

ASPETTANDO LE CAR-NK: TERAPIE ANTITUMORALI ANCORA PIÙ PROMETTENTI

Ingegnerizzare le cellule natural killer al posto dei linfociti T potrebbe rivelarsi una strategia più sicura, veloce da produrre ed economica. Potrebbe funzionare anche in situazioni in cui le Car-T vacillano e soprattutto essere accessibili a un bacino più ampio di pazienti. Gli studi sono già in corso e il primo trattamento potrebbe arrivare in clinica già nel 2020

► **Cristina Tognaccini**
AboutPharma and Medical Devices
ctognaccini@aboutpharma.com

Ci stavamo appena abituando a sentire parlare di terapie cellulari Car-T (terapia con recettore antigenico chimerico delle cellule T) – in Italia l’approvazione è attesa per il 2019 – che ecco arrivare un’ipotetica nuova classe di farmaci, che potrebbe riservare ancora più vantaggi. Sono le Car-Nk, “cugine” delle più note Car-T, che iniziano ora a conquistare i primi trial clinici, per lo più in Cina e negli Stati Uniti. E se i benefici che sembrano apportare non sono di poco conto – meno effetti collaterali e meno costi – restano ancora interrogativi aperti a cui solo nuovi e più ampi studi possono dare una risposta. E se la scienza domanda, la comunità scientifica non si tira indietro e dappertutto è un nascere di ricerche per perfezionare le nuove tecnologie.

UN GRADO DI PARENTELA

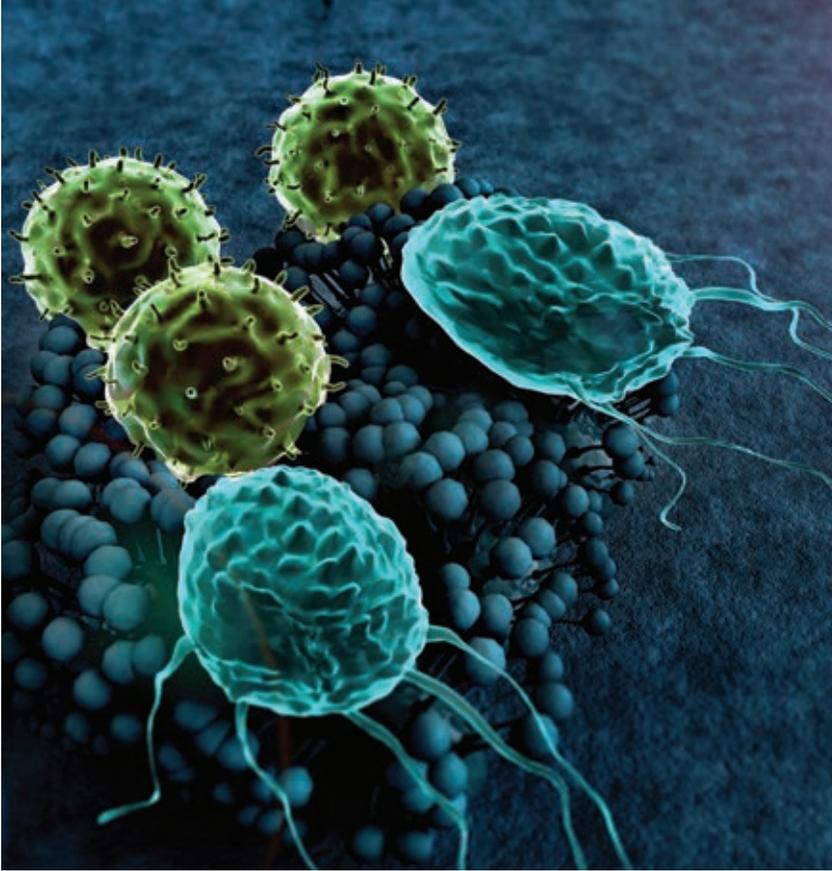
Parenti sì, ma con “genitori” diversi. Se le Car-T derivano infatti dall’ingegnerizzazione dei linfociti T, le Car-Nk sfruttano la stessa strategia ma partendo da un diverso tipo di cellula immunitaria: le cellule natu-

