UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

Monitoraggio immunologico dopo terapia CAR-T

Immunological monitoring following CAR-T cell therapy

Relatrice: **Chiar.ma**

Prof.ssa Antonella Poloni

Tesi di Laurea di:

Maddalena Talacchia

Correlatrice:

Dott.ssa Elena Marinelli Busilacchi

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE 1
1.1 I linfociti T 1
1.2 L'immunoterapia oncologica e l'avvento delle cellule CAR-T 6
1.3 Il monitoraggio immunologico post-infusione 14
1.4 Complicanze e tossicità associate 17
2. SCOPO DELLA TESI 20
3. MATERIALI E METODI 21
3.1 Pazienti arruolati 21
3.2 Processamento e marcatura dei campioni 23
3.3 Acquisizione al citofluorimetro 27
3.4 Analisi statistica 33
4. RISULTATI 34
4.1 Espansione cellule CAR-T 34
4.2 Immunoricostituzione 40
DISCUSSIONE E CONCLUSIONE 42
BIBLIOGRAFIA 46

1. INTRODUZIONE
1.1 I linfociti T

I linfociti sono cellule specializzate del sistema immunitario che svolgono un ruolo fondamentale nella difesa dell'organismo contro virus, batteri e altre sostanze estranee. Fanno parte del gruppo dei globuli bianchi e sono responsabili del riconoscimento e dell'eliminazione degli agenti potenzialmente dannosi. Esistono diverse tipologie di linfociti, ciascuna con funzioni specifiche, che collaborano tra loro per garantire una risposta immunitaria efficace dell'organismo.

In base alle loro caratteristiche funzionali e al ruolo svolto nella risposta immunitaria, i linfociti vengono suddivisi in tre gruppi principali: linfociti B, linfociti T e cellule *Natural Killer* (NK).

Tutti i linfociti derivano da cellule staminali ematopoietiche presenti nel midollo osseo, ma seguono percorsi di maturazione differenti: i linfociti B completano il loro sviluppo all'interno del midollo osseo, dove acquisiscono la capacità di riconoscere specifici antigeni. Sono i principali responsabili dell'immunità umorale e, dopo l'attivazione, proliferano e si differenziano in plasmacellule, che secernono anticorpi, e cellule B della memoria, che garantiscono una risposta più rapida ed efficace in occasione di successivi incontri con lo stesso antigene.

I linfociti T, dal midollo osseo migrano verso il timo, dove subiscono un complesso processo di maturazione e selezione che permette di eliminare le cellule potenzialmente auto-reattive e di conservare quelle in grado di riconoscere gli antigeni estranei.

Le cellule NK, infine, si sviluppano e maturano nel midollo osseo, per distribuirsi nel sangue periferico e in numerosi tessuti, tra cui la milza, il fegato, i polmoni ed i linfonodi, dove svolgono la funzione di sorveglianza immunitaria.

Tra queste popolazioni, i linfociti T rivestono un'importanza fondamentale nell'immunità cellulo-mediata, cioè quel meccanismo di difesa che permette all'organismo di individuare e distruggere cellule infettate o anomale.

Si trovano in circolo nel sangue periferico, negli organi linfoidi secondari, come la milza, i linfonodi e il tessuto linfoide associato alle mucose: quando incontrano un antigene specifico, si attivano e partecipano alla risposta immunitaria, contribuendo alla protezione dell'organismo e al mantenimento dell'omeostasi.

L'azione immunitaria dei linfociti T si basa sulla presenza del *T cell receptor* (TCR), che è una molecola di membrana altamente specifica peculiare per ogni linfocita: ogni TCR è in grado di riconoscere uno specifico antigene complessato ad una molecola presentante l'antigene, attivandosi e dando inizio alla risposta immunitaria, che comporta un intenso processo di espansione clonale, durante la quale il linfocita genererà migliaia di copie identiche, tutte dotate dello stesso recettore e quindi in grado di riconoscere il medesimo antigene.

Il recettore TCR è formato da due catene polipeptidiche, α e β, ognuna delle quali presenta dei domini immunoglobulinici e suddivisa in una regione costante e una regione variabile: la prima è legata al linfocita, mentre la seconda è responsabile del riconoscimento antigenico e conferisce al recettore alla sua elevata specificità.

A differenza degli anticorpi prodotti dai linfociti B, il TCR non è in grado di riconoscere gli antigeni nella loro forma nativa e solubile, ma devono essere fagocitati, elaborati e presentati dalle cellule presentanti l'antigene (APC, *Antigen Presenting Cells*), di cui fanno parte le cellule dendritiche, i macrofagi e i linfociti B. Queste cellule sorvegliano continuamente i tessuti alla ricerca di microrganismi e molecole estranee: una volta individuati, li catturano tramite fagocitosi o endocitosi e li degradano al loro interno. I

peptidi derivati da questa degradazione vengono poi esposti sulla superficie cellulare legati alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC, *Major Histocompatibility Complex*). Solo quando il TCR riconosce il complesso formato da antigene e molecola MHC si verifica l'attivazione del linfocita T e l'avvio della risposta immunitaria adattativa.

Esistono due principali classi di molecole MHC: le MHC di classe I, presenti in tutte le cellule nucleate dell'organismo che presentano ai linfociti T peptidi derivanti da proteine sintetizzate all'interno della cellula stessa, comprese quelle di origine virale o tumorale, e le MHC di classe II, che invece si trovano prevalentemente sulle APC ed hanno il compito di presentare ai T i peptidi derivati da antigeni catturati dall'ambiente extracellulare.[1]

I linfociti possono essere classificati in diverse sottopopolazioni, grazie all'espressione di specifici marcatori presenti sulla loro superficie, denominati cluster di differenziazione (*CD, Cluster of Differentiation).*

Tutti i linfociti T presentano il CD3, che rappresenta un importante marcatore utilizzato per quantificare il numero totale dei linfociti T presenti in un campione biologico: i linfociti T *helper* esprimono anche il CD4 e riconoscono gli antigeni presentati dalle molecole MHC di classe II, mentre i linfociti T citotossici esprimono anche il CD8 e riconoscono gli antigeni presentati dalle molecole MHC di classe I. Infine i linfociti NKT (*Natural Killer T*), oltre al CD3 esprimono il marker il CD56 e svolgono un ruolo di raccordo tra immunità innata e adattativa, contribuendo alla difesa contro infezioni e tumori e alla regolazione delle risposte immunitarie attraverso la rapida produzione di citochine. [2]

I linfociti T *helper*, dopo aver riconosciuto l'antigene presentato dalle APC tramite molecole MHC di classe II, iniziano a secernere specifiche citochine. Queste molecole

fungono da messaggeri chimici e modulano l'attività di numerose cellule del sistema immunitario, tra cui linfociti B, linfociti T citotossici, macrofagi e cellule dell'immunità innata. In base al profilo di citochine prodotto, i linfociti T *helper* possono differenziarsi in diverse sottopopolazioni funzionalmente specializzate.

- I linfociti T *helper* 1 (T_H1) producono principalmente interferone γ (IFN-γ) che promuove l'attivazione dei macrofagi e stimola la risposta immunitaria contro patogeni intracellulari.
- I linfociti T *helper* 2 (T_H2) in grado di stimolare la risposta umorale da parte dei linfociti B, che produrranno anticorpi coinvolti soprattutto nella difesa contro parassiti e nelle reazioni allergiche.
- I linfociti T *helper* 17 (T_H17), secernono citochine pro-infiammatorie e partecipano alla difesa contro batteri e funghi.
- I linfociti T *helper* follicolari (T_{FH}), supportano la maturazione dei linfociti B nei centri germinativi degli organi linfoidi secondari.

Non fanno parte dei linfociti T *helper*, ma non per questo non sono di estrema importanza, i linfociti T regolatori (Treg), che contribuiscono alla tolleranza immunologica, modulando e sopprimendo le risposte immunitarie eccessive e prevenendo lo sviluppo dell'autoimmunità.

Infine, i linfociti T citotossici (CD8+) che sono fondamentali per la distruzione delle cellule infettate da virus o delle cellule tumorali. Una volta riconosciuto l'antigene legato alle molecole MHC di classe I, si legano alla cellula infetta e rilasciano dei granuli citotossici contenenti perforine e granzimi, che ne inducono l'apoptosi. Oltre alla loro attività citotossica diretta, i linfociti T CD8+ producono citochine che contribuiscono al controllo dell'infezione e al potenziamento della risposta immunitaria.

Un'ulteriore classificazione dei linfociti T distingue le cellule *naïve* dalle cellule *memory*, sulla base dell'espressione di specifici marcatori di superficie: le prime esprimono il CD45RA, mentre le seconde il CD45RO.

I linfociti T *naïve* sono cellule che non hanno ancora incontrato il loro antigene specifico: essi si trovano in circolo nel sangue e negli organi linfoidi secondari, dove sono in uno stato inattivato. Solamente dopo il riconoscimento dell'antigene e la conseguente attivazione da parte delle APC inizieranno a proliferare ed a differenziarsi in cellule effettrici e cellule della memoria.

I linfociti T *memory* derivano da linfociti T che hanno già incontrato e riconosciuto il proprio antigene. Grazie a questa precedente esposizione, sono in grado di rispondere in modo più rapido ed efficace in occasione di successivi contatti con lo stesso patogeno, rappresentando uno dei principali meccanismi alla base della memoria immunologica. [3]

1.2 L’immunoterapia oncologica e l’avvento delle cellule CAR-T

In condizioni fisiologiche, le cellule del sistema immunitario riconoscono ed eliminano elementi considerati *non-self* o cellule infettate da virus.

Tuttavia, le cellule neoplastiche sono in grado di ingannare la risposta immunitaria, riuscendo a sfuggire alla sorveglianza del sistema immunitario, proliferando indisturbate. L’immunoterapia ha lo scopo di contrastare i meccanismi di evasione della risposta immunitaria da parte delle cellule tumorali: a differenza delle terapie tradizionali, infatti, i farmaci immunoterapici non agiscono direttamente sulle cellule maligne, ma stimolano e modulano le difese immunitarie in modo che siano in grado di riconoscerle ed eliminarle efficacemente.

Negli ultimi anni, i progressi dell’ingegneria genetica hanno portato alla produzione di linfociti T ingegnerizzati per l’espressione di recettori in grado di colpire selettivamente gli antigeni presenti sulle cellule tumorali. Tra queste innovative strategie terapeutiche, la terapia con cellule CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy*) rappresenta una delle più importanti conquiste dell’immunoterapia moderna.

I primi recettori CAR vennero sviluppati alla fine degli anni '80, ma soltanto negli ultimi due decenni i progressi dell'ingegneria genetica e della produzione cellulare hanno consentito l'applicazione clinica di questa strategia terapeutica. I risultati ottenuti nei pazienti affetti da neoplasie ematologiche recidivate o refrattarie hanno portato all'approvazione delle prime terapie CAR-T da parte delle principali agenzie regolatorie internazionali, aprendo una nuova era nel trattamento dei tumori ematologici.

Le cellule CAR-T sono linfociti T prelevati dal paziente, ingegnerizzati per esprimere sulla superficie il recettore chimerico CAR (C*himeric Antigen Receptor)*. Questo

recettore viene introdotto nelle cellule mediante un vettore virale, ed è progettato per riconoscere uno specifico antigene espresso dalle cellule neoplastiche.

