

# APPLICAZIONE DEL MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO

Focus sulle patologie autoimmuni  
e prospettive di sviluppo

Con il patrocinio di



**ISCCA**  
Italian Society for  
Cytometric Cell Analysis



**Sin**  
SOCIETÀ ITALIANA DI NEUROLOGIA

**edra**



Copyright © 2021 by EDRA S.p.A.

EDRA S.p.A.  
Via G. Spadolini 7  
20141 Milano, Italia  
Tel. 02 88184.1  
Fax 02 88184.302

I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica, di riproduzione e di adattamento totale o parziale con qualsiasi mezzo, compresi i microfilm e le copie fotostatiche, sono riservati per tutti i Paesi.

Chief Business & Content Officer: Ludovico Baldessin

Responsabile Editoriale: Susanna Garofalo

Pubblicazione realizzata con il contributo incondizionato di Becton Dickinson Italia S.p.A.

Edizione riservata per i Sig. Medici

Fuori commercio

La medicina è una scienza in perenne divenire. Nelle nozioni esposte in questo volume si riflette lo "stato dell'arte", come poteva essere delineato al momento della stesura in base ai dati desumibili dalla letteratura internazionale più autorevole. È soprattutto in materia di terapia che si determinano i mutamenti più rapidi: sia per l'avvento di farmaci e di procedimenti nuovi, sia per il modificarsi, in rapporto alle esperienze maturate, degli orientamenti sulle circostanze e sulle modalità d'impiego di quelli già in uso da tempo. Gli Autori, l'Editore e quanti altri hanno avuto una qualche parte nella stesura o nella pubblicazione del volume non possono essere ritenuti in ogni caso responsabili degli errori concettuali dipendenti dall'evolversi del pensiero clinico; e neppure di quelli materiali di stampa in cui possano essere incorsi, nonostante tutto l'impegno dedicato a evitarli. Il lettore che si appresti ad applicare qualcuna delle nozioni terapeutiche riportate deve dunque verificarne sempre l'attualità e l'esattezza, ricorrendo a fonti competenti e controllando direttamente sul riassunto delle caratteristiche del prodotto allegato ai singoli farmaci tutte le informazioni relative alle indicazioni cliniche, alle controindicazioni, agli effetti collaterali e specialmente alla posologia.

Finito di stampare nel mese di Settembre 2021 presso Jona s.r.l. – Paderno Dugnano (MI)

# APPLICAZIONE DEL MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO

Focus sulle patologie autoimmuni  
e prospettive di sviluppo



# Autori

## **Bruno Brando**

Immunoematologia e Centro Trasfusionale  
ASST Ovest Milanese  
Legnano

## **Marco Capobianco**

Struttura Complessa di Neurologia  
Ospedale San Luigi  
Orbassano

## **Angelo De Cata**

Unità Operativa Dipartimentale di Reumatologia  
IRCCS Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza  
San Giovanni Rotondo

## **Carlo Guastoni**

Unità Operativa Complessa Nefrologia e Dialisi  
ASST Ovest Milanese  
Legnano

## **Martino Intronà**

Unità di Terapie Cellulari G. Lanzani  
ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo



# Sommario

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Premessa</b>   | <b>7</b>  |
| <b>1. L'immunoterapia: una nuova era</b>  | <b>9</b>  |
| 1.1 Cenni di immunoterapia.....   | 9         |
| 1.2 Focus su CAR-T, la più rivoluzionaria fra le terapie immunologiche.....                                   | 11        |
| 1.3 Anticorpi monoclonali (mAb) come strategia terapeutica<br>e successive evoluzioni nel loro utilizzo ..... | 12        |
| 1.4 Ampliamento dell'uso delle terapie anti-linfociti B<br>alle patologie autoimmuni .....                    | 13        |
| <b>2. Il monitoraggio immunologico</b>  | <b>15</b> |
| 2.1 Principi alla base del monitoraggio immunologico .....  | 15        |
| 2.2 Protocollo di monitoraggio immunologico .....   | 18        |
| 2.3 Campi specifici di applicazione.....  | 19        |
| <b>3. Le malattie autoimmuni</b>  | <b>23</b> |
| 3.1 Generalità .....  | 23        |
| 3.2 L'immunoterapia nelle malattie autoimmuni .....   | 23        |
| <b>4. Focus sulle malattie autoimmuni in ematologia,<br/>nefrologia, neurologia e reumatologia</b>            | <b>25</b> |
| 4.1 Utilizzo di anticorpi monoclonali in ematologia .....   | 25        |
| 4.2 Utilizzo di anticorpi monoclonali in nefrologia .....   | 26        |
| 4.3 Utilizzo di anticorpi monoclonali in neurologia .....   | 27        |
| 4.4 Utilizzo di anticorpi monoclonali in reumatologia.....  | 29        |
| <b>Conclusioni</b>  | <b>35</b> |
| <b>Appendice - Immunoterapia con cellule CAR-T</b>  | <b>37</b> |
| <b>Bibliografia</b>   | <b>41</b> |



## Premessa

Il presente documento è dedicato agli specialisti che trattano patologie autoimmuni nei settori *reumatologico, neurologico, ematologico e nefrologico* e ha lo scopo di delineare lo scenario relativo all'uso delle terapie immunologiche e del loro monitoraggio nelle aree suddette configurandosi come aggiornamento professionale supportato dalla più recente letteratura internazionale.

L'uso di farmaci biologici ha come caratteristica di base quella di coinvolgere il sistema immunitario del paziente nella risposta alla malattia, rendendo rilevante il valore del follow-up dei pazienti in trattamento. A tal proposito, la pratica della **tipizzazione immunologica con metodo citofluorimetrico**, presentando un ampio potenziale di utilizzo per la diagnosi e il follow-up delle patologie in oggetto, può fornire indicazioni utili che esitino in raccomandazioni pratiche sul suo stesso impiego nella buona pratica clinica.