ral killer (Nk). Entrambe fanno parte della famiglia dei linfociti (in cui rientrano anche i linfociti B) e hanno un ruolo importante nell’immunità cellulo-mediata, ma hanno caratteristiche e ruoli differenti. In particolare i linfociti T sono i principali responsabili dell’immunità adattativa cellulo-mediata, cioè la risposta immunitaria che si scatena nel momento in cui si entra in contatto con un agente patogeno estraneo e si contrae un’infezione. I linfociti Nk invece sono le cellule meno specializzate, ma con un’elevata attività antitumorale e antivirale intrinseca che permette loro di distruggere qualsiasi cellula riconosciuta come estranea. “Hanno una specificità verso componenti estranee e sono molto attive quando bisogna combattere le reinfezioni” spiega Giuliana Vallanti Direttore sviluppo, controllo e qualità e persona qualificata di Molmed, azienda biotecnologica impegnata nello sviluppo di terapie geniche e cellulari. “Da alcuni trial clinici si è visto che di per sé hanno già un rilevante effetto antitumorale. Per questo si è pensato di potenziarne l’effetto facendo in modo che in su-

perficie esprimessero i recettori cosiddetti “chimerici” (i Car appunto ndr). Un’altra differenza tra i due tipi di linfociti è che le cellule Nk non hanno il riconoscimento del self – tipico dei linfociti T, dovuto alla presenza del recettore dei linfociti T (Tcr da T cell receptor) – che ci permette di usarle anche su più pazienti e non solo sul donatore”. Aprendo così la strada alla produzione in serie, meno costosa.

CONOSCERE GLI ANTENATI

Per capire le Car-Nk bisogna però fare un passo indietro e conoscere pregi e difetti dei loro predecessori. Le Car-T sono trattamenti cellulari già approvati dalla Fda e dall’Ema (tisagenlecleucel sviluppata da Novartis e axicabtagene ciloleucel da Gilead), indicati per il trattamento di alcuni tumori liquidi (leucemia linfoblastica a cellule B nei pazienti pediatrici e fino ai 25 anni di età, linfoma diffuso a grandi cellule B e linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B due forme aggressive del linfoma non Hodgkin). Sono prodotti autologhi, che derivano cioè dalle cellule del sistema immunitario (i linfociti T appunto)



del paziente stesso, che dopo essere state ingegnerizzate in laboratorio ed espanse, vengono reinfuse in esso. In particolare le cellule T del paziente raccolte mediante leucoferesi, sono inviate a un'officina specializzata che le modifica geneticamente inserendo nel codice genetico dei linfociti T un gene che codifica per il recettore chimerico (Car) – passaggio svolto tramite vettore virale generalmente – in modo che lo esprimano sulla loro superficie esterna. Il Car è formato da due parti: una esterna che è in grado di riconoscere uno specifico antigene presente sulle cellule tumorali, a cui si lega; e una interna che attiva l'arsenale citotossico della cellula T inducendo la morte della cellula tumorale quando vi entra in contatto.

QUESTIONE DI ANTIGENI

Le Car-T oggi approvate sfruttano l'antigene tumorale CD19, tipico dei tumori liquidi, ma sono in studio anche altri antigeni che potrebbero permettere di indirizzare le terapie Car-T anche contro i tumori solidi. Proprio nel mese di marzo, Molmed ha ricevuto il via libera da Aifa

per una sperimentazione di fase I/II (che rientra nel progetto europeo Eureka-Horizon 2020, di cui la biotech italiana è coordinatore e sponsor) per valutare sicurezza ed efficacia della terapia Car-T con l'antigene tumorale Cd44v6 per il trattamento di pazienti con leucemia mieloide acuta e mieloma multiplo. Il Cd44v6 è però un target espresso sia dai tumori ematologici sia solidi, che potrebbe essere sfruttato anche per nuove terapie contro questi ultimi. “La vera sfida in questo campo – prosegue Vallanti – è identificare i ligandi che devono essere presenti sulla superficie del tumore, ma assenti sulle altre cellule del nostro corpo. Perciò stiamo cercando di identificare target specifici per tumori differenti che non siano a oggi noti”.