Il recettore CAR di prima generazione è composto da una proteina transmembrana composta da differenti domini funzionali: la porzione extracellulare comprende un frammento variabile derivato dall'anticorpo monoclonale responsabile del riconoscimento specifico dell'antigene bersaglio, mentre la porzione intracellulare è costituita dalla catena ζ del CD3, che serve alla trasduzione del segnale e all'attivazione cellulare successiva al legame con l'antigene. [4]

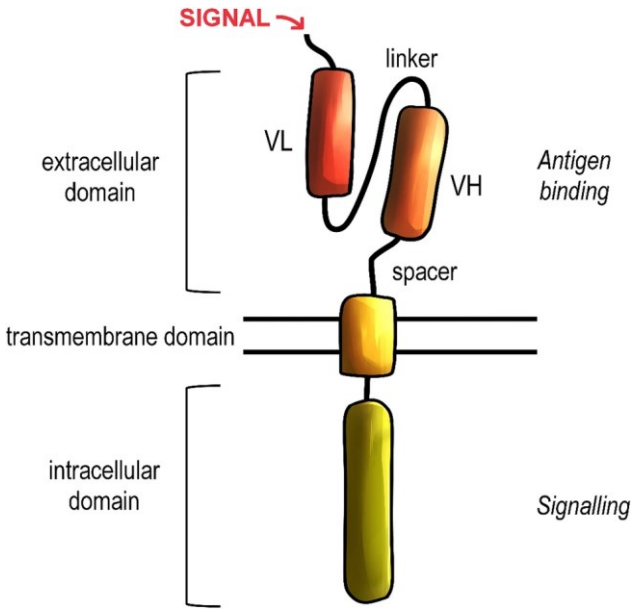


Figura 1. Struttura generale del recettore chimerico dell'antigene (CAR). I CAR sono costituiti da un dominio extracellulare, un dominio transmembrana e uno o più domini intracellulari. Il dominio extracellulare è responsabile del legame con l'antigene e comprende il frammento variabile a singola catena (*single-chain variable fragment*, scFv), derivato dai domini variabili dell'anticorpo, precisamente dalla regione variabile della catena pesante (VH) e da quella della catena leggera (VL). I due domini sono collegati tra loro mediante un *linker* e ancorati al dominio transmembrana attraverso uno *spacer*. [5]

La continua evoluzione della ricerca ha portato allo sviluppo di generazioni successive di CAR-T, fino ad arrivare alle cellule di quinta generazione che sono ancora in fase di sperimentazione. Queste ultime presentano una struttura complessa, arricchita da una porzione troncata della catena β del recettore dell'interleuchina 2 (IL-2Rβ) inserito tra il dominio CD3ζ e la regione co-stimolatoria CD28. Inoltre, queste cellule possiedono anche un sito di attivazione per i fattori di trascrizione STAT3 e STAT5, collocato all'estremità del dominio CD3ζ, con l'obiettivo di amplificare la risposta immunitaria. [6]

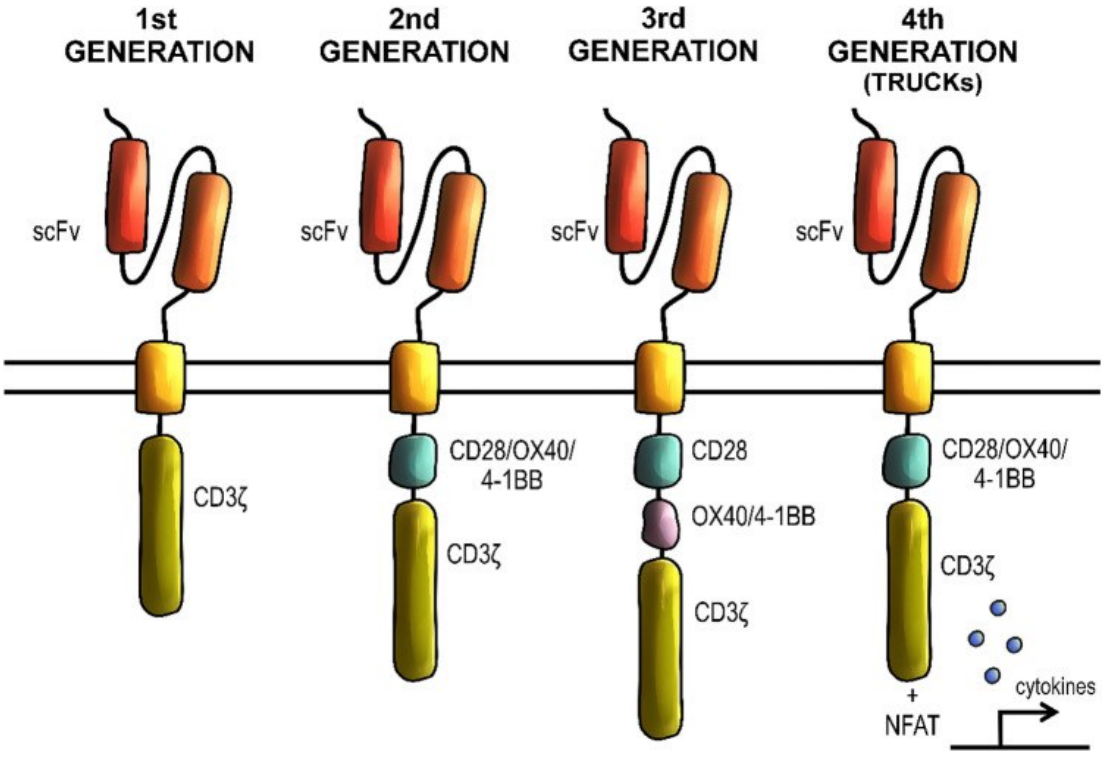


Figura 2. Generazioni di CAR-T. La prima generazione di cellule CAR-T viene utilizzata come modello per la costruzione delle generazioni successive e la sua attività di segnalazione si basa sulla presenza del dominio intracellulare CD3ζ. Le cellule CAR-T di seconda generazione (CAR-T) incorporano un dominio costimolatorio, più frequentemente CD28. Le CAR-T di terza generazione incorporano ulteriori domini costimolatori, come CD28, ICOS, 4-1BB o OX40. Le CAR-T di quarta generazione, chiamate anche TRUCK (*T cells Redirected for Universal*

Cytokine-mediated Killing), si basano sulle CAR-T di seconda generazione con l'aggiunta di una cassetta genica che induce l'espressione di citochine.

scFv: *single-chain variable fragment* - NFAT: *nuclear factor of activated T cells* [5]

Grazie alla loro struttura, le cellule CAR-T riescono a riconoscere antigeni specifici della cellula neoplastica, come il CD19 espresso dalle cellule B maligne, anche in assenza di MHC, superando i meccanismi di evasione della cellula neoplastica e attivando così la loro funzione citotossica attraverso l'esocitosi di granzimi e perforine.

Il processo produttivo delle cellule CAR-T inizia sottoponendo il paziente a linfocito-aferesi, che è una procedura che permette di raccogliere i linfociti T dal sangue periferico. Le cellule separate verranno poi spedite presso laboratori specializzati, "*cell factory",* dove saranno "attivate" *in vitro* e trasdotte con un vettore virale a basso potere oncogeno e limitata immunogenicità (in genere *lentivirus* o *retrovirus*) contenente il gene codificante per il recettore CAR. Una volta ingegnerizzati, i linfociti verranno poi espansi in coltura fino a raggiungere la quantità adeguata all'utilizzo clinico e saranno poi rispedite presso la clinica che somministrerà l'infusione.

Prima della re-infusione delle cellule CAR-T, il paziente viene sottoposto ad una chemioterapia linfodepletiva per permettere una migliore proliferazione *in vivo* dei linfociti T ingegnerizzati.

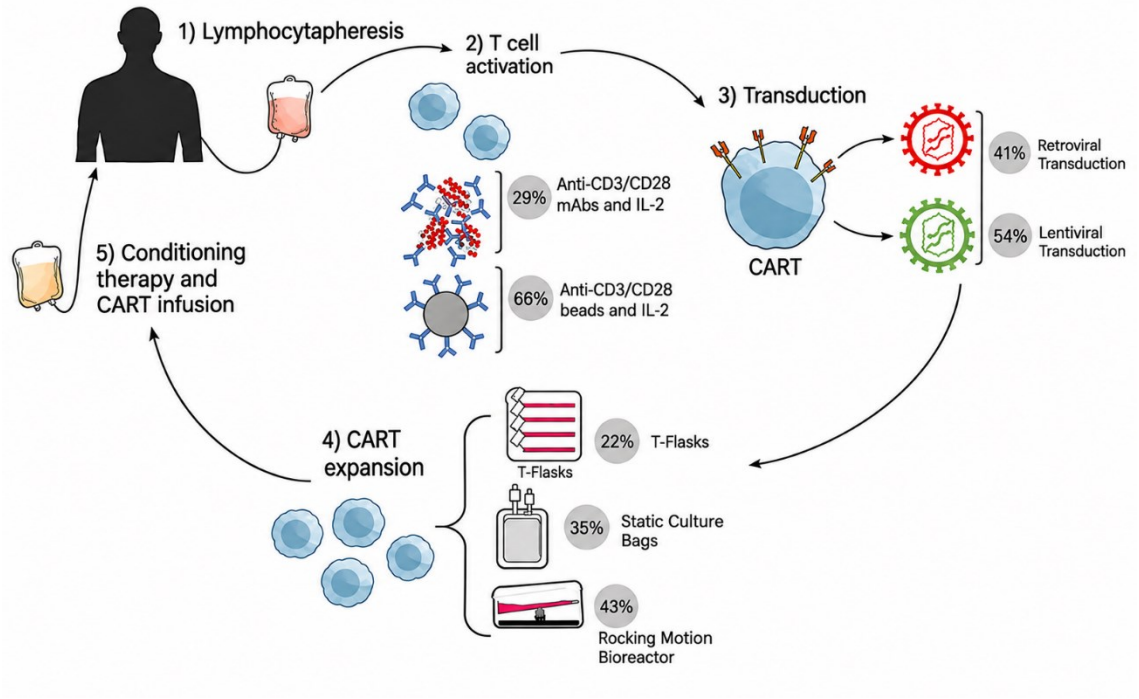


Figura 3. Processo di produzione e utilizzo clinico delle cellule CAR-T. 1) raccolta delle cellule immunitarie del paziente mediante linfocitoaferesi 2) i linfociti T vengono attivati 3) i linfociti T vengono successivamente modificati geneticamente mediante l'uso di vettori virali 4) espansione in vitro delle cellule T geneticamente modificate 4) Preparazione del paziente e infusione delle cellule CAR-T. [5 7]

Attualmente sono disponibili diversi tipi di terapia con cellule CAR-T, approvate in Europa, per il trattamento di neoplasie ematologiche, in particolare per le seguenti patologie:

- Linfoma non-Hodgkin diffuso a grandi cellule B (*Diffuse Large B-Cell Lymphoma*, DLBCL)
- Linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino (*Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma*, PMBCL)
- Linfoma follicolare (Follicular Lymphoma, FL)
- Linfoma mantellare (M*antle Cell Lymphoma*, MCL)

- Mieloma multiplo (*Multiple Myeloma*, MM)
- Leucemia linfoblastica acuta a cellule B (*B-cell acute lymphoblastic leukemia*, ALL-B). [8] [9]

Nel campione oggetto di questa tesi, 9 pazienti sono affetti da DLBCL e un paziente da ALL-B.

Il Linfoma diffuso a grandi cellule B rappresenta la forma più frequente di linfoma non-Hodgkin a cellule B (1/3 di tutti i linfomi non-Hodgkin), aggressivo e colpisce prevalentemente le persone adulte-anziane. In Europa, il tasso di incidenza dell'DLBCL è di circa 28.000 nuovi casi all'anno. La patologia colpisce più frequentemente i maschi rispetto alle femmine e l'incidenza aumenta con l'età. L'età media alla diagnosi è pari a 66 anni. Questo tipo di linfoma si manifesta generalmente con l'aumento del volume di uno o più linfonodi, ma può anche localizzarsi in siti extra linfonodali come l'osso, l'intestino o il sistema nervoso centrale. Può presentare sintomi come febbre, febbricola, perdita di peso, sudorazioni notturne o prurito. Il linfoma diffuso a grandi cellule B è stato a lungo considerato come una singola malattia; tuttavia, oggi è suddiviso in due diversi sottotipi molecolari, G*erminal Center B-cell like* (GCB) e *Activated B-Cell like* (ABC) che differiscono per biologia e prognosi. Il sottotipo GCB origina da linfociti B del centro germinativo e presenta generalmente una prognosi più favorevole ed una migliore risposta alle terapie convenzionali. Il sottotipo ABC, invece, deriva da linfociti B in una fase più avanzata di differenziamento e si caratterizza per una maggiore aggressività biologica, una prognosi meno favorevole e una più frequente resistenza ai trattamenti standard.

Circa il 30-40% dei pazienti affetti da DLBCL sviluppa una malattia refrattaria o recidivante dopo i trattamenti di prima linea. In questi casi la prognosi è generalmente

sfavorevole e le cellule CAR-T rappresentano oggi una delle principali opzioni terapeutiche nei pazienti idonei con malattia primaria refrattaria o recidivata precocemente, in particolare entro 12 mesi dalla conclusione della prima linea. [10]

La leucemia linfoblastica acuta a cellule B è una neoplasia relativamente rara nell'adulto: in Italia si registrano circa 1,6 casi ogni 100.000 maschi e 1,2 casi ogni 100.000 femmine, con circa 450 nuovi casi ogni anno tra gli uomini e 320 tra le donne. Nonostante la sua rarità nella popolazione adulta, questo tipo di neoplasia è il tumore più frequente in età pediatrica: rappresenta circa l'80% delle leucemie e il 25% di tutti i tumori diagnosticati tra 0 e 14 anni. I sintomi dell'ALL si manifestano rapidamente e di solito la diagnosi segue a breve. L'esordio clinico della malattia è rapido e caratterizzato da sintomi spesso aspecifici, quali astenia, febbre e perdita di appetito. Possono inoltre manifestarsi pallore e spossatezza correlati all'anemia, infezioni ricorrenti dovute alla riduzione dei leucociti normali e sanguinamenti, anche a livello delle mucose, conseguenti alla trombocitopenia.