Riteniamo pertanto che tali tematiche, meno note rispetto alla immunoterapia nel settore oncologico, possano essere d'interesse e di supporto per i clinici al fine di approfondire le proprie conoscenze sugli sviluppi delle metodologie per la tipizzazione immunologica.

I contenuti sono organizzati nel seguente modo:

- **Prima parte** dedicata allo scenario di riferimento della terapia immunologica nel contesto generale, partendo dal settore oncologico, fino ad arrivare a cenni sulle patologie autoimmuni in area reumatologica, neurologica, ematologica e nefrologica.
- **Seconda parte** focalizzata sui principi di base per il monitoraggio immunologico con descrizione del rationale alla base della somministrazione delle terapie immunomodulanti, arrivando a definire un modello di tipizzazione immunologica comune a tutte le patologie in esame con descrizione della citofluorimetria quale tecnica di laboratorio di elezione. Verranno inoltre indicati schemi di monitoraggio da impiegare per lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie B e T oggetto di valutazione.
- **Terza parte** che si occuperà delle malattie autoimmuni in area reumatologica, neurologica, ematologica e nefrologica, per ognuna delle quali verranno inseriti cenni sul ruolo del monitoraggio immunologico, con indicazioni pratiche per la sua attuazione.
- **Quarta parte** con conclusioni e *key point* orientativi.



# 1. L'immunoterapia: una nuova era

## 1.1 Cenni di immunoterapia

### Box di orientamento. Sistema immunitario

Il sistema immunitario è un organo molto complesso e dinamico, interconnesso e non compartimentale, sempre attivo e alla continua ricerca dell'equilibrio fra i vari circuiti in un'alternanza di attivazione/inibizione. Se tale equilibrio si rompe si verifica un quadro di disgregazione immunitaria che può portare a numerose patologie. Ricerche recenti attribuiscono al sistema immunitario un ruolo complesso volto a orchestrare finemente le molteplici interazioni che contribuiscono a combattere numerosi eventi patologici, dai fenomeni infiammatori all'autoimmunità, dai tumori alle malattie infettive.

### Panoramica del Sistema Immunitario

Sito infiammatorio

Luogo di ingaggio:

- Macrofagi (fagocitosi)
- CTC (citotossicità)
- Citochine (TNF $\alpha$ )
- NK (ADCC)
- Plasmociti (anticorpi)

Organi linfoidi secondari

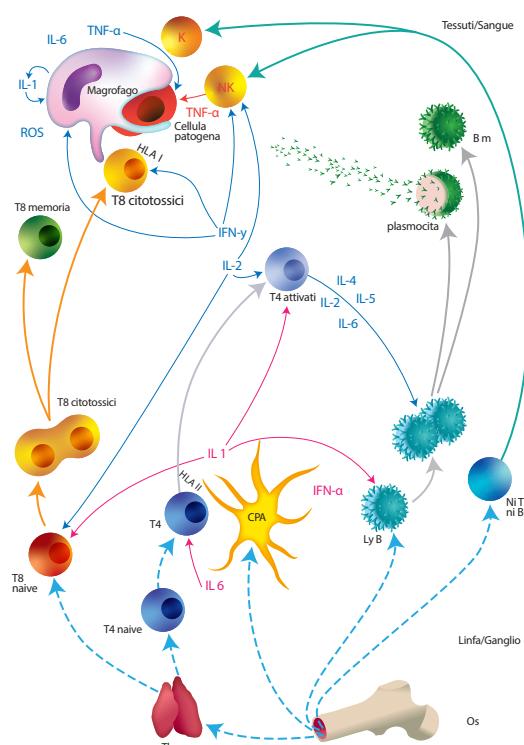
Luoghi di:

- Presentazione antigenica tra APC e linfociti T CD4+, CD8+
- Espansione clonale

Organi linfoidi primari

Luoghi di:

- Produzione delle cellule immunocompetenti



Fonte: Institut Français de Micro-immunothérapie

L'**immunoterapia** rappresenta un rivoluzionario approccio di trattamento che ha trovato principale e iniziale applicazione nelle patologie oncologiche e che comprende strategie differenti, accomunate dalla capacità di attivare e indirizzare il sistema immunitario del paziente contro la cellula tumorale.<sup>1</sup> Sono centinaia gli studi clinici che hanno confermato la sicurezza e l'efficacia delle immunoterapie, nonché delle combinazioni di immunoterapia e terapie antitumorali tradizionali.

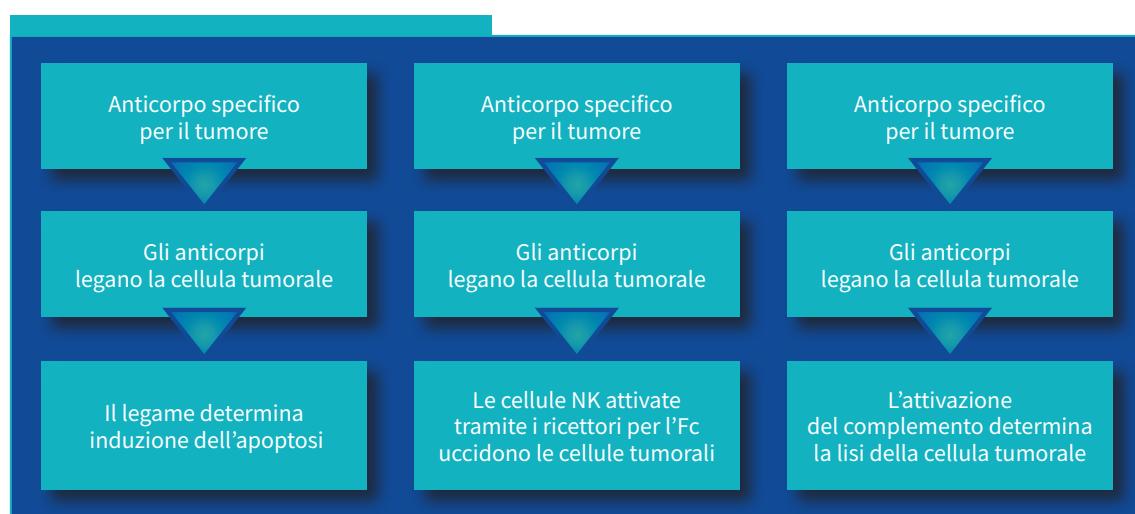
Attualmente, quattro approcci terapeutici basati sulla modulazione del sistema immunitario (immunoterapia attiva) sono stati approvati per l'impiego clinico.