NON TUTTO È PERFETTO

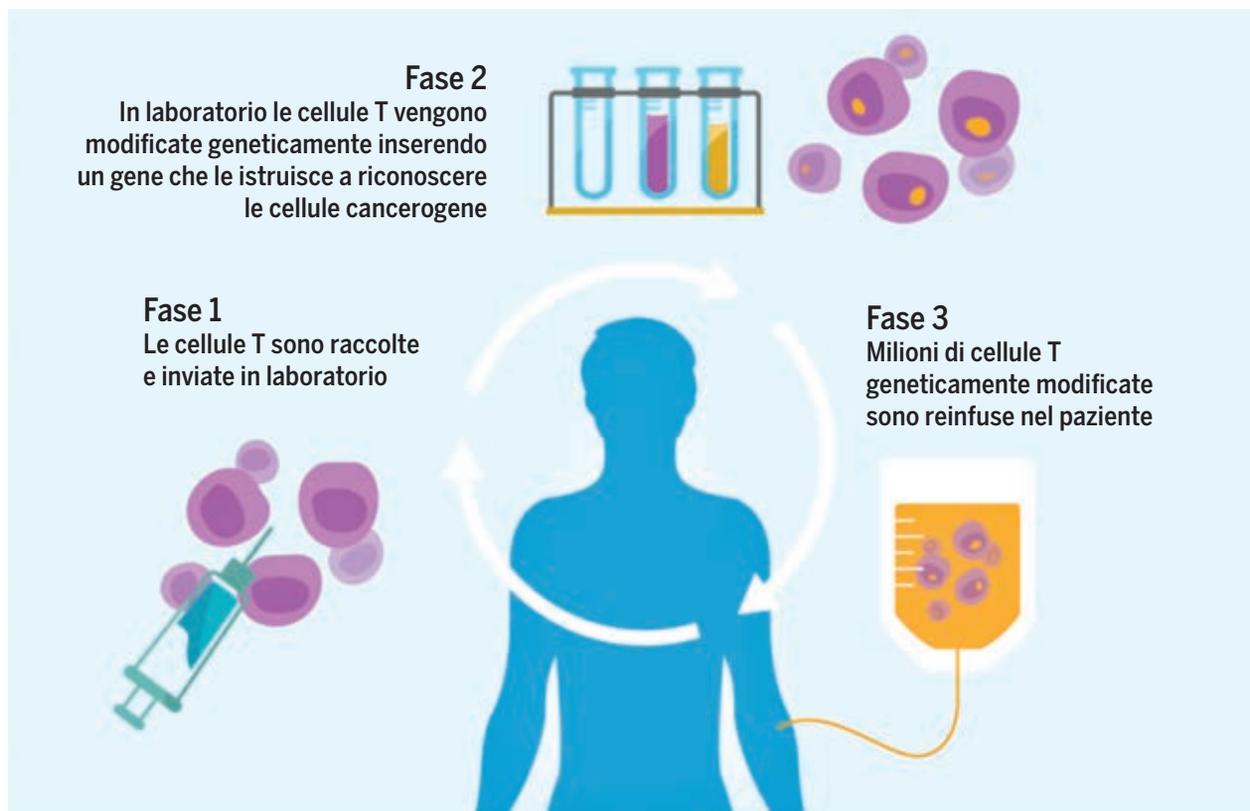
I ben noti problemi delle attuali Car-T sono i costi eccessivi – dovuti in particolare al complicato sistema di produzione e alla personalizzazione della terapia – e gli effetti collaterali. Nonostante la comprovata sicurezza delle Car-T queste in alcuni casi possono portare a una sindrome da

rilascio di citochine. La sintomatologia può essere da lieve, con malessere e febbre a estremamente rilevante. “È l'effetto collaterale maggiore che possono dare le Car-T – aggiunge Vallanti – dovuta ai linfociti T che quando riconoscono il proprio antigene sul tumore possono scatenare una risposta di citochine infiammatoria molto forte, che se non ben controllata può diventare un effetto collaterale importante”. Oggi esistono numerose terapie per gestire questa complicanza, dalla terapia steroidea sino ad approcci più specifici quali la somministrazione dell'anticorpo monoclonale tocilizumab. È stata anche messa a punto una strategia, detta del “gene suicida”, che permette di usare la terapia cellulare in sicurezza. Il gene suicida inserito all'interno delle Car-T, in caso di bisogno viene attivato con una molecola neutra, un antivirale bloccando così l'azione dei linfociti ingegnerizzati. Un'altra alternativa potrebbe essere utilizzare le Car-Nk, che di per sé non causano la sindrome da rilascio di citochine.