Nei casi in cui la malattia si diffonda ad altri organi, possono comparire ingrossamento di milza, fegato e linfonodi. L'interessamento del sistema nervoso centrale può determinare cefalea e altri segni neurologici. [11]

Dal punto di vista patogenetico l'ALL-B è causata dall'accumulo di mutazioni genetiche acquisite, che determinano la trasformazione maligna di una cellula progenitrice ematopoietica. Questo processo comporta la proliferazione incontrollata, l'espansione clonale, la differenziazione aberrante e la riduzione dell'apoptosi, con progressiva sostituzione delle cellule normali con le cellule neoplastiche. [11]

Nella leucemia linfoblastica acuta a precursori B i CAR-T rappresentano un'importante opzione terapeutica per pazienti selezionati con malattia CD19-positiva recidivata o refrattaria, soprattutto in età pediatrica, adolescenziale e nei giovani adulti.

Le terapie CAR-T attualmente approvate per i linfomi non-Hodgkin a cellule B e per la leucemia linfoblastica acuta B recidivati o refrattari utilizzano come bersaglio l'antigene CD19. Il CD19 è una glicoproteina di membrana che viene espressa sia sulle cellule B normali che tumorali. Le cellule CAR-T anti-CD19 linfociti T ingegnerizzati esprimenti il recettore chimerico sono capaci di riconoscere e legarsi selettivamente alle cellule CD19 positive, inducendone l'eliminazione e contribuendo al controllo della malattia.

1.3 Il monitoraggio immunologico post-infusione

Dopo l'infusione, le cellule CAR-T riconoscono e legano l'antigene tumorale, entrano in una fase di rapida espansione clonale, che determina l'acquisizione ed il potenziamento delle loro funzioni citotossiche. Questo processo determina l'eliminazione delle cellule neoplastiche attraverso il rilascio di perforine e granzimi e si accompagna a una notevole eterogeneità fenotipica delle cellule CAR-T, correlata al loro stato di attivazione, differenziamento e maturazione, sia all'interno della popolazione CD4+ sia di quella CD8+.

Attualmente numerosi studi sono finalizzati sull'individuare possibili correlazioni tra la l'espansione in vivo delle cellule CAR-T e la loro caratterizzazione e l'andamento clinico dei pazienti, al fine di comprendere se specifiche sottopopolazioni linfocitarie siano associate a una maggiore efficacia terapeutica o a un diverso profilo di tossicità: ad esempio, la maggior presenza delle CAR-T *central memory*, con fenotipo CD45RO+, CD62L+, sembra favorire la loro persistenza *in vivo*, oppure la presenza delle cellule CAR-T CD8+ CD45RA+ CCR7+ è stata associata a una più intensa espansione in vivo, alla risposta clinica e alla sopravvivenza libera da progressione [12].

Inoltre, diversi studi preclinici hanno evidenziato che un buon equilibrio tra i linfociti CD4+ e CD8+ sia associato ad un effetto antitumorale efficace e duraturo. [13]

La ricerca si sta inoltre concentrando sulle differenze biologiche e funzionali tra i principali prodotti CAR-T attualmente utilizzati nella pratica clinica, in particolare *axicabtagene ciloleucel* (Axi-cel, nome commerciale *Yescarta*) e *Tisagenlecleucel* (Tisa-cel, nome commerciale *Kymriah*): Axi-cel utilizza un dominio costimolatorio CD28 ed è ottenuto mediante trasferimento genico con vettori retrovirali, mentre Tisa-cel incorpora un dominio costimolatorio 4-1BB e viene prodotto mediante vettori lentivirali.

Quest'ultimo dominio sembrerebbe stimolare maggiormente l'espansione e la persistenza dei linfociti CD8+ *central memory*, mentre il CD28 di Axi-cel indurrebbe una risposta più rapida grazie alla prevalenza di cellule *effector memory.* [13]

L'espansione e la persistenza delle cellule CAR-T sono due aspetti cruciali per la risposta terapeutica: l'espansione rappresenta l'aumento numerico delle cellule CAR-T nei giorni successivi all'infusione, mentre la persistenza indica la capacità di queste cellule di rimanere rilevabili nel tempo mantenendo la propria attività biologica. Entrambi i parametri sono considerati importanti biomarcatori della risposta terapeutica e sono influenzati, non solo dalle caratteristiche del prodotto infuso, ma anche da fattori clinici e biologici del paziente, tra cui l'età, le linee di terapia ricevute e lo stato funzionale del sistema immunitario.

Dopo la somministrazione della terapia CAR-T, il sistema immunitario del paziente attraversa una fase di profonda alterazione, determinata sia dalla chemioterapia linfodepletiva pre-infusione, sia dall'espansione e dall'attività delle stesse cellule CAR-T. In questo contesto, la ricostituzione immunologica rappresenta un processo graduale che porta al ripristino delle popolazioni cellulari immunitarie e delle loro normali funzioni. Tale fenomeno è altamente variabile tra i pazienti ed è influenzato dall'età, dalle precedenti terapie cito-ablative e dal regime di condizionamento.

Uno dei fenomeni più frequentemente osservati durante il *follow-up* è la persistente riduzione della conta dei linfociti T CD4+, che in alcuni pazienti può protrarsi per oltre un anno dopo il trattamento. Analogamente, una quota di pazienti può sviluppare un'aplasia prolungata delle cellule B; in alcune casistiche essa persiste nel 25–38% dei pazienti anche a distanza di anni dal trattamento. [14]

L’aplasia delle cellule B viene considerata un indicatore indiretto della persistenza funzionale delle cellule CAR-T anti-CD19: questo fenomeno è dovuto sia agli effetti della chemioterapia linfodepletiva sia all'azione delle cellule CAR-T, perché questo antigene è espresso dalle cellule B normali a partire dagli stadi precoci di sviluppo fino alle cellule B mature, determinando una deplezione prolungata di questa popolazione cellulare [15].

Il monitoraggio immunologico dei pazienti trattati con cellule CAR-T viene effettuato mediante differenti metodiche di laboratorio.

L’emocromo con formula leucocitaria consente di valutare il recupero delle principali linee ematopoietiche, mentre la citofluorimetria multiparametrica permette di quantificare e caratterizzare le sottopopolazioni linfocitarie T, B e NK, nonché di monitorare l’eventuale aplasia delle cellule B. Questa tecnica consente infatti di identificare simultaneamente diversi marcatori cellulari, permettendo un'analisi dettagliata del profilo immunofenotipico e della ricostituzione immunologica successiva al trattamento. [16]

La persistenza e l’espansione delle cellule CAR-T possono essere valutate direttamente mediante citofluorimetria, utilizzando reagenti specifici per il recettore CAR, oppure indirettamente mediante tecniche molecolari, quali qPCR e *digital*PCR, finalizzate alla quantificazione del transgene CAR. [16]

1.4 Complicanze e tossicità associate

Le principali complicanze associate a terapia con cellule CAR-T descritte in letteratura sono la sindrome da rilascio di citochine (*Cytokine Release Syndrome*, CRS) e la sindrome da neurotossicità associata alle cellule effettrici immunitarie *(Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome*, ICANS).

La CRS viene definita oggi dal *Common Terminology Criteria for Adverse Events* sviluppato dal *National Cancer Institute* come una sindrome caratterizzata da febbre, tachipnea, cefalea, tachicardia, ipotensione, ipossia ed eventuale comparsa di rash cutaneo causata dal rilascio di citochine. [17] Questo processo è sostenuto sia dalle cellule CAR-T attivate, che da altre cellule immunitarie, in particolare monociti e macrofagi, che contribuiscono alla produzione delle principali citochine coinvolte nella risposta infiammatoria.

La CRS è una condizione altamente eterogenea, non solo per le tempistiche di insorgenza, ma anche per la gravità dei sintomi: nella maggior parte dei pazienti insorge entro 2-7 giorni dall'infusione (sebbene possano verificarsi presentazioni più tardive fino a 3 settimane), e la severità dipende sia dal prodotto infuso che dalle caratteristiche del singolo paziente. È stato osservato che i prodotti contenenti il dominio costimolatorio CD28 tendono a determinare una più rapida espansione cellulare e un rischio maggiore di CRS precoce rispetto ai prodotti basati sul dominio 4-1BB. [18] [19]

Nel 2018 l'*American Society for Transplantation and Cellular Therapy* (ASTCT), ha introdotto dei criteri standardizzati di classificazione della CRS. La febbre rappresenta il criterio essenziale per la diagnosi, mentre la presenza e l'intensità dell'ipotensione e dell'ipossia vengono utilizzate per determinarne il grado di severità. [17]

Il riconoscimento del ruolo fondamentale dell'IL-6 nella patogenesi della CRS, ha portato all'introduzione del *tocilizumab*, un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore dell'IL-6, come trattamento in prima linea di terapia nei casi che richiedono un intervento farmacologico. Nelle forme più severe, persistenti o refrattarie può essere associata terapia corticosteroidea. Ulteriori opzioni terapeutiche comprendono il *siltuximab*, che agisce direttamente sull'IL-6, e l'*anakinra*, antagonista del recettore dell'IL-1, che ha mostrato risultati promettenti soprattutto nelle forme più gravi. [20] [21]

La sindrome da neurotossicità rappresenta invece una complicanza neurologica correlata all'attivazione delle cellule effettrici immunitarie. Sebbene la patogenesi non sia stata del tutto chiarita, si ritiene sia causata dall'eccessiva produzione di citochine infiammatorie ad opera delle cellule CAR-T attivate e delle cellule immunitarie innate, associate ad una disfunzione endoteliale e all'aumento della permeabilità della barriera ematoencefalica, che determina l'ingresso di mediatori infiammatori nel sistema nervoso centrale.

Dal punto di vista clinico l'ICANS si manifesta con afasia, disartria, alterazioni cognitive e della motilità, alterazioni dello stato di coscienza, crisi epilettiche e, nei casi più gravi, edema cerebrale. Come nel caso della CRS, insorgenza, durata e severità dell'ICANS dipendono sia dalle caratteristiche del prodotto infuso che da fattori individuali del paziente.

La valutazione dell'ICANS viene effettuata mediante *l'Immune Effector Cell-Associated Encephalopathy* (ICE) *Score*, uno strumento che analizza orientamento, capacità di denominazione, esecuzione di semplici comandi, scrittura e attenzione. Il punteggio ottenuto viene successivamente integrato con altri parametri clinici, quali il livello di coscienza, la presenza di crisi epilettiche, deficit motori e segni di edema cerebrale, per definire il grado complessivo di severità dell'ICANS. [17]

Il trattamento si basa principalmente sulla terapia di supporto e sull'uso di corticosteroidi. A differenza della CRS, il *tocilizumab* si è dimostrato generalmente poco efficace nel controllo della sintomatologia neurologica, poiché attraversa difficilmente la barriera ematoencefalica.

Nei pazienti che presentano contemporaneamente CRS e ICANS, entrambe le complicanze richiedono un attento monitoraggio e una gestione tempestiva. Le forme lievi di neurotossicità tendono generalmente a risolversi spontaneamente, mentre a partire dai quadri di grado moderato è raccomandato il trattamento con corticosteroidi. Nei casi persistenti o in peggioramento possono inoltre essere indicati approfondimenti diagnostici mediante neuroimaging ed esame del liquido cefalorachidiano. [20] [22]

2. SCOPO DELLA TESI

Nonostante i notevoli progressi ottenuti con la terapia CAR-T, i meccanismi che regolano l'espansione, la persistenza e la ricostituzione immunologica nei diversi pazienti non sono ancora completamente compresi. L'identificazione di specifiche caratteristiche immunofenotipiche associate alla risposta clinica potrebbe fornire strumenti utili per ottimizzare il monitoraggio post-infusione, prevedere l'efficacia terapeutica e individuare precocemente eventuali complicanze. In questo contesto, il monitoraggio mediante citofluorimetria multiparametrica rappresenta un importante strumento per la valutazione dinamica delle popolazioni linfocitarie e della persistenza delle cellule CAR-T.

L'obiettivo principale di questo lavoro è analizzare la cinetica di espansione e persistenza delle cellule CAR-T in pazienti affetti da neoplasie ematologiche sottoposti a terapia cellulare, attraverso l'utilizzo della citofluorimetria a flusso multiparametrica.