Il primo si basa sulle terapie con **anticorpi monoclonali (mAb)**, e successive evoluzioni (anticorpi accompagnati a chemioterapici o radioterapici) che rappresentano una delle prime forme di strategia terapeutica immunologica per le quali sia stato dimostrato un effettivo beneficio clinico per i pazienti adulti e pediatrici. Queste molecole agiscono riconoscendo l'antigene target identificato sulla cellula tumorale (**Figura 1 e 2**).

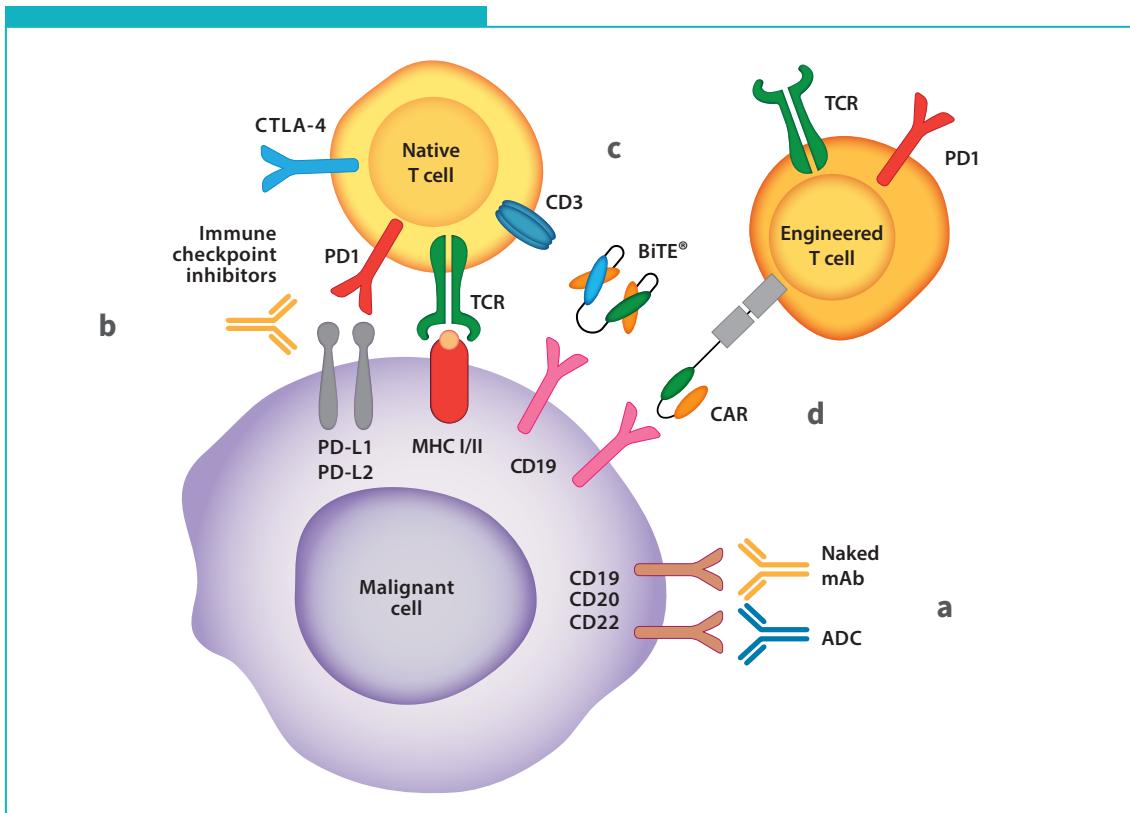
Il secondo approccio si basa sugli **anticorpi bi-specifici** o BiTE (*bispecific T-cell engagers*), come *blinatumomab* (anti-CD3/anti-CD19), che hanno una doppia specificità, legando simultaneamente 2 antigeni, uno dei quali presente sulla cellula effettrice del sistema immunitario, l'altro sulla cellula patologica target, creando così una sorta di sinapsi immunologica in grado di condurre alla distruzione la cellula neoplastica<sup>1</sup> (**Figura 2**).

Il terzo è rappresentato dagli *immune checkpoint inhibitors*, ovvero anticorpi monoclonali in grado di riattivare il sistema immunitario contro i tumori. I checkpoint sono molecole che si trovano sulla superficie dei linfociti T e su quella delle cellule target patologiche. Il legame fra i checkpoint inhibitor ed il loro ligando inibisce la risposta immunitaria.<sup>1,2</sup> L'idea di fondo è stata quella di mettere a punto farmaci in grado di inibire i checkpoint – il più utilizzato è un anticorpo anti-PD1 (*programmed cell death 1*) – in modo da permettere ai linfociti T di riconoscere e attaccare le cellule tumorali. Si tratta della scoperta che ha valso il premio Nobel per la medicina nel 2018 a James P. Allison e Tasuku Honjo.

