
78. Lei, T. *et al.* Leveraging CRISPR gene editing technology to optimize the efficacy, safety and accessibility of CAR T-cell therapy. *Leukemia* **38**, 2517–2543 (2024).
79. Nitta, N. Flow Cytometry - A Basic Introduction. (2018).
<https://flowbook.denovosoftware.com/>
80. Audrito, V. Citofluorimetria e saggi metabolici. (2025).
81. Citometria a flusso. <http://biologa.altervista.org/laboratorio-analisi/citometria-a-flusso/>
82. De Novo Softwares. Plot Types and Custom Formatting. (2024).
<https://denovosoftware.com/full-access/features/2d-plots/>
83. Maccarrone, M. Metodologie biochimiche e biomolecolari. (2025).
84. AAT Bioquest. PE and APC. (2025). <https://www.aatbio.com/catalog/pe-and-apc>
85. Beckman Coulter. DURAClone IM Count. (2026).

86. Brudno, J. N., Maus, M. V. & Hinrichs, C. S. CAR T Cells and T-Cell Therapies for Cancer: A Translational Science Review. *JAMA* **332**, 1924 (2024).
87. Cappell, K. M. & Kochenderfer, J. N. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **20**, 359–371 (2023).
88. Chennupati, M. *et al.* MM-604: Efficacy and Safety of CAR T-Cell Therapy in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: A Systematic Review of Clinical Trials. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **25**, S929–S930 (2025).
89. Wang, Y. *et al.* Characteristics of premanufacture CD8⁺ T cells determine CAR-T efficacy in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**, 409 (2023).
90. Fraietta, J. A. *et al.* Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* **24**, 563–571 (2018).
91. Tao, Z. *et al.* Impact of T cell characteristics on CAR-T cell therapy in hematological malignancies. *Blood Cancer J.* **14**, 213 (2024).
92. Morris, E. C., Neelapu, S. S., Giavridis, T. & Sadelain, M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 85–96 (2022).
93. Zugasti, I. *et al.* CAR-T cell therapy for cancer: current challenges and future directions. *Signal Transduct. Target. Ther.* **10**, 210 (2025).
94. Loney, C. & Breman, E. Allogeneic CAR-T Therapy Technologies: Has the Promise Been Met? *Cells* **13**, 146 (2024).
95. Müller, F. *et al.* CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease — A Case Series with Follow-up. *N. Engl. J. Med.* **390**, 687–700 (2024).