Lo studio si propone, inoltre, di valutare le modificazioni delle principali sottopopolazioni linfocitarie durante il *follow-up* post-infusione, confrontando i risultati ottenuti ai diversi *time-point*s di monitoraggio. L'analisi dei dati consentirà di descrivere il processo di ricostituzione immunologica e di verificare l'eventuale associazione tra i parametri immunofenotipici rilevati e l'andamento clinico dei pazienti.

Attraverso questo lavoro si intende inoltre evidenziare il ruolo della citofluorimetria a flusso quale strumento essenziale per il monitoraggio dei pazienti trattati con cellule CAR-T, sottolineando il contributo del laboratorio nella valutazione della risposta terapeutica, della persistenza cellulare e della dinamica del recupero immunitario nel periodo post-infusione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti arruolati

Nel presente lavoro sono state analizzate la persistenza delle cellule CAR-T e la dinamica delle relative sottopopolazioni nel sangue periferico di dieci pazienti sottoposti a terapia CAR-T presso la Clinica di Ematologia dell'azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona. Sono stati analizzati tutti i campioni di sangue periferico raccolti in un anno di attività a partire da aprile 2025 ai seguenti *timepoints*: giorno 0 (infusione), +1, +3, +5, +7, +10, +14, +21, +28 e +90 giorni.

Le cellule sono state caratterizzate mediante citofluorimetria multiparametrica, valutando l'espressione di specifici antigeni di superficie. A tal fine, i campioni sono stati marcati con pannelli di anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi differenti, consentendo l'identificazione e la quantificazione delle molecole espresse dalle cellule CAR-T.

Parallelamente, è stato valutato il processo di immunoricostituzione successivo all'infusione, mediante l'analisi delle principali popolazioni linfocitarie a 1 e 3 mesi dal trattamento.

La coorte studiata era costituita da nove pazienti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) e da un paziente con leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL). Quest'ultimo è stato trattato con *Brexucabtagene autoleucel* (*Tecartus*), mentre gli altri nove pazienti hanno ricevuto *Axicabtagene ciloleucel* (*Yescarta*). L'età media della popolazione era di 62 anni, con un *range* compreso tra 39 e 75 anni; la distribuzione per sesso risultava omogenea, con cinque pazienti di sesso maschile e cinque di sesso femminile.

Per quanto riguarda la tossicità correlata al trattamento, nove pazienti hanno sviluppato una sindrome da rilascio di citochine (*Cytokine Release Syndrome*, CRS): cinque casi di

grado 1, due casi di grado 2 e due casi di grado 3. In sette pazienti si è reso necessario un trattamento specifico per la gestione della tossicità. La neurotossicità associata alle cellule effettrici immunitarie (*Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome*, ICANS) è stata osservata in due pazienti, rispettivamente di grado 1 e grado 2, entrambi sottoposti a trattamento farmacologico.

Durante il periodo di osservazione, un paziente è deceduto a circa due mesi dall'infusione a causa di una complicanza infettiva.

PAZIENTI	SESSO	ETÀ	DIAGNOSI	CAR-T	CRS	ICANS
10	5M 5F	62 (39-75)	9 DLBCL 1 B-ALL	9 Axicabtagene ciloleucel (Yescarta); 1 Brexucabtagene autoleucel (Tecartus)	9	2

Tabella 1. Caratteristiche dei dieci pazienti analizzati

3.2 Processamento e marcatura dei campioni

La valutazione della presenza e della persistenza delle cellule CAR-T dopo l'infusione è stata effettuata a partire da campioni di sangue periferico raccolti in provette contenenti EDTA come anticoagulante (tappo viola).

La procedura standard prevede la separazione della componente linfocitaria tramite *buffy coat*, che si ottiene tramite centrifugazione del sangue intero a 2600 RPM per 5 minuti.

Al termine della procedura, il campione risulta separato in tre distinti strati: plasma nella porzione superiore, uno strato di globuli bianchi nella zona intermedia ed eritrociti sul fondo della provetta (Figura 4).

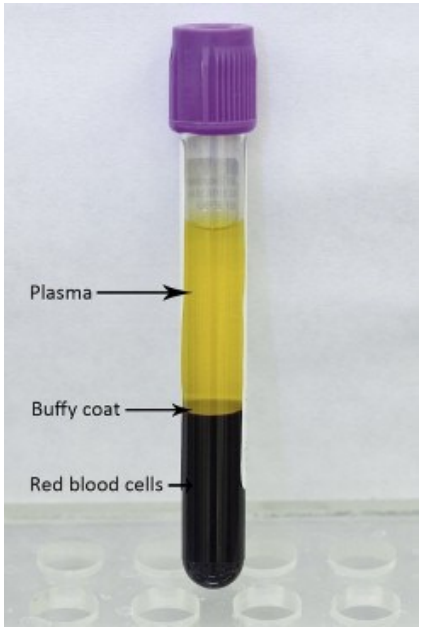


Figura 4. *Buffy coat*: Campione dopo centrifugazione del sangue intero con anticoagulante a 2600 RPM per 5 minuti. Partendo dall'alto: plasma, globuli bianchi, eritrociti.

Successivamente, utilizzando una pipetta *pasteur*, si elimina tutto il plasma e si raccoglie con particolare attenzione tutto lo strato leucocitario visibile, effettuando delicati movimenti circolari per evitare la contaminazione con gli eritrociti sottostanti.

Una volta isolato, 200 µL di *buffy coat* sono trasferiti in una provetta per citometria a flusso contenente il pannello di anticorpi monoclonali precedentemente preparato. Tali anticorpi, specifici per determinati antigeni di superficie, consentono la caratterizzazione fenotipica delle popolazioni cellulari oggetto di studio, con particolare riferimento alle cellule CAR-T.

Ogni anticorpo monoclonale è diretto verso uno specifico antigene presente sulla membrana cellulare chiamato CD (*Cluster of Differentiation*) ed è coniugato con un fluorocromo che ne permette la rilevazione mediante citofluorimetria. Il pannello utilizzato per l'analisi delle sottopopolazioni dei CAR-T è il seguente:

FITC	PE	PerCP	Pe-Cy7	APC	APC-R700	APC-Cy7	V450	V500
CD3	CD19 RIC	7AAD	CD45RA	CD8	CD56	CD19	CD4	CD45

- CD3: antigene espresso sulle superficie di tutti i linfociti T
- CD19 RIC: anticorpo ricombinante specifico CAR *Detection Reagent* (a-FMC63) *Antibody, anti-human, PE, REAfinity* (*Miltenyi Biotec*). Proteina ricombinante derivata dall'antigene CD19, utilizzata per l'identificazione delle cellule CAR-T anti-CD19
- 7AAD (7-Aminoactinomicina D): marcatore di vitalità cellulare, in grado di penetrare esclusivamente nelle cellule con membrana compromessa, quindi nelle cellule morte.
- CD45RA: isoforma della proteina CD45 espressa dai linfociti T *naïve*
- CD8: marcatore espresso dai linfociti T citotossici

- CD56: marcatore espresso prevalentemente dalle cellule *Natural Killer* (NK e TNK)
- CD19: antigene specifico dei linfociti B
- CD4: marcatore dei linfociti T *helper*
- CD45: antigene pan-leucocitario espresso dalla maggior parte delle cellule ematopoietiche.

Il pannello utilizzato per l'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie per valutare l'immunoricostituzione è il seguente:

FITC	PE	PerCP	Pe-Cy7	APC	APC-R700	APC-Cy7	V450	V500
CD4	CD45RO	CD8	CD45RA	CD56	CD25	CD3	CD20	CD45

- CD4: marcatore dei linfociti T *helper*
- CD45RO: isoforma della proteina CD45 espressa dai linfociti T *memory*
- CD8: marcatore espresso dai linfociti T citotossici
- CD45RA: isoforma della proteina CD45 espressa dai linfociti T *naïve*
- CD56: marcatore espresso prevalentemente dalle cellule *Natural Killer* (NK e TNK)
- CD25: marcatore dei linfociti Treg
- CD3: antigene espresso sulle superficie di tutti i linfociti T
- CD20: antigene specifico dei linfociti B
- CD45: antigene pan-leucocitario espresso dalla maggior parte delle cellule ematopoietiche.

Dopo l'aggiunta dei reagenti, il campione viene vortexato e incubato al buio per 15 minuti a temperatura ambiente, in modo da consentire il legame degli anticorpi ai rispettivi antigeni. Al termine dell'incubazione si aggiungono 4 mL di soluzione lisante per la rimozione della componente eritrocitaria, e segue una seconda incubazione al buio per 10 minuti a temperatura ambiente.

Il campione viene poi sottoposto a centrifugazione a 1800 rpm per 10 minuti; il surnatante viene eliminato ed il pellet viene risospeso in 4 mL di soluzione di lavaggio costituita da PBS supplementato con siero fetale bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS). Dopo una seconda centrifugazione a 1800 rpm per 5 minuti ed eliminazione del surnatante, il campione è pronto per l'acquisizione strumentale.

3.3 Acquisizione al citofluorimetro

Come accennato precedentemente, la citofluorimetria a flusso è la principale tecnologia impiegata nel presente studio. Questa metodica consente di combinare elevata velocità di acquisizione, accuratezza analitica, capacità multiparametrica e analisi di un elevato numero di cellule in tempi ridotti. Grazie a tali caratteristiche, trova ampio impiego sia nella diagnostica di laboratorio sia nella ricerca biomedica.

Il citofluorimetro è costituito da tre componenti principali: il sistema fluidico, il sistema ottico e il sistema elettronico. Il sistema fluidico ha il compito di garantire la focalizzazione idrodinamica delle cellule, permettendo il loro passaggio ordinato attraverso il punto di intercettazione con il fascio laser. Il sistema ottico comprende le sorgenti di eccitazione, i filtri ottici, gli specchi dicroici e i *detector* necessari per la raccolta e la separazione dei segnali luminosi. Infine, il sistema elettronico converte i segnali ottici in dati digitali, successivamente elaborati mediante *software* dedicati.

Le cellule attraversano singolarmente il fascio laser, consentendo la caratterizzazione di ogni singolo evento cellulare.

Affinché ciò avvenga correttamente, è fondamentale garantire un'efficace focalizzazione idrodinamica, processo basato sulle proprietà del flusso laminare coassiale.

La sospensione cellulare viene trasportata tramite lo *sheath fluid* all'interno della camera di conta, dove il fascio laser colpisce le cellule: questa interazione genererà i segnali di *forward scatter (FSC)* e di *side scatter (SSC)*, ed i segnali di fluorescenza.

Le sorgenti luminose utilizzate sono costituite prevalentemente da laser o diodi laser. L'impiego di più sorgenti di eccitazione permette la rilevazione simultanea di un numero maggiore di fluorocromi e, di conseguenza, l'analisi di molteplici parametri cellulari.

Il *forward Scatter* rappresenta la componente della luce *laser* diffusa prevalentemente lungo l'asse di propagazione del fascio quando una cellula lo attraversa: l'intensità del segnale FSC è correlata alle dimensioni relative della cellula.

Il *side scatter* invece corrisponde alla componente della luce diffusa a 90° rispetto alla direzione di propagazione del fascio *laser*: l'intensità del segnale SSC è correlata alla complessità strutturale interna della cellula e dipende dai fenomeni di diffusione, rifrazione e riflessione associati alla presenza di organelli ed altre strutture intracellulari.

I segnali FSC, SSC e quelli di fluorescenza vengono successivamente separati attraverso un sistema di specchi dicroici e filtri ottici specifici, che indirizzano ciascuna lunghezza d'onda verso il *detector* corrispondente, che li trasformerà in segnali elettrici proporzionali alla loro intensità. I dati ottenuti vengono infine elaborati tramite software dedicati, consentendo l'identificazione e la caratterizzazione delle diverse popolazioni cellulari presenti nel campione. [23] [24]

I campioni sono stati analizzati con il citofluorimetro BD FACSLyric™ II (*BD Biosciences*), in grado di valutare simultaneamente i parametri fisici di *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC) e fino a dieci segnali di fluorescenza, consentendo la caratterizzazione multiparametrica delle popolazioni cellulari analizzate.