DA AUTOLOGO A ETEROLOGO

Le Car-Nk Inoltre non danno origine a un altro grave effetto collaterale: il graft versus host disease (malattia del trapianto contro l'ospite), che si potrebbe verificare quando le cellule T sono utilizzate su un ricevente diverso dal donatore. Il motivo è che i linfociti T riconoscono il self e infusi in un altro individuo identificherebbero i tessuti sani come estranei. È il motivo per cui le Car-T possono essere usate solo in un contesto autologo personalizzato. Le Car-Nk invece, essendo meno specifiche e non riconoscendo il self potrebbero anche essere usate come terapia per più pazienti. “Si stanno studiando diverse strategie per eliminare questo fenomeno – continua Vallanti – alcune aziende stanno provando a modificare i linfociti T in modo da essere usati un contesto ete-

Come nasce una Car-T



Fonte: Ail, associazione italiana contro le leucemie-linfomi e mieloma

rologo. L'idea in pratica è di eliminare il Tcr (recettore dei linfociti T) espresso nella superficie dei linfociti che riconosce il self. Ci sono aziende che lo hanno già fatto e stanno provando a usare il prodotto in maniera "off-the-shelf", con diversi vantaggi. Sono in corso alcuni trial clinici e i risultati per ora sono promettenti. Un'altra possibilità è usare le Car-Nk".

L'OFF-THE-SHELF

Con off-the-shelf, si intende un prodotto "in serie", perché da un singolo lotto derivante da un donatore sano è possibile trattare un ampio numero di pazienti affetti da tumore, con diversi vantaggi. Il primo è la disponibilità immediata della terapia cellulare. In questo caso infatti è già disponibile in azienda e può essere somministrata al paziente al momento opportuno, senza

dover aspettare i tempi tecnici necessari per prepararla. Tempi spesso anche lunghi, sia perché la procedura è complessa (le officine produttive abilitate sono poche e la richiesta è alta). Sia perché per poter effettuare la leucoaferesi i pazienti devono avere certe condizioni di salute e in alcuni casi è anche difficile prelevare i linfociti T, soprattutto se ci sono stati precedenti cicli di chemioterapia. Concetta Quintarelli, responsabile dell'Unità di terapia genica e cellulare dei tumori pediatrici dell'ospedale Bambino Gesù, spiega che in media il paziente deve attendere un mese dal momento in cui il prodotto arriva in officina e quello in cui viene spedito al centro clinico. "Quello che vediamo ogni giorno – continua – è che è difficile soddisfare il fabbisogno delle richieste: più queste terapie dimostrano la loro efficacia più sono i

pazienti che potrebbero essere trattati. Per questo abbiamo pensato a un approccio differente in cui usiamo non le cellule T ma le Nk. Prima di tutto perché sono più potenti. Inoltre evitiamo di effettuare la leucoaferesi in quei pazienti più delicati che hanno il sistema immunitario compromesso e in cui potrebbe essere complicato eseguirlo. In questo modo inoltre il trattamento è subito disponibile e in caso servissero dosi multiple del farmaco si hanno a disposizione sacche non limitate". L'altro vantaggio è quello produttivo: con l'off-the-shelf si abbasserebbero i tempi e i costi di produzione delle Car personalizzate e con un singolo lotto si potrebbe arrivare a trattare anche dieci pazienti come spiega Vallanti. "La dose dipende dalla patologia, se si tratta di un tumore solido o liquido, dall'indicazione terapeutica, dal peso ed età del

paziente. Però a grandi linee possiamo dire che il rapporto passerebbe da 1:1 ad almeno 1:10”.

PERSISTENZA

Viene spontaneo chiedersi perché le cellule Nk non siano state la prima scelta. Quintarelli risponde che sono più complicate da espandere e trasdurre e il processo di produzione nell'ambito dell'officina farmaceutica non era ancora perfetto. E poi un piccolo svantaggio anche le Car-Nk lo hanno: a differenza delle cugine Car-T possiedono infatti una minor persistenza per cui potrebbero essere necessarie più infusioni. O meglio, come precisa Quintarelli, ancora non è stato dimostrato se le cellule Nk hanno memoria immunologica mentre i linfociti T per la loro stessa natura sì. “Però è un vantaggio limitato – sottolinea la ricercatrice del Bambino Gesù – perché avendo a disposizione più dosi la terapia può essere somministrata più volte. Inoltre anche le Car-T hanno una persistenza in vivo limitata e non riescono a controllare il tumore nel tempo”. Anche Vallanti conferma che al momento l'attenzione è focalizzata sulla persistenza delle Car-Nk. “Sono in corso trial clinici che stanno verificando se basta una sola infusione o più – afferma – se la dose deve essere maggiore rispetto le Car-T, quanto tempo dura l'effetto e così via. Sono domande a cui gli studi clinici di fase I/II stanno provando a dare una risposta”.