Il quarto approccio si avvale di cellule ingegnerizzate chiamate *chimeric antigen receptor T cells (CART)*.<sup>1</sup>



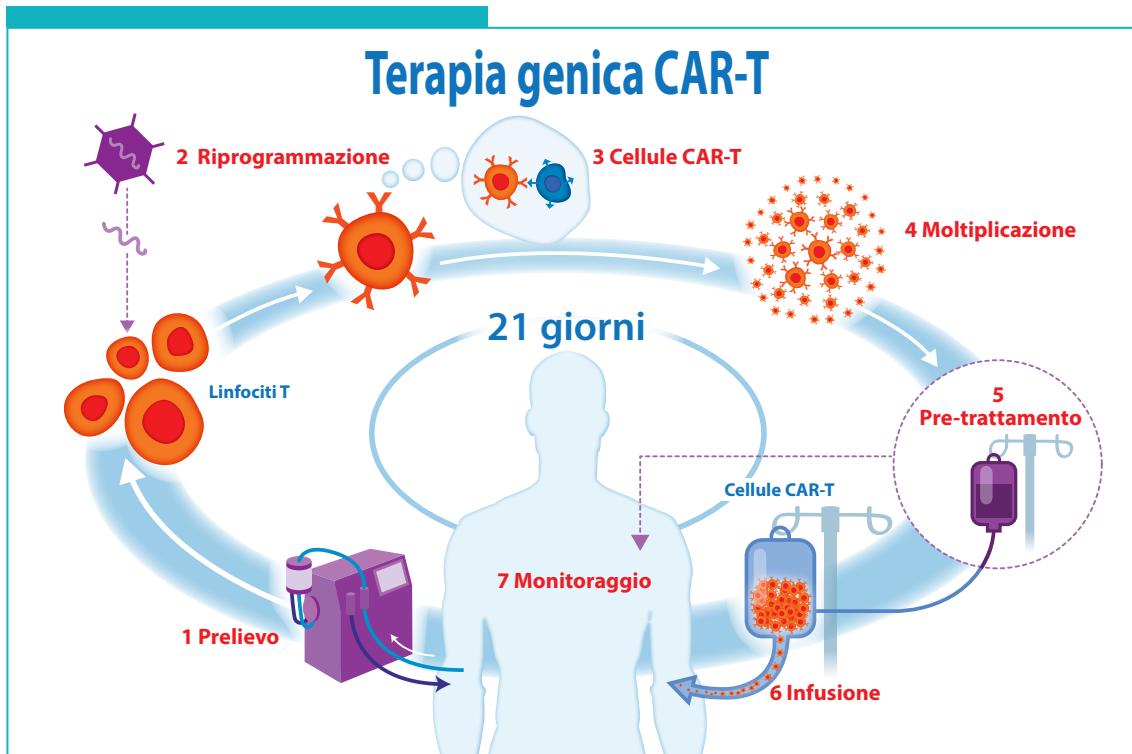
**Figura 1. Alcuni meccanismi con i quali agiscono gli anticorpi monoclonali impiegati in oncologia. Adattata da Foltz et al., Circulation 2013;127(22):2222-30.**



**Figura 2. Principali meccanismi d'azione dell'immunoterapia.** a. Anticorpo monoclonale coniugato a tossine o radionuclidi; b. anticorpo monoclonale con attività di immune checkpoint inhibitor che blocca gli effetti dell'attivazione di PD-1 e CTLA-4; c. anticorpo bifunzionale BiTE® che fa da “ponte” tra la cellula tumorale che deve essere distrutta e i linfociti T che devono distruggerla attraverso il doppio legame con i due antigeni; d. linfociti T ingegnerizzati esprimenti CAR in grado di riconoscere molecole di superficie delle cellule tumorali. ADC, coniugati anticorpo-farmaco; BiTE, anticorpo bispecifico di coinvolgimento delle cellule T; CAR, recettore dell'antigene chimerico; CTLA-4, proteina 4 associata ai linfociti T citotossici; mAb, anticorpo monoclonale; MHC, complesso maggiore di istocompatibilità; PD-1, proteina 1 della morte cellulare programmata; PD-L1, ligando 1 della morte cellulare programmata; TAA, antigeni tumore-associati. TCR, recettore per l'antigene delle cellule T. Adattata da Batlevi et al., Nat Rev Clin Oncol 2016;13(1):25-40.

## 1.2 Focus su CAR-T, la più rivoluzionaria fra le terapie immunologiche

Le CAR-T sono terapie a base di linfociti T esprimenti un recettore chimerico per l'antigene bersaglio e rappresentano una nuova forma di immunoterapia personalizzata contro il cancro che agisce direttamente sul sistema immunitario del paziente per renderlo in grado di riconoscere e distruggere le cellule tumorali. Le CAR-T utilizzano specifiche cellule immunitarie (linfociti T), che vengono estratte dal sangue del paziente, modificate geneticamente e coltivate in laboratorio (“ingegnerizzate”) per essere poi re-infuse nel paziente per potenziare la risposta del suo sistema immunitario contro la malattia. Dopo l’infusione, il paziente rimane ricoverato per alcuni giorni, costantemente monitorato per eventuali reazioni avverse al trattamento. (Figura 3)<sup>3</sup>.