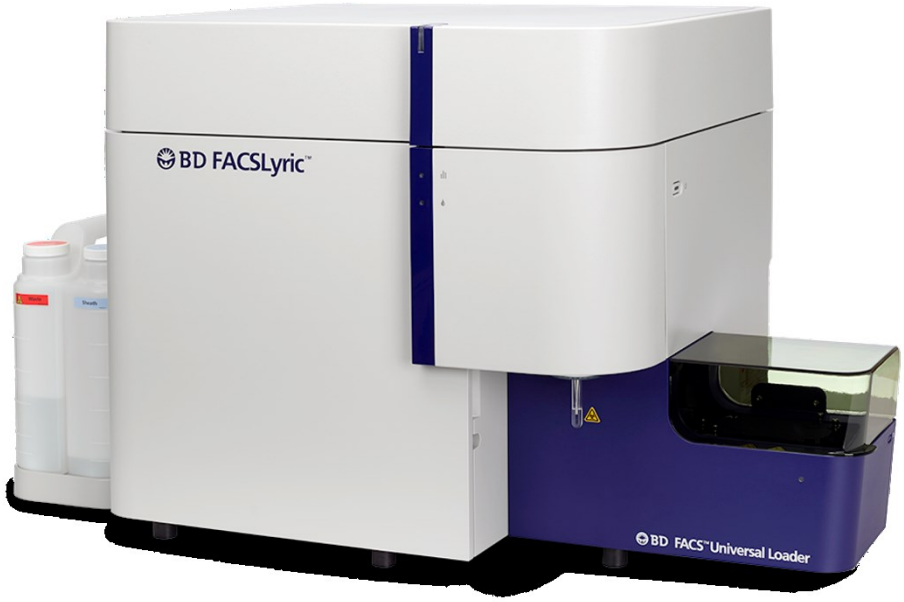


Figura 5. BD FacsLyric. Citofluorimetro di nuova generazione (*BD Biosciences)*.

Questo strumento contiene tre sorgenti *laser*: il primo, solido, emette nello spettro del blu a 488 nm, il secondo di tipo Elio-Neon che emette nel rosso a 635 nm ed il terzo che emette nel violetto a 405 nm. Il citofluorimetro viene calibrato una volta al giorno con una soluzione contenente delle *microbeads* in sospensione, in grado di emettere un segnale di fluorescenza ad intensità crescente e nota, in uno spettro di lunghezze d'onda analogo a quello dei fluorocromi utilizzati. L'analisi dei picchi prodotti dalle *microbeads* permette di mantenere lo strumento in condizioni di riproducibilità intra ed interserie e di valutarne le caratteristiche di sensibilità e linearità.

Di ogni campione vengono acquisiti 1.000.000 di eventi. I citogrammi vengono analizzati mediante il software BD FACSuite™