GLI STUDI

E in effetti gli studi sulle Car-Nk non mancano. I primi test – conclusi positivamente – sono iniziati nel 2016 in Cina, per verificarne la sicurezza. A questi ne sono seguiti altri lo scorso giugno negli Stati Uniti, dove l'University of California San Diego School of Medicine e l'University of Minnesota hanno valutato l'effetto della Car-Nk e della Car-T nel trattamento del tumore all'ovaio, con buoni risultati per entrambe, ma meno effetti collaterali

per le prime. Infine in Europa, sempre dal 2018, si sta tentando di curare il glioblastoma con le Car-Nk, in seguito ai risultati incoraggianti ottenuti nelle sperimentazioni condotte su modelli animali. La stessa Quintarelli è autrice di un lavoro presentato all'ultimo congresso dell'American society of hematology (Ash) di San Diego, i cui dati dimostravano come le Car-Nk CD19, fossero ugualmente efficaci, ma meno tossiche delle Car-T, in un modello di leucemia in vitro e vivo. Per ora il team di ricerca del Bambino Gesù ha messo a punto un metodo per espandere le cellule Nk derivate dal sangue periferico e modificarle in modo da esprimere un Car specifico per l'antigene CD19. L'obiettivo però è perfezionarle in un modello di tumore solido. La ricercatrice racconta che al momento stanno effettuando studi preclinici di sicurezza per poi partire con uno studio clinico direttamente sul tumore solido. E afferma che la prima Car-Nk potrebbe arrivare in clinica già nel 2020.

FONTI ALTERNATIVE

Oltre che dal sangue periferico – dove si trovano cellule adulte – le natural killer possono essere ottenute da cellule staminali pluripotenti umane, sia staminali embrionali sia staminali pluripotenti indotte. Molmed per esempio, a differenza del Bambino Gesù, utilizza cellule Nk derivate da cellule ematopoietiche staminali, presenti nel cordone ombelicale. Approccio non scelto da Quintarelli e colleghi perché queste cellule avrebbero un livello di maturità più basso rispetto a quelle del sangue periferico e la quantità di cellule ingegnerizzate che si ottiene è più bassa. L'idea (e la speranza) del team del Bambino Gesù è che in tal modo si riesca a trattare un numero maggiore di pazienti.

Vallanti invece chiarisce che l'approccio utilizzato da Molmed è stato messo a punto da Glycostem, azienda olandese partner di questo progetto, e consiste nel raccogliere il sangue dal cordone

ombelicale, da cui, tramite un processo di purificazione, si ottengono cellule ematopoietiche staminali, chiamate CD34+. “Le cellule CD34+ – precisa – vengono geneticamente modificate con molecole Car specifiche per l'antigene tumorale, poi mantenute in contatto con terreni di cultura e citochine che favoriscono il differenziamento e l'espansione in cellule natural killer. Alla fine di questo processo che dura circa un mese, otteniamo, partendo da pochissime cellule staminali molto primitive, una larga popolazione di cellule Nk Car positiva”.

OBBIETTIVO 2020

Al momento la biotech italiana sta conducendo studi di fase preclinica per perfezionare il processo produttivo Gmp delle Car-Nk. “Ma ci sono tanti altri studi clinici molto incoraggianti fatti da colleghi americani ed europei che sembrano affermare che le Car-Nk sono sicure” conclude Vallanti, che come la collega sostiene che la prima Car-Nk sviluppata da Molmed dovrebbe arrivare in clinica nel 2020. “Vorremmo partire dai tumori liquidi (leucemia mieloide acuta o mieloma multiplo), che sono più facili da raggiungere rispetto quelli solidi per via del micro ambiente tumorale che talvolta ostacola l'arrivo di queste cellule all'interno del tumore. Ma l'obiettivo è lavorare sui tumori solidi entro il prossimo decennio, con la stessa strategia che abbiamo applicato con le Car-T”. D'altra parte i Car, una volta ideati e sviluppati per le Car-T possono anche essere adattati per le cugine Nk, aprendo a interessanti prospettive future. ▀

Parole chiave

Tumori, Car-T, Car-Nk, immunoterapia

Aziende/Istituzioni

Molmed, Ospedale Bambino Gesù di Roma, Food and drug administration Fda, European medicines agency, Ema, Agenzia italiana del farmaco Aifa, Novartis, Gilead, University of California San Diego School of Medicine, University of Minnesota, American society of hematology (Ash), Glycostem