**Figura 3. L'immunoterapia con cellule CAR-T.** I linfociti non riconoscono le cellule tumorali perché sprovviste di recettori specifici per i loro antigeni. Vengono pertanto prelevati linfociti dal paziente (o da un donatore) e ingegnerizzati per esprimere i giusti recettori. I linfociti vengono reinfusi nel paziente e attaccano le cellule tumorali. Adattata da <https://www.aifa.gov.it/-/aifa-approva-la-riborsabilita-della-prima-terapia-car-t>

### 1.3 Anticorpi monoclonali (mAb) come strategia terapeutica e successive evoluzioni nel loro utilizzo

Uno dei primi mAb a essere introdotto e ad aver rivoluzionato la pratica clinica, oltre 20 anni fa, è **rituximab**, un anticorpo monoclonale diretto contro la molecola di superficie CD20 e approvato dalla FDA nel 1997 per il trattamento di neoplasie del sistema linfopoiético quali leucemie e linfomi a cellule B e più recentemente di alcune patologie autoimmuni. CD20 è una proteina espressa normalmente sulla superficie dei linfociti B. Il legame del farmaco alle cellule bersaglio provoca l'eliminazione di queste ultime, agendo in modo molto simile a quanto accade quando gli anticorpi dell'organismo interagiscono con batteri o virus. Per queste caratteristiche i farmaci quali rituximab sono nati e hanno trovato la loro principale applicazione nel trattamento delle neoplasie a carico dei linfociti B maturi, prevalentemente linfomi non Hodgkin causati dalla proliferazione incontrollata di un clone B-linfocitario patologico.

## 1.4 Ampliamento dell'uso delle terapie anti-linfociti B alle patologie autoimmuni

Considerando il meccanismo d'azione dei suddetti farmaci, nel corso degli ultimi anni si sono attivate numerose ricerche in campo immunologico al fine di testarne l'impiego anche in una serie di patologie legate alla presenza di **cloni B-linfocitari non neoplastici**, ma capaci di produrre anticorpi diretti contro antigeni dello stesso organismo (autoantigeni), fenomeno alla base delle manifestazioni di numerosi disordini definiti autoimmuni. I risultati di questi studi sono stati incoraggianti tanto che l'uso dei farmaci anti-CD20 ha ampliato le proprie indicazioni terapeutiche, approvate o in corso di sperimentazione, in caso di molteplici patologie autoimmuni.<sup>4</sup>



## 2. Il monitoraggio immunologico

Con **monitoraggio immunologico** si intende un insieme di analisi tese a:

- identificare biomarcatori immunologici prognostici, a valore predittivo, che correlino con l'andamento della patologia e con la risposta al trattamento;
- ricercare nuovi potenziali bersagli terapeutici;
- effettuare un'analisi dinamica del sistema immunitario prima, durante e dopo un trattamento;
- ottimizzare la frequenza di somministrazione e la dose di un farmaco;
- valutare vaccini immunoterapeutici.

Negli ultimi decenni le malattie autoimmuni sono state trattate con farmaci immunosoppressori principalmente attivi sulla risposta mediata da linfociti T.<sup>4</sup> Solo negli ultimi anni, con l'ampliarsi delle conoscenze dei meccanismi patogenetici dei disturbi autoimmuni e l'ampio sviluppo di nuovi anticorpi monoclonali terapeutici, **le terapie aenti come bersaglio i linfociti B sono emerse come nuova opzione per curare tali malattie.** In seguito al cambiamento dei target terapeutici, emerge sempre più la necessità di **indicatori di laboratorio** utili per l'uso razionale e il follow-up dei nuovi trattamenti biologici, data l'ampia variabilità delle risposte individuali, i risultati marcatamente differenti nelle diverse malattie e il ruolo controverso degli autoanticorpi patogeni come indicatori di attività della malattia.

Recentemente sono state sviluppate tecniche di tipizzazione immunologica basate sulla **citometria a flusso**, resasi necessaria e di notevole supporto per identificare ed enumerare i sottogruppi funzionali di linfociti B nel sangue periferico. Queste analisi possono essere usate per stabilire il grado e la persistenza di B-deplezione, la qualità della ricostituzione dei linfociti B sani anche in termini di timing, insieme con i parametri quantitativi altamente sensibili relativi alla conta assoluta delle singole sottopopolazioni che la citometria a flusso può produrre. Tali valori possono fornire informazioni di cut-off molto importanti per le successive decisioni terapeutiche.<sup>4</sup>

### 2.1 Principi alla base del monitoraggio immunologico

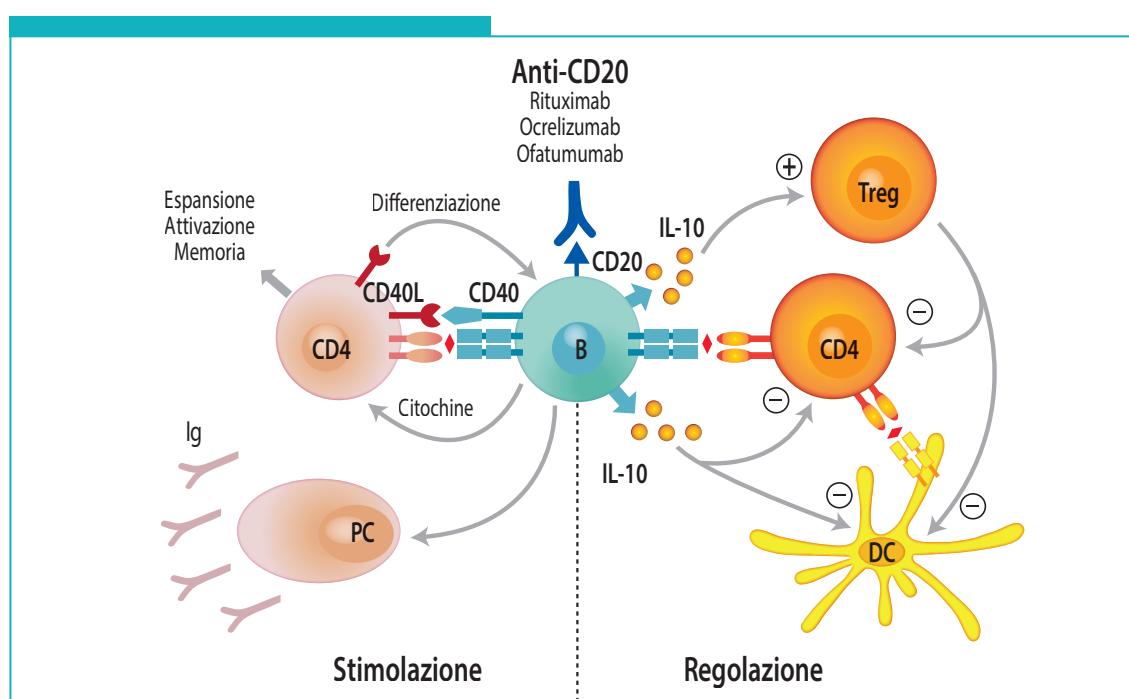
Abbiamo visto come attualmente gli mAb anti-CD20 siano largamente utilizzati nel trattamento di molte malattie autoimmuni. L'obiettivo delle terapie con mAb è limitare il danno nel tessuto bersaglio eliminando i linfociti B di memoria responsabili di una risposta immunitaria più rapida in caso di rinnovata esposizione allo stesso antigene e che sostengono la produzione