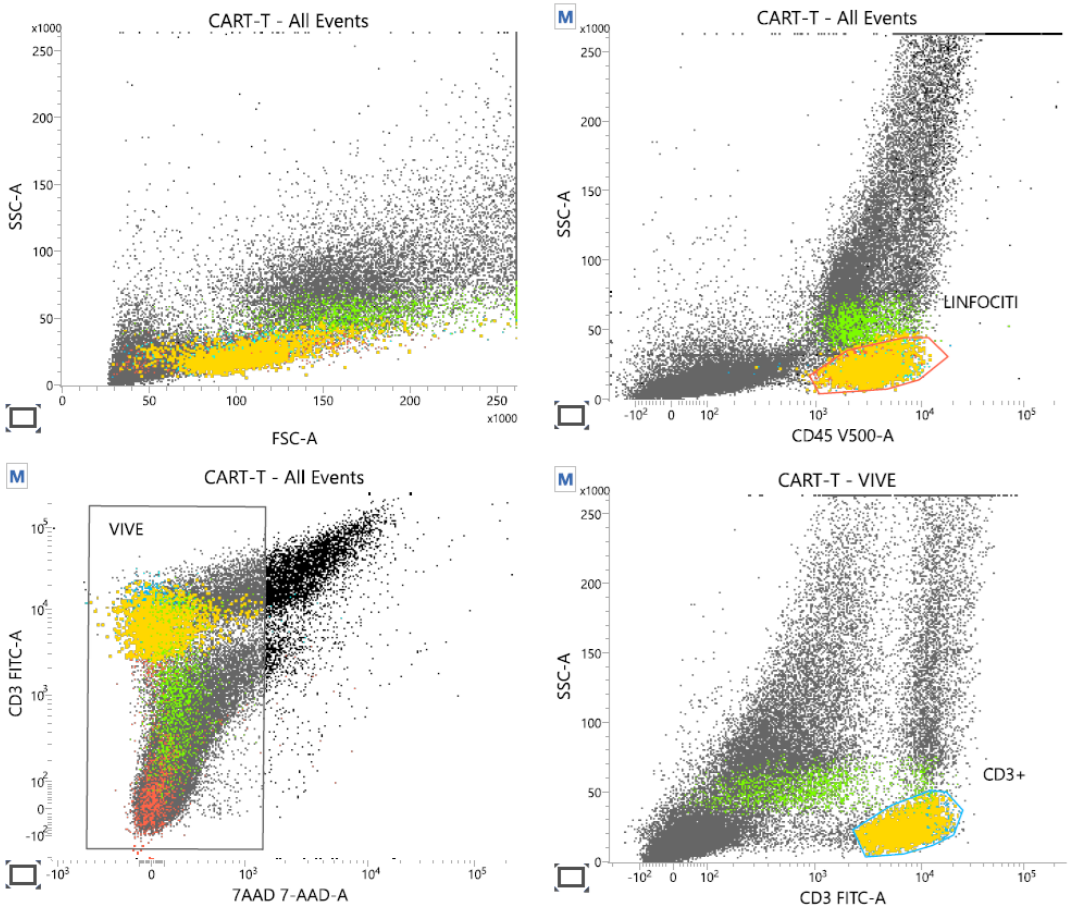


Figura 6. Strategia di *gating* CAR-T parte 1

a) Parametri fisici FSC/SSC

b) Linfociti totali

c) Cellule vive

d) Linfociti T CD3+

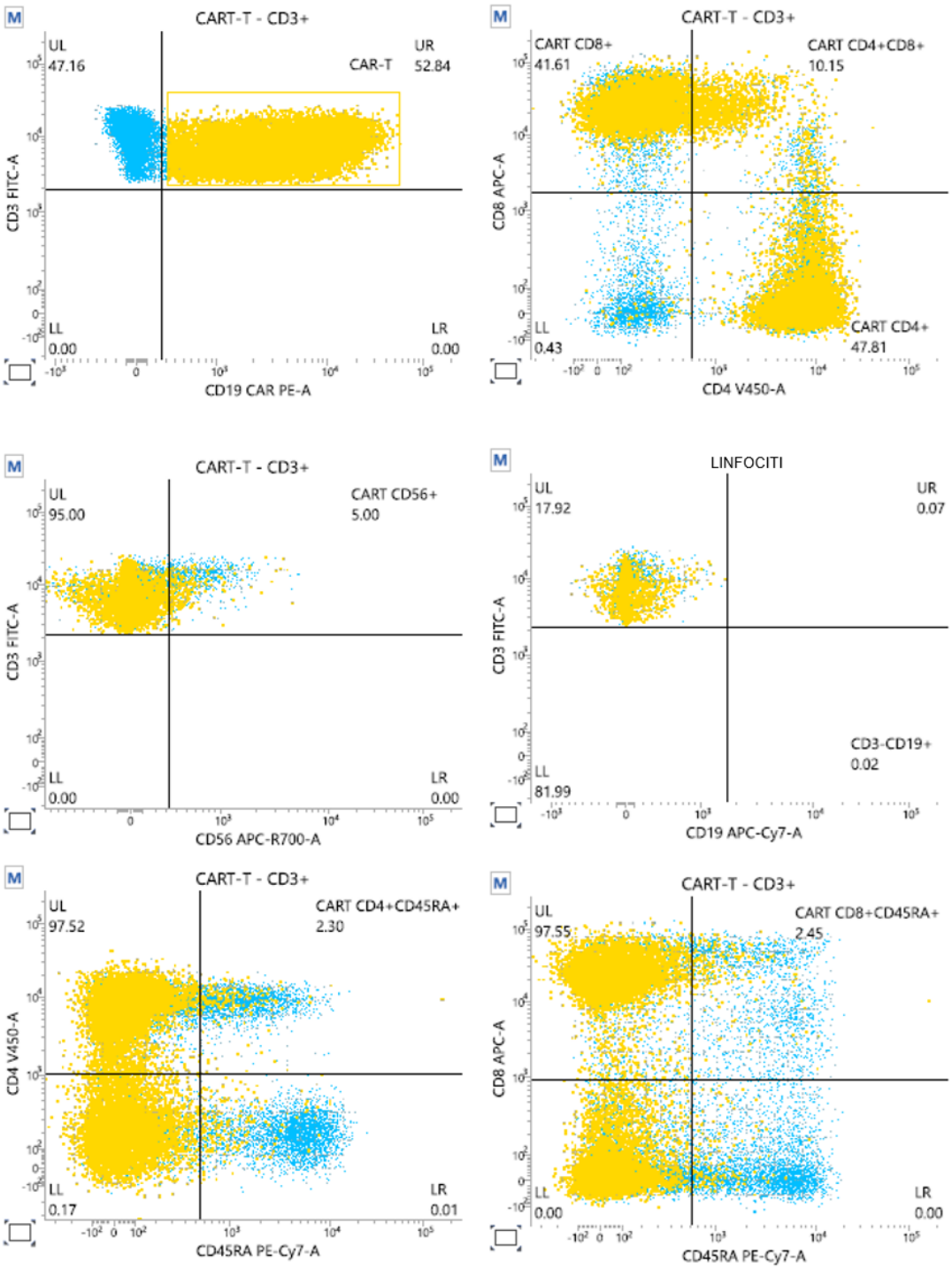


Figura 7. Strategia di *gating* CAR-T parte 2

a) CAR-T totali CD3+CD19 RIC +

b) CAR-T CD4+, CD8+, CD4+CD8+

c) CAR-T CD56+

d) Linfociti CD3-CD19+

e) CAR-T CD4+ CD45RA+

f) CAR-T CD8+ CD45RA+

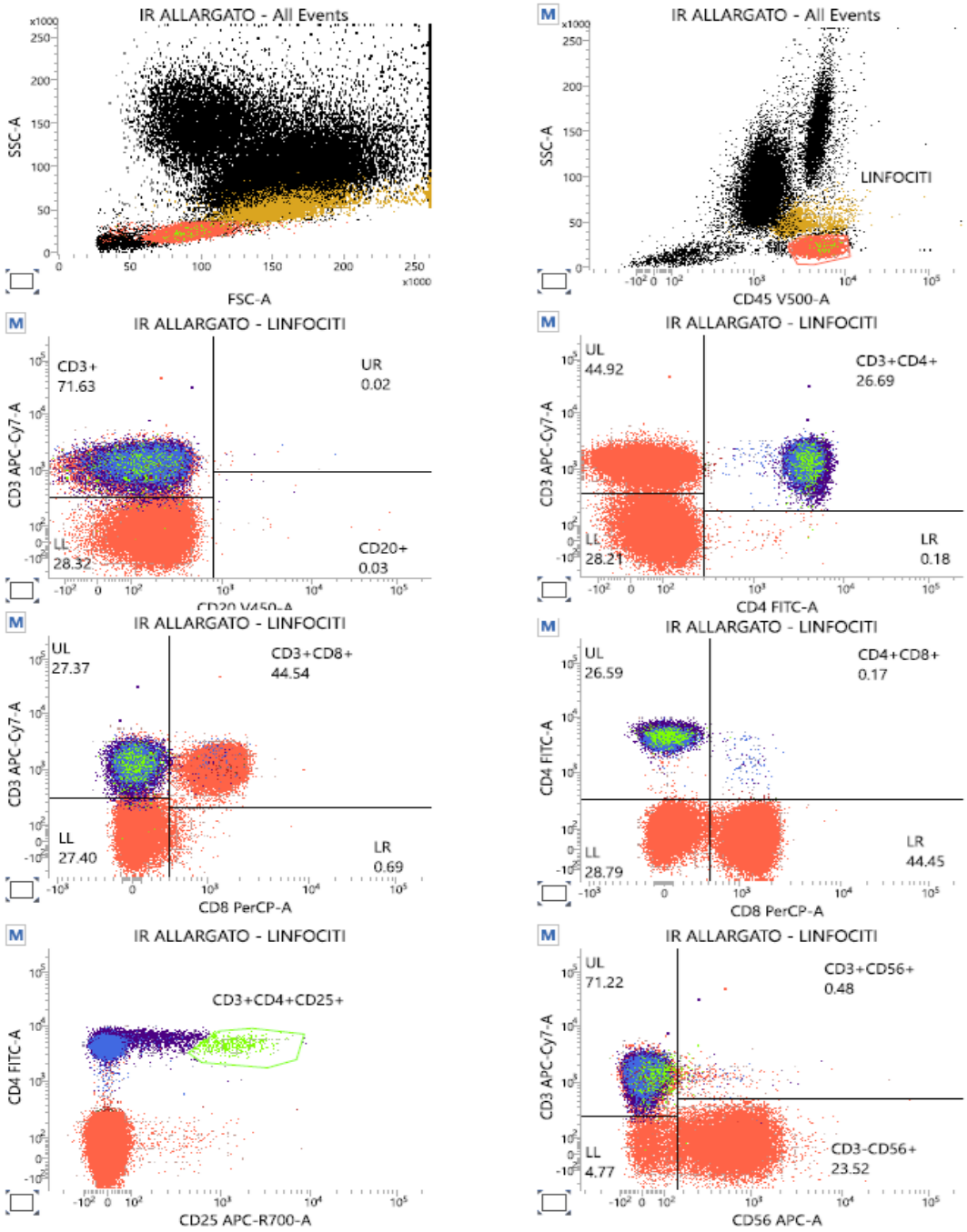


Figura 8. Strategia di *gating* immunoricostituzione parte 1

a) Parametri fisici FSC/SSC

b) Linfociti totali

c) Linfociti T CD3+ e linfociti B CD20+

d) Linfociti T helper CD3+CD4+

e) Linfociti T citotossici CD3+CD8+

f) Linfociti T CD3+CD4+CD8+

g) Linfociti T CD3+CD4+CD25+

h) Linfociti NKT CD3+CD56+ e NK CD3-CD56+

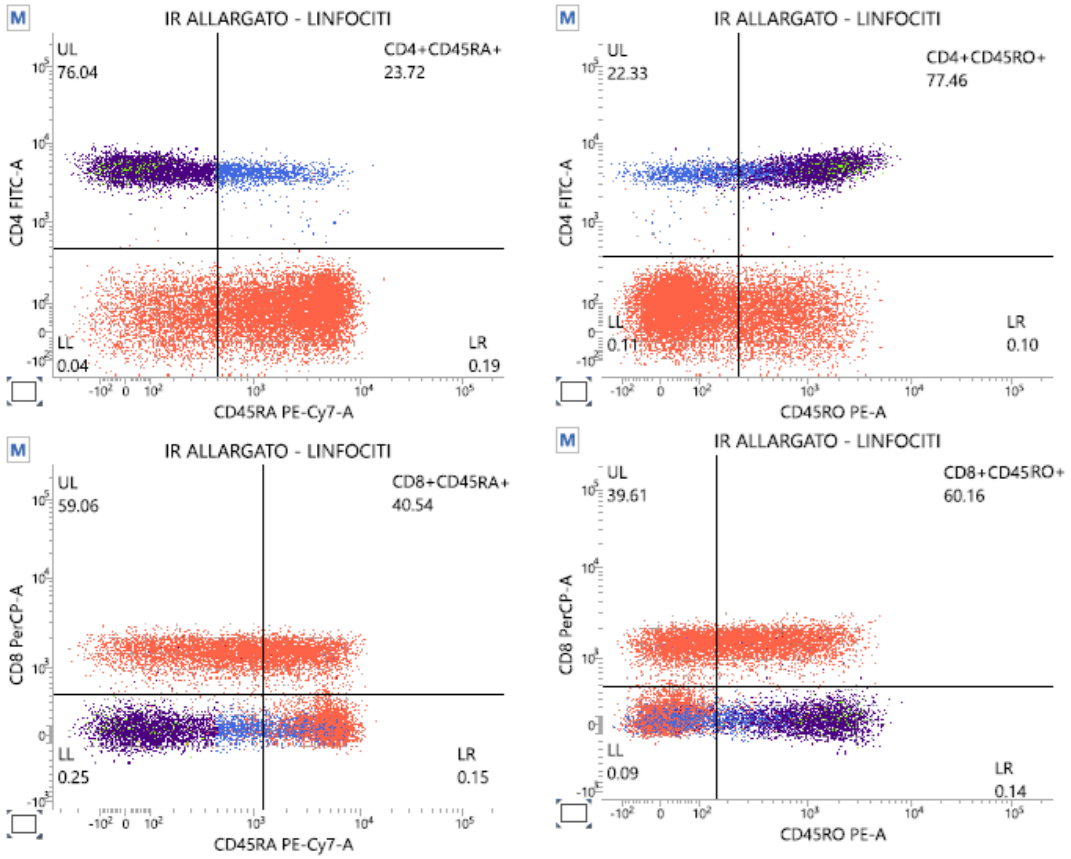


Figura 9 Strategia di *gating* immunoricostituzione parte 2

a) Linfociti T *helper naïve* CD3+CD4+CD45RA+

b) Linfociti T *helper memory* CD3+CD4+CD45RO+

c) Linfociti T citotossici *naïve* CD3+CD8+CD45RA+

d) Linfociti T citotossici *memory* CD3+CD8+CD45RO+

3.4 Analisi statistica

I risultati ottenuti sono elaborati attraverso Microsoft Office Excel: i dati sono stati descritti mediante statistiche descrittive e riportati come mediana e intervallo min-max.

4. RISULTATI

In questo lavoro abbiamo analizzato dieci pazienti sottoposti a terapia con cellule CAR-T presso il nostro centro. I campioni di sangue periferico stati raccolti secondo i seguenti *timepoints*: giorno 0 (infusione), +1, +3, +5, +7, +10, +14, +21, +28, e 90 giorni.

L'espansione delle cellule CAR-T è stata valutata mediante citofluorimetria multi-parametrica, con identificazione delle cellule T CD3+ CAR-T+ e loro quantificazione percentuale, ed è stata inoltre studiata l'immunoricostituzione attraverso l'analisi delle principali sottopopolazioni linfocitarie utilizzando un pannello citofluorimetrico dedicato.

4.1 Espansione cellule CAR-T

La figura 10 mostra la mediana del numero percentuale di cellule CAR-T misurate nel tempo dopo l'infusione. Entro i primi due giorni la quota di CAR-T risulta pressoché assente o molto bassa. A partire dal giorno 5 si osserva una rapida fase di espansione, con un incremento medio fino a circa il 13%, che raggiunge il valore massimo al giorno 7 (mediana 25; min 2, max 61).

Successivamente si evidenzia una progressiva diminuzione della popolazione cellulare, che al giorno 21 raggiunge valori inferiori al 5%. Al giorno 28 la presenza di cellule CAR-T risulta quasi nulla e al giorno 90 non vengono più rilevate cellule CAR-T circolanti.

Le barre di errore evidenziano un'elevata variabilità interindividuale, particolarmente marcata durante la fase di espansione che tende a ridursi nelle fasi successive, parallelamente alla diminuzione della quota di cellule CAR-T.

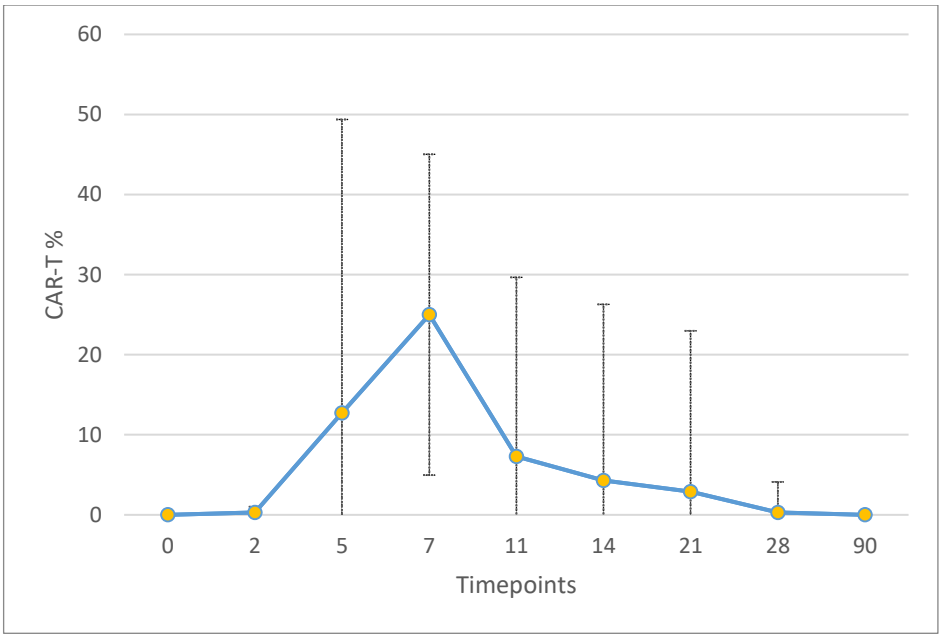


Figura 10. CAR-T % su tutti i linfociti CD3+

La figura 11 mostra l'andamento della percentuale di cellule CAR-T nei singoli pazienti durante il *follow-up*. Si osserva una marcata eterogeneità nella cinetica di espansione, con alcuni pazienti che raggiungono elevati livelli di CAR-T entro la prima settimana dopo l'infusione, mentre altri presentano un'espansione più contenuta.

Nella maggior parte dei casi il picco di espansione si verifica tra il giorno 5 e il giorno 11, seguito da una progressiva riduzione della quota di cellule CAR-T nel tempo; un solo paziente ha mantenuto percentuali elevate fino al ventunesimo giorno.

Dopo 3 mesi in tutti i pazienti le cellule CAR-T risultano assenti o presenti in quantità trascurabili.

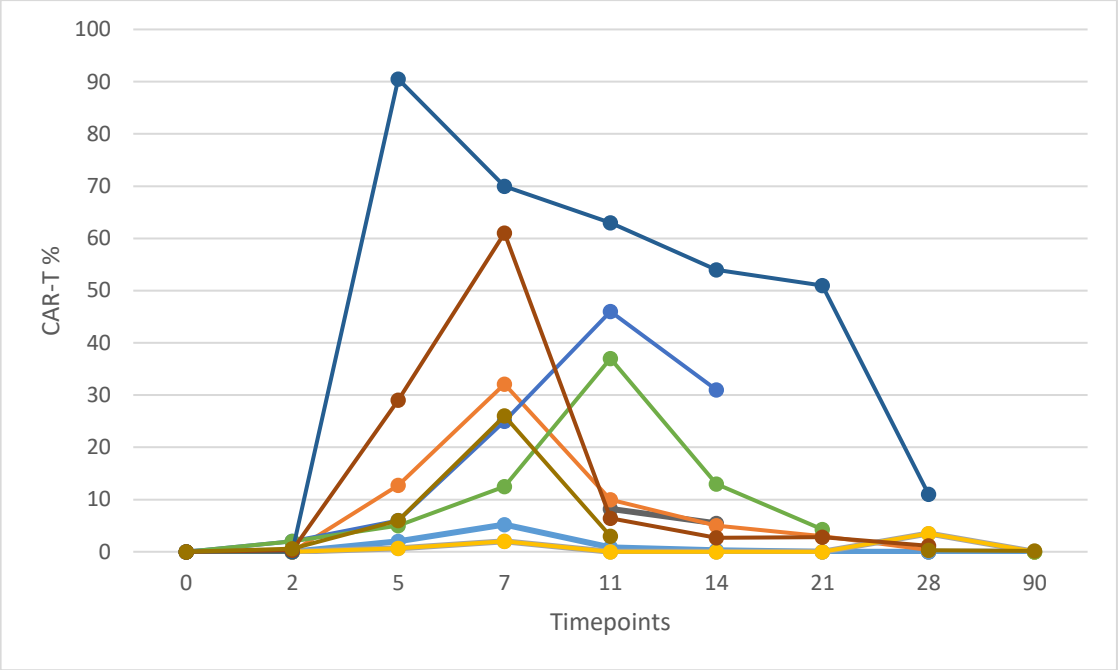


Figura 11. CAR-T % per singolo paziente

La figura 12 mostra una rapida espansione delle cellule CAR-T CD4+ nei primi giorni dopo l'infusione, con un picco al giorno 5 (mediana 53; min 20, max 68). Successivamente si osserva una progressiva riduzione della percentuale di cellule CAR-T, nonostante un lieve aumento al giorno 11, fino a raggiungere valori molto bassi ai giorni 28 e 90. Le ampie barre di errore evidenziano una marcata variabilità tra i pazienti, soprattutto durante la fase di espansione.

La sottopopolazione CAR-T CD4+ *naïve* (CD4+CD45RA+), rappresenta una quota limitata delle CAR-T CD4+ durante tutto il *follow-up*. I valori rimangono generalmente bassi, con due modesti aumenti al giorno 2 (mediana 7; min 0, max 31) e al giorno 21

(mediana 10; min 2, max 15), seguiti da una rapida diminuzione fino a diventare non rilevabili ai giorni 28 e 90. (Dati non mostrati)

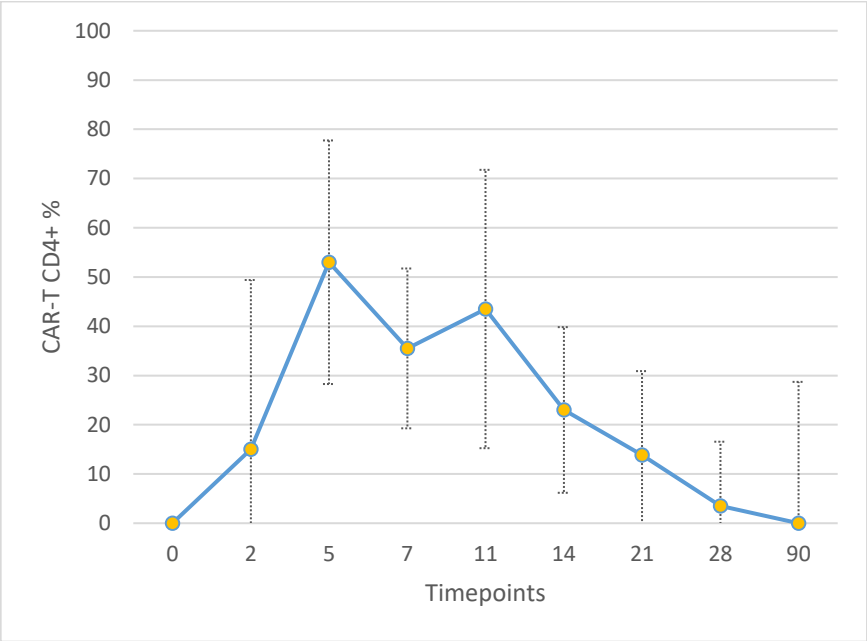


Figura 12. CAR-T CD4+%

Il grafico mostrato nella figura 13 evidenzia una progressiva espansione delle cellule CAR-T CD8+ dopo l'infusione, con un incremento marcato fino al giorno 7 (mediana 61; min 47, max 74). Dopo una lieve flessione al giorno 11, la quota di cellule CAR-T CD8+ aumenta nuovamente, raggiungendo il valore massimo al giorno 21 (mediana 75; min 58, max 88). Successivamente si osserva una riduzione progressiva, con un calo più pronunciato tra il giorno 28 e il giorno 90, quando le cellule CAR-T non risultano più rilevabili.

Per quanto riguarda la popolazione CAR-T CD8+ *naïve* (CD8+CD45RA+), è caratterizzata da una cinetica diversa rispetto alla popolazione CAR-T CD8+ totale. Le

cellule CD8+CD45RA+ presentano una prima espansione precoce al quinto giorno (mediana 26; min 9, max 63), seguita da una riduzione all'undicesimo giorno e da un secondo incremento che raggiunge il valore massimo al giorno 21 (mediana 55; min 28, max 73). Successivamente si osserva una progressiva diminuzione fino alla completa scomparsa al giorno 90. (Dati non mostrati)

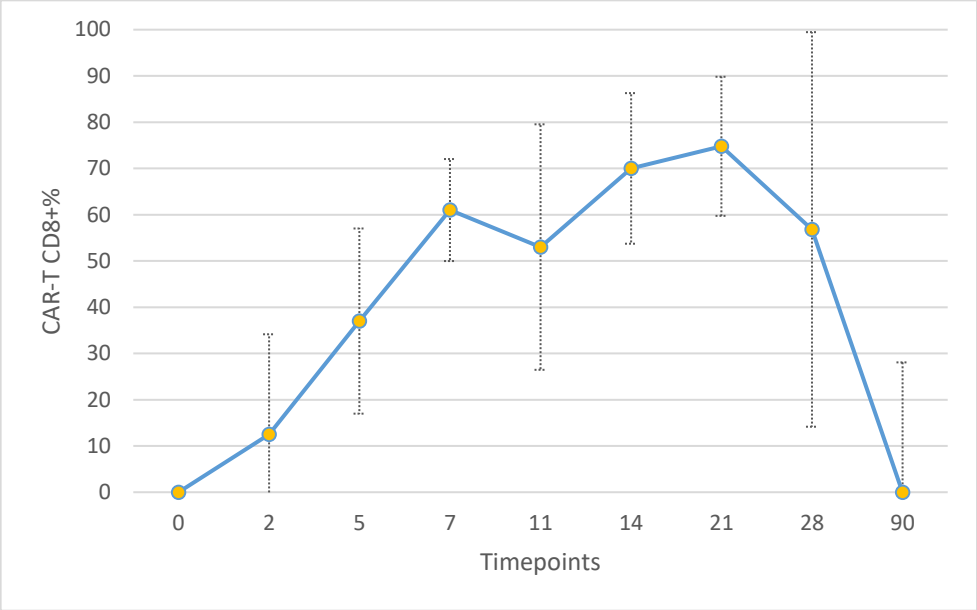


Figura 13. CAR-T CD8+%

La figura 14 mostra una presenza limitata di cellule CAR-T CD56+ durante tutto il periodo di monitoraggio. Dopo un iniziale aumento nei primi giorni, la percentuale raggiunge il valore massimo al giorno 14 (mediana 7; min 2, max 13), per poi diminuire progressivamente fino ad azzerarsi al giorno 90. Le barre di errore evidenziano una notevole variabilità tra i pazienti, soprattutto nei *timepoints* intermedi.

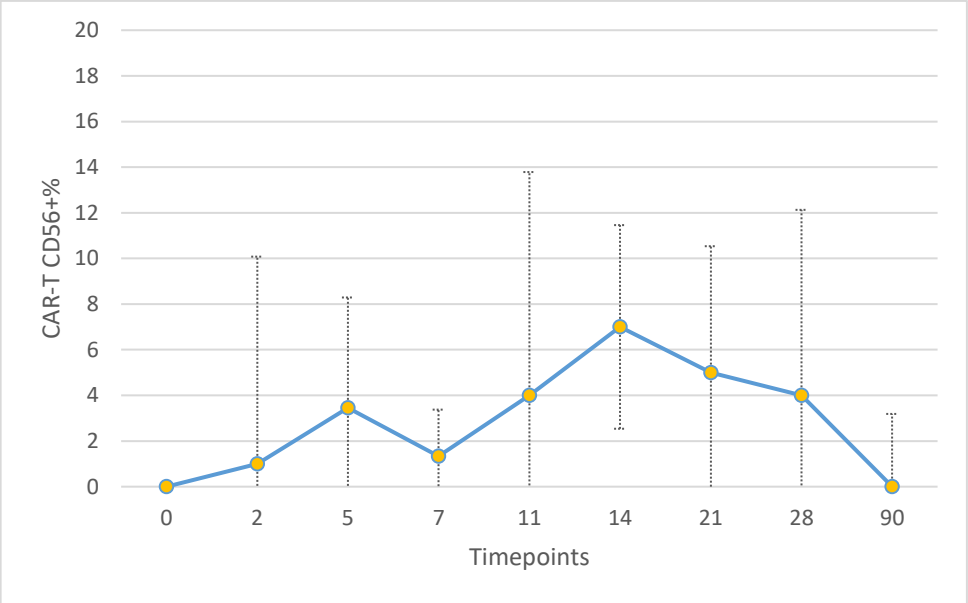


Figura 14. CAR-T CD56+%

4.2 Immunoricostituzione

La figura 15 mostra il grafico dell'andamento mediano delle sottopopolazioni linfocitarie durante i primi 90 giorni successivi all'infusione di CAR-T. Nel complesso la popolazione dei linfociti T (CD3+) aumenta fino all'88% al giorno 28, superando il limite superiore del *range* fisiologico (65-84%), per poi ridursi al 77% al giorno 90, rientrando nei valori di normalità. Si nota una predominanza del compartimento T citotossico (CD3+CD8+) la cui percentuale aumenta dal 50% al *baseline* al 70% al giorno 28 e si mantiene elevata al giorno 90 (55%), risultando costantemente superiore ai valori di riferimento della popolazione normale (20-39%).

Al contrario, i linfociti T helper (CD3+CD4+) mostrano una marcata riduzione dopo il trattamento, passando dal 45% al *baseline* al 16% al giorno 28, con un recupero solo parziale al giorno 90 (21%). Nonostante tale incremento, i valori rimangono inferiori al *range* di normalità (36-55%), indicando una ricostituzione più lenta di questa sottopopolazione.

Le cellule NK (CD3−CD56+) si mantengono sostanzialmente stabili tra il 5% e il 7% durante tutto il *follow-up*, con valori prossimi al limite inferiore del *range* di normalità (6-18%). Anche la popolazione NKT (CD3+CD56+) non mostra variazioni rilevanti, mantenendosi stabile intorno al 3-4%.

Per quanto riguarda la popolazione dei linfociti B, si osserva una marcata deplezione durante tutto il periodo di *follow-up*: infatti, la mediana dei valori risulta pari a 0% in tutti i *timepoints* valutati, indicando l'assenza o una presenza estremamente ridotta di linfociti B nella maggior parte dei pazienti. (dati non mostrati)

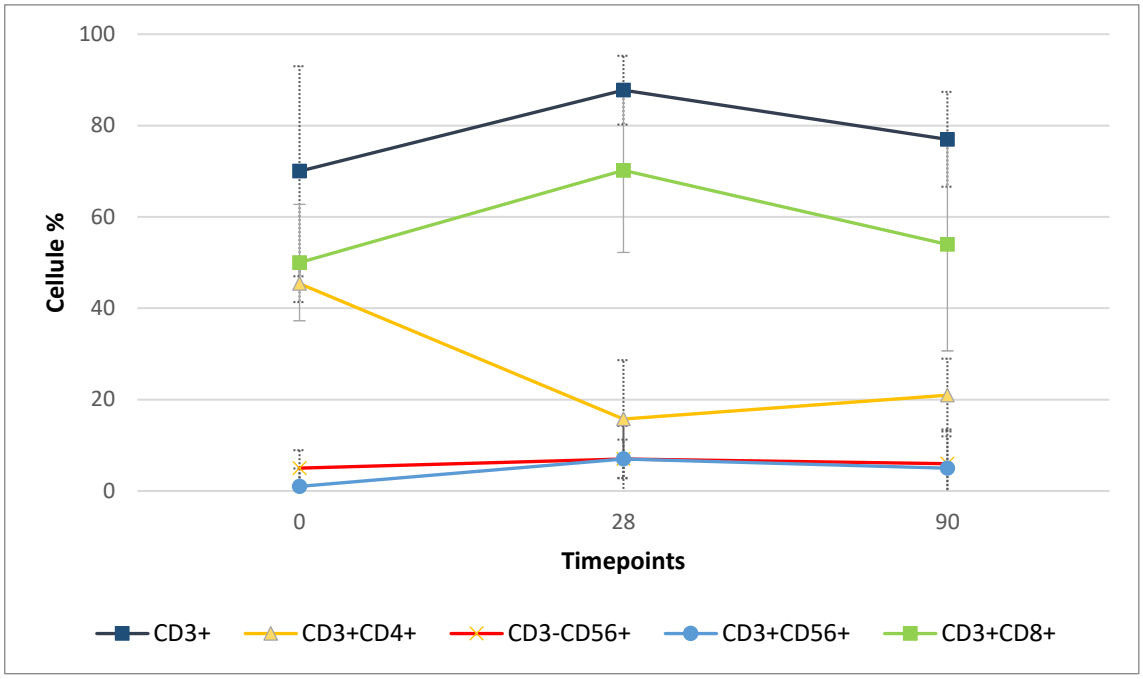


Figura 15. Andamento delle sottopopolazioni linfocitarie

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

La terapia con cellule CAR-T rappresenta una delle più importanti innovazioni nel trattamento delle neoplasie ematologiche recidivate o refrattarie.

Dopo l'infusione, le cellule CAR-T vanno incontro a una fase di espansione in vivo che rappresenta un parametro cruciale per il successo del trattamento, poiché è associata sia alla risposta clinica sia all'insorgenza delle principali tossicità associate, tra cui la sindrome da rilascio di citochine (CRS) e la sindrome da neurotossicità associata alle cellule effettrici immunitarie (ICANS). [25].