di autoanticorpi patogeni, risparmiando la riserva delle popolazioni dei precursori, le cellule B naïve e le plasmacellule.

L'azione immunosoppressoria non si limita alla riduzione della produzione di autoanticorpi patogeni, ma comporta effetti su molteplici funzioni sia stimolatorie sia regolatorie svolte dai linfociti B sui linfociti T e sulle cellule presentanti l'antigene, con un esito finale alquanto complesso e per certi aspetti non ancora chiarito (**Figura 4**).

Recentemente il razionale d'uso delle terapie anti-CD20 nel trattamento delle malattie autoimmuni, le loro caratteristiche e la necessità di sviluppo di uno schema di monitoraggio immunitario specifico sono stati rivisti. La massima efficacia clinica dei trattamenti anti-CD20 nei disturbi autoimmuni si ottiene quando la riserva dell'anticorpo patogeno è limitata ai linfociti B CD27+ di memoria e ai plasmablasti, che rappresentano le forme immature delle plasmacellule.

Dopo la profonda fase di deplezione B-linfocitaria indotta dai mAb anti-CD20, il ripopolamento dei linfociti B di memoria e dei plasmablasti è stato inizialmente considerato come correlato a un'imminente recidiva o a resistenza al trattamento. D'altra parte, una B-deplezione duratura dei linfociti B di memoria e il ripopolamento nel sangue periferico e negli organi linoidi secondari con linfociti B naïve sono stati interpretati come **segni di risposta clinica** in un ampio numero di disturbi autoimmuni, come ad esempio l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso, la sclerosi multipla, la neuromielite ottica, la glomerulonefrite e altre malattie autoimmuni, e rappresentano un evento desiderabile per il pieno ripristino della competenza immunologica del paziente con elementi almeno inizialmente privi di memoria potenzialmente lesiva verso autoantigeni.



**Figura 4.** La deplezione dei linfociti B mediante anticorpi monoclonali anti-CD20, come rituximab, non determina solo una soppressione della produzione di immunoglobuline (Ig), ma anche la riduzione di alcune azioni svolte dai linfociti B sui linfociti T e sulle cellule dendritiche, con meccanismi contrapposti. Adattata da Gallo, AboutOpen 2015;1(1):10-7.

Inoltre, la grande complessità fenotipica e funzionale dei linfociti B non è stata sempre affrontata in modo approfondito mediante le strategie di monitoraggio finora proposte in letteratura, in cui probabilmente mancano alcune informazioni importanti. La tradizionale identificazione dei linfociti B di memoria mediante la sola co-espressione CD19+ CD27+ può essere notevolmente migliorata mediante un approfondimento della tipizzazione, aggiungendo lo studio dell'espressione delle immunoglobuline di superficie (slg), che suddivide ulteriormente i linfociti B di memoria in subset slgM+ o slgG+ con funzione diversa e probabilmente differente ruolo patogeno nell'autoimmunità.

In ogni malattia autoimmune sono stati riscontrati diversi gradi di sensibilità ai farmaci anti-CD20, a causa dei meccanismi infiammatori o immunologici specifici della patologia. È noto inoltre che pazienti con la stessa patologia possono mostrare un'ampia variabilità individuale per quanto riguarda la durata della fase di B-deplezione e la necessità di cicli terapeutici ripetuti. Le diverse caratteristiche della malattia, i trattamenti precedenti e lo stato del sistema immunitario del paziente hanno un enorme impatto sulla capacità del paziente stesso di rispondere a una terapia.

**Capire come diversi trattamenti impattano sulla risposta  
del sistema immunitario e contro la patologia  
è la base per l'ottimizzazione e la personalizzazione dei regimi terapeutici**

Il medico usualmente considera la risposta clinica del paziente come la guida nei protocolli terapeutici in assenza di indicatori biologici affidabili. Tuttavia l'enorme variabilità che caratterizza le malattie autoimmuni può essere tenuta meglio sotto controllo da un sistema di monitoraggio immunologico standardizzato, razionale e ampiamente applicabile, progettato per fornire informazioni sul meccanismo di azione degli anti-CD20. L'utilizzo dei mAb come strategia terapeutica fornisce l'opportunità unica di verificarne la correttezza del meccanismo d'azione e di monitorare la risposta biologica individuale.

Le tecniche per il monitoraggio immunologico, in particolare la **tipizzazione immunologica con tecnologia citofluorimetrica**, presentano un ampio potenziale di utilizzo per la diagnosi e il monitoraggio in diversi settori clinici, fra cui quello delle patologie autoimmuni in ambito reumatologico, ematologico, neurologico e nefrologico. Questo approccio può essere di importanza fondamentale nella gestione dell'ampia variabilità correlata al paziente e alla malattia, a supporto del criterio clinico della semplice valutazione della risposta convenzionale. Al momento purtroppo sono disponibili solo limitate evidenze su indicatori biologici affidabili a sostegno del follow-up di queste malattie che tendono a recidivare frequentemente.