Parallelamente all'attività antitumorale, la terapia determina una marcata alterazione del sistema immunitario. Tale condizione è attribuibile sia alla chemioterapia somministrata prima dell'infusione, finalizzata a creare le condizioni favorevoli all'espansione delle cellule CAR-T, sia all'azione delle stesse cellule ingegnerizzate, che provocano una deplezione prolungata delle cellule B attraverso il riconoscimento dell'antigene CD19. [25]

La conseguente immunodeficienza può persistere per periodi prolungati ed è associata a un aumentato rischio di complicanze infettive e a un ritardo nel recupero delle normali funzioni immunitarie. [26 27]

In questo lavoro è stata valutata la cinetica delle cellule CAR-T e il processo di ricostituzione immunologica in una coorte di dieci pazienti trattati presso il nostro centro mediante analisi citofluorimetrica multiparametrica.

Nella nostra coorte, la cinetica delle cellule CAR-T è caratterizzata da una rapida espansione precoce tra il quinto e il settimo giorno post-infusione, con raggiungimento del picco massimo entro la prima settimana. Successivamente si verifica un progressivo calo della popolazione CAR-T fino a valori molto bassi o non rilevabili entro il novantesimo giorno. Questo andamento riflette la tipica dinamica biologica delle cellule

CAR-T, nelle quali una fase iniziale di intensa proliferazione è necessaria per esercitare l'attività antitumorale, seguita da una riduzione numerica una volta diminuito lo stimolo antigenico.

Un aspetto particolarmente evidente è la notevole variabilità interindividuale sia nell'entità dell'espansione sia nella persistenza delle CAR-T: questo aspetto è attribuibile a molteplici fattori, tra cui le caratteristiche biologiche della malattia, lo stato immunologico del paziente, le precedenti linee terapeutiche e la qualità del prodotto cellulare infuso. Sebbene la limitata numerosità del campione non consenta di trarre conclusioni definitive, tali osservazioni confermano come la risposta biologica alle terapie CAR-T sia fortemente individuale. [28 29]

L'analisi delle sottopopolazioni CAR-T ha evidenziato differenze significative tra le componenti CD4+ e CD8+.

Le cellule CAR-T CD4+ mostrano una rapida espansione con un picco intorno al quinto giorno e una successiva diminuzione graduale, mentre la sottopopolazione *naïve* CD45RA+ presenta un'espansione decisamente più contenuta e non segue il medesimo andamento cinetico. Questo suggerisce che le CAR-T *naïve* costituiscano una frazione minoritaria delle CAR-T CD4+ ed abbiano una limitata capacità di espansione e persistenza nel tempo.

Al contrario, la popolazione CAR-T CD8+ raggiunge livelli elevati più tardivamente e mantiene percentuali significative fino ai *time-point* più avanzati del *follow-up*.

La maggiore persistenza della componente CAR-T CD8+ osservata nella nostra coorte potrebbe essere compatibile con un contributo di questa popolazione al mantenimento dell’attività effettrice; tuttavia, tale interpretazione non può essere dimostrata sulla base della sola analisi fenotipica e richiede ulteriori studi funzionali. Particolarmente

interessante appare il comportamento delle cellule CAR-T CD8+ *naïve*, che mostrano una cinetica bifasica caratterizzata da una prima espansione precoce e da un successivo incremento intorno al ventunesimo giorno: questo incremento coincide temporalmente con quello delle CAR-T CD8+ totali, suggerendo un possibile contributo di questa sottopopolazione alla persistenza della risposta cellulare nelle fasi più avanzate del *follow-up*.

La popolazione CAR-T CD56+ risulta quantitativamente ridotta e non ha mostrato una significativa espansione nella nostra coorte.

Per quanto riguarda la ricostituzione immunologica, i risultati evidenziano una marcata alterazione dell'assetto linfocitario nei primi tre mesi successivi alla terapia. È stata osservata una predominanza del compartimento T citotossico associata a una persistente riduzione dei linfociti T *helper*, che rimangono ridotti rispetto ai valori di riferimento a distanza di novanta giorni. Tale dato è in linea con quanto riportato in letteratura, che descrive una lenta ricostituzione del compartimento CD4+ dopo terapia CAR-T. [30].

Nel complesso, i dati indicano che l'immunoricostituzione nei primi tre mesi dopo la terapia CAR-T è caratterizzata da un'espansione prevalente del compartimento CD8+, associata a una persistente riduzione dei CD4+ e a una sostanziale stabilità delle cellule NK. La conseguente inversione del rapporto CD4+/CD8+ è compatibile con una ricostituzione immunologica ancora incompleta nei primi 90 giorni. [31]

La persistente assenza dei linfociti B rappresenta un importante indicatore farmacodinamico indiretto dell'attività biologica delle cellule CAR-T anti-CD19, in quanto riflette il riconoscimento e la conseguente deplezione delle cellule B CD19+. Al

tempo stesso, tale fenomeno contribuisce alla compromissione dell'immunità umorale e può aumentare il rischio di infezioni. [32]

Tra i limiti principali dello studio devono essere considerati il numero ridotto di pazienti, l'eterogeneità clinica della popolazione e la breve durata del *follow-up*. Inoltre, la valutazione della persistenza delle CAR-T è stata effettuata esclusivamente mediante citofluorimetria, senza integrazione con metodiche molecolari come qPCR o digital PCR, che potrebbero consentire una maggiore sensibilità nella rilevazione delle cellule residue. Nonostante tali limitazioni, i dati ottenuti confermano l'elevata variabilità individuale della risposta biologica alle terapie CAR-T e sottolineano l'importanza di un monitoraggio laboratoristico accurato nel periodo post-infusione.

In questo contesto, la citofluorimetria multiparametrica si conferma una metodica affidabile e versatile, capace di fornire informazioni essenziali sulla persistenza delle cellule CAR-T e sull'andamento delle altre popolazioni linfocitarie ottenendo informazioni utili sulla risposta biologica al trattamento e sul processo di immunoricostituzione.

Future casistiche più ampie, caratterizzate da *follow-up* più prolungati e dall'integrazione di analisi citofluorimetriche, molecolari e funzionali, saranno necessarie per chiarire il significato prognostico delle diverse sottopopolazioni CAR-T e per identificare biomarcatori immunofenotipici associati alla risposta clinica, alla tossicità e alla persistenza a lungo termine della terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Peng Y, Zhan L, Shi J, et al. Immune Surveillance and Immune Escape in Cancer: Mechanisms and Immunotherapy. *MedComm (2020)* 2025;6(10):e70321. doi: 10.1002/mco2.70321 [published Online First: 2025/10/13]

2. Pitoiset F, Cassard L, El Soufi K, et al. Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses. *Cytometry A* 2018;93(8):793-802. doi: 10.1002/cyto.a.23570 [published Online First: 2018/09/01]

3. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;14(1):24-35. doi: 10.1038/nri3567 [published Online First: 2013/12/18]

4. Eshhar Z, Waks T, Gross G, et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(2):720-4. doi: 10.1073/pnas.90.2.720 [published Online First: 1993/01/15]

5. Skorka K, Ostapinska K, Malesa A, et al. The Application of CAR-T Cells in Haematological Malignancies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2020;68(6):34. doi: 10.1007/s00005-020-00599-x [published Online First: 2020/11/07]

6. Vishwasrao P, Li G, Boucher JC, et al. Emerging CAR T Cell Strategies for the Treatment of AML. *Cancers (Basel)* 2022;14(5) doi: 10.3390/cancers14051241 [published Online First: 2022/03/11]

7. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, et al. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol* 2018;53:164-81. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.025 [published Online First: 2018/02/21]

8. Hernandez-Idarraga KJ, Arias-Rozo AJ, Arango-Rodriguez ML, et al. CAR T-cells in hematologic malignancies: Advances, challenges, and future directions. *iScience* 2026;29(4):115213. doi: 10.1016/j.isci.2026.115213 [published Online First: 2026/04/06]

9. Tang W, Yu S. Potential of small-molecule targeted drugs in combination with CAR-T cell therapy for hematologic lymphomas. *Front Immunol* 2026;17:1792910. doi: 10.3389/fimmu.2026.1792910 [published Online First: 2026/04/17]

10. Chong EA, Tomasulo EB, Barta SK. 2026 Update on the Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Hematol* 2026;101(4):832-63. doi: 10.1002/ajh.70229 [published Online First: 2026/02/08]

11. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2020;395(10230):1146-62. doi: 10.1016/S0140-6736(19)33018-1 [published Online First: 2020/04/06]

12. Monfrini C, Stella F, Aragona V, et al. Phenotypic Composition of Commercial Anti-CD19 CAR T Cells Affects In Vivo Expansion and Disease Response in Patients with Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2022;28(15):3378-86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-0164 [published Online First: 2022/05/19]

13. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2016;8(3) doi: 10.3390/cancers8030036 [published Online First: 2016/03/22]

14. Wudhikarn K, Perales MA. Infectious complications, immune reconstitution, and infection prophylaxis after CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Bone Marrow Transplant* 2022;57(10):1477-88. doi: 10.1038/s41409-022-01756-w [published Online First: 2022/07/16]

15. Cappell KM, Kochenderfer JN. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nat Rev Clin Oncol* 2023;20(6):359-71. doi: 10.1038/s41571-023-00754-1 [published Online First: 2023/04/14]

16. Ling J, Wang W, Wang SA. Flow cytometry-based monitoring of chimeric antigen receptor (CAR) T cells: Reagent selection, assay design, and clinical utility. *Cytometry B Clin Cytom* 2026 doi: 10.1002/cyto.b.70026 [published Online First: 2026/03/23]

17. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019;25(4):625-38. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.12.758 [published Online First: 2018/12/29]

18. Frey N, Porter D. Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019;25(4):e123-e27. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.12.756 [published Online First: 2018/12/27]

19. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, et al. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2022;22(2):85-96. doi: 10.1038/s41577-021-00547-6 [published Online First: 2021/05/19]

20. Santomasso BD, Nastoupil LJ, Adkins S, et al. Management of Immune-Related Adverse Events in Patients Treated With Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: ASCO Guideline. *J Clin Oncol* 2021;39(35):3978-92. doi: 10.1200/JCO.21.01992 [published Online First: 2021/11/02]

21. Strati P, Ahmed S, Kebriaei P, et al. Clinical efficacy of anakinra to mitigate CAR T-cell therapy-associated toxicity in large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 2020;4(13):3123-27. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002328 [published Online First: 2020/07/10]

22. Danish H, Santomasso BD. Neurotoxicity Biology and Management. *Cancer J* 2021;27(2):126-33. doi: 10.1097/PPO.0000000000000507 [published Online First: 2021/03/23]

23. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, et al. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 2012;64(2):109-30. doi: 10.1007/s10616-011-9415-0 [published Online First: 2012/01/25]

24. O'Donnell EA, Ernst DN, Hingorani R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune Netw* 2013;13(2):43-54. doi: 10.4110/in.2013.13.2.43 [published Online First: 2013/05/24]

25. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, et al. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Mol Ther* 2017;25(1):285-95. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.10.020 [published Online First: 2017/01/28]

26. Logue JM, Zucchetti E, Bachmeier CA, et al. Immune reconstitution and associated infections following axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2021;106(4):978-86. doi: 10.3324/haematol.2019.238634 [published Online First: 2020/04/25]

27. Cordas Dos Santos DM, Tix T, Shouval R, et al. A systematic review and meta-analysis of nonrelapse mortality after CAR T cell therapy. *Nat Med* 2024;30(9):2667-78. doi: 10.1038/s41591-024-03084-6 [published Online First: 2024/07/09]

28. Mueller KP, Grenier JM, Weber EW. CAR T cell persistence in cancer. *Trends Cancer* 2025;11(10):1005-18. doi: 10.1016/j.trecan.2025.08.014 [published Online First: 2025/09/20]

29. Wolyncewicz G, Wayte R, Abadir E. Current Insights of Post-Infusion CAR T Expansion and Persistence for Large B-Cell Lymphoma. *Cancers (Basel)* 2025;17(19) doi: 10.3390/cancers17193167 [published Online First: 2025/10/16]

30. Airosa Pardal A, Benzaquen A, Granados P, et al. Patterns of immune recovery after axicabtagene ciloleucel for aggressive B-cell lymphoma. *Hemasphere* 2025;9(10):e70229. doi: 10.1002/hem3.70229 [published Online First: 2025/10/07]

31. Ke Y, Zhou F. Biomarkers for predicting CAR-T cell therapy outcomes in B-cell acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. *Front Immunol* 2025;16:1656108. doi: 10.3389/fimmu.2025.1656108 [published Online First: 2025/11/03]

32. Khalifeh M, Surapaneni M, Salman H. B Cell Aplasia Following CAR T Cell Therapy: Incidence, Kinetics, Prognostic Implications, and Clinical Management. *Cancers (Basel)* 2026;18(16) doi: 10.3390/cancers18162680 [published Online First: 2026/08/27]