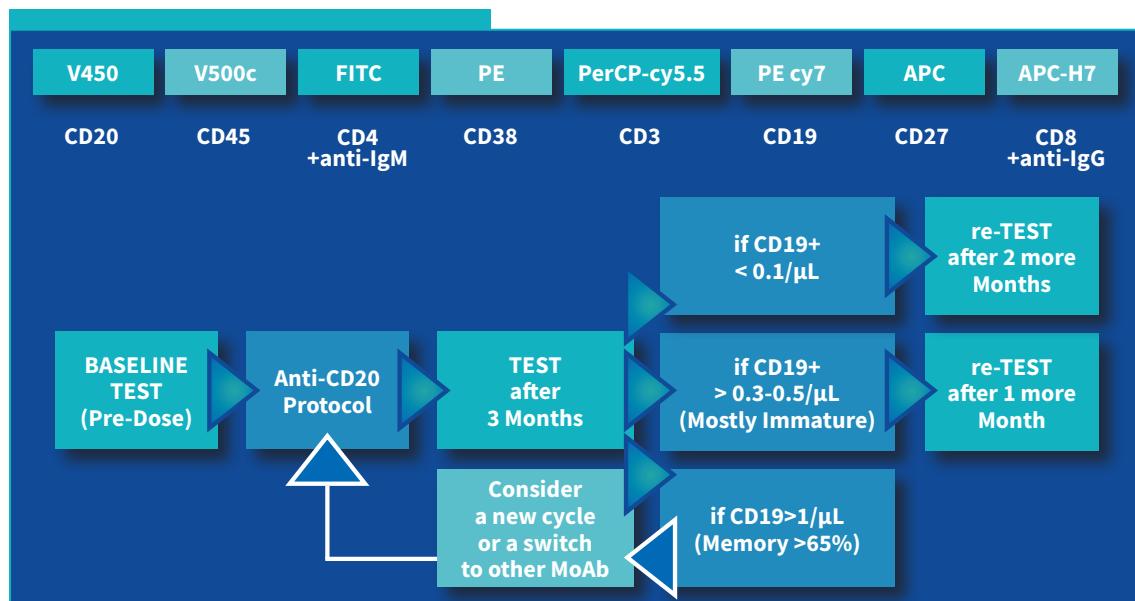
I primi tentativi di monitoraggio immunologico sono stati condizionati dalla bassa sensibilità dei protocolli di citometria a flusso utilizzati in passato e da una certa confusione negli indicatori e negli obiettivi. Le raccomandazioni in Gazzetta Ufficiale<sup>5</sup> per la neuromielite ottica, ad esempio, sottolineano come il target terapeutico sia rappresentato dall'abbassamento dei livelli circolanti dei linfociti B di memoria sotto lo 0,1% e lo 0,05% rispetto alle cellule mononucleate totali, il che può creare problemi metodologici a livello di laboratorio.

## 2.2 Protocollo di monitoraggio immunologico

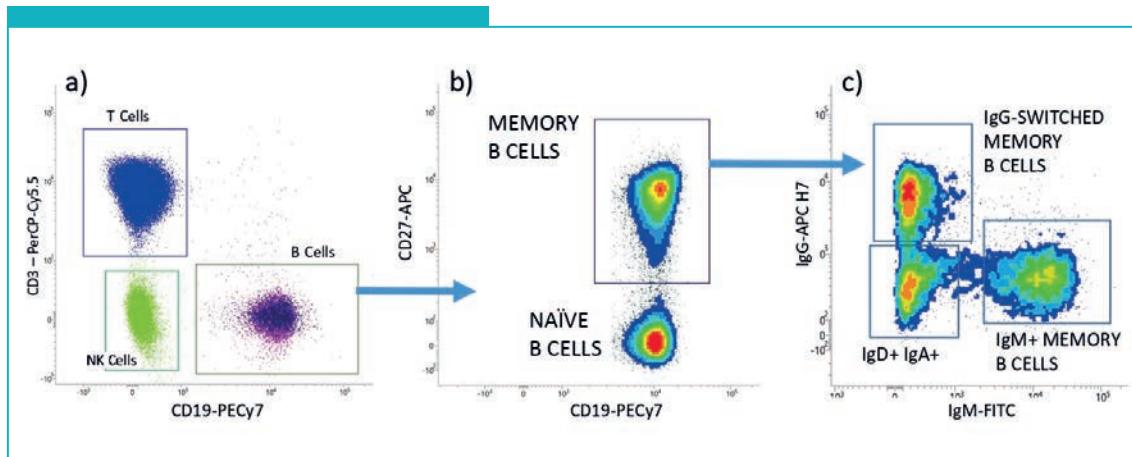
La disponibilità di un protocollo di monitoraggio immunologico standardizzato per rilevare deviazioni dalla risposta attesa e il ripopolamento di gruppi cellulari favorevoli o altamente patogeni può aiutare il clinico nella prevenzione dell'immunosoppressione sia insufficiente sia eccessiva. Sembra ragionevole che l'uso di questo approccio sia un utile ausilio per definire la modalità di terapia più appropriata per supplementare l'informazione limitata e soggettiva legata alla risposta clinica. Un esempio di protocollo per il monitoraggio ad alta risoluzione dei subset di linfociti B nel sangue periferico nei pazienti trattati con anticorpi monoclonali anti-CD20, che identifica i linfociti B naïve correlati all'efficacia di risposta e quelli di memoria correlati alla resistenza, è riportato nella **Figura 5**.

Di recente l'Italian Society for Clinical Cell Analysis (ISCCA) ha sviluppato un protocollo citofluorimetrico ad alta risoluzione, standardizzato con un pannello immunofenotipico a 8 colori e 10 marcatori, da applicare nel follow-up clinico di pazienti con malattie autoimmuni trattati con anticorpi anti-CD20, allo scopo di identificare ed enumerare in maniera accurata i maggiori subset dei linfociti B funzionalmente rilevanti. Questo protocollo immunologico è stato studiato per fornire un supporto analitico di laboratorio nel processo decisionale clinico nel trattamento di malattie autoimmuni trattate con i farmaci anti-CD20 (**Figura 6**).<sup>4</sup>

La citometria a flusso rappresenta la tecnologia di elezione per la valutazione e il monitoraggio di molte patologie, rivelandosi uno strumento di elevata efficacia grazie alla possibilità di quantificare e analizzare contemporaneamente decine di parametri biologici e funzionali in ogni singola cellula. Le nuove conoscenze sul comportamento biologico delle cellule infiammatorie e tumorali nei prossimi anni potrebbero avere un impatto molto significativo sugli



**Figura 5. Protocollo ISCCA per il monitoraggio ad alta risoluzione dei subset di linfociti B nel sangue periferico nei pazienti con patologie autoimmuni trattati con anticorpi monoclonali anti-CD20.**



**Figura 6.** Esempio di analisi basale di sottopopolazioni di linfociti B con il pannello immunofenotipico ISCCA a 8 colori e 10 marcatori. Adattata da Brando et al., Beyond Rheumatol 2019;1:26.

attuali criteri di stratificazione del rischio e di conseguente definizione di una terapia. Una strada che non va certo abbandonata. È auspicabile utilizzare tali procedure in futuri studi prospettici, per confermare la validità di questo approccio analitico.<sup>4</sup>

### 2.3 Campi specifici di applicazione

Il monitoraggio immunologico è un supporto alla valutazione del clinico per corroborare la *clinical response*. Può fornire indicazioni importanti relativamente alla risposta del paziente in trattamento con farmaci biologici, al possibile sviluppo di fenomeni di resistenza alla terapia in atto, allo sviluppo di fenomeni di tossicità per un loro contenimento, alla rivalutazione della strategia terapeutica allo scopo di considerare un possibile *switch* verso altre opzioni di trattamento e di sorvegliare l'eventuale insorgenza di fenomeni di eccessiva immunosoppressione. Vi sono però alcuni interrogativi aperti, ad esempio per quanto tempo proseguire la sorveglianza del paziente e con quale intervallo.

#### Reumatologia

- Il monitoraggio immunologico è una metodica di supporto nella gestione di patologie più note come l'artrite reumatoide o il lupus eritematoso sistemico (LES). Al momento trova meno spazio per patologie più rare, come l'arterite di Takayasu.
- Nei pazienti con artrite reumatoide il monitoraggio clinico e delle IgG sieriche, i cui bassi valori, a loro volta espressione della deplezione B-linfocitaria, correlano con il maggiore rischio infettivo, è determinante.
- Nei pazienti affetti da LES di entità severa o refrattari al trattamento, sottoposti a terapia con rituximab, il monitoraggio immunologico delle differenti forme cliniche potrebbe aiutare a comprendere la variabilità individuale che tuttora si osserva nonostante la buona e duratura risposta documentata in molti pazienti affetti.

- La vigilanza immunologica dei pazienti lupici sottoposti a trattamento con rituximab è anche richiesta per i rischi infettivi ascrivibili al periodo di massima deplezione B-linfocitaria farmaco-correlata, all'ipogammaglobulinemia ad esso correlata, oltre che al frequente contemporaneo uso di cortisonici e/o altri farmaci citotossici.
- Nei pazienti con vasculite idiopatica del sistema nervoso centrale resistenti al trattamento con rituximab, uno studio di monitoraggio immunologico su larga scala potrebbe creare i presupposti per interpretare tali resistenze cliniche.
- Nei pazienti affetti da miopatia infiammatoria idiopatica, un gruppo parzialmente eterogeneo di vasculiti, un adeguato monitoraggio immunologico, insieme alla conoscenza approfondita dei meccanismi patogenetici, potrebbe consentire di adeguare le scelte terapeutiche al singolo paziente o a specifici subset clinico-immunologici.

## **Nefrologia**

- Può la condizione nefrosica determinare un'eccessiva perdita urinaria dell'anticorpo monoclonale somministrato, riducendone l'efficacia clinica?
- Il monitoraggio immunologico può aiutare a comprendere la variabilità di risposta dei pazienti a una terapia biologica. Ad esempio, vi sono pazienti che non rispondono al trattamento con rituximab.
- Il monitoraggio immunologico rappresenta al momento uno strumento “raffinato” a supporto del clinico nella rivalutazione della strategia terapeutica: quando è opportuno proseguire con un determinato trattamento, con quale frequenza e quali dosaggi e quando invece è necessario sosporarlo oppure effettuare una modifica nel protocollo di cura.

## **Neurologia**

- Nel caso della neuromielite ottica trattata con rituximab, il monitoraggio immunologico può evidenziare un aumento dei linfociti B di memoria (CD19, CD27), correlato con un rischio di recidiva maggiore della malattia.
- In questo caso è opportuno procedere con un monitoraggio ogni due mesi (intervalli definiti secondo Linee Guida Gazzetta Ufficiale Determina n. 330/2018).
- Per la gestione della sclerosi multipla è fondamentale poter avere a disposizione marcatori biologici in grado di orientare il clinico nella gestione della terapia, in particolare per cambiare tempestivamente il trattamento se il paziente non ha una risposta adeguata.
- Al contrario, per la miastenia gravis non vi sono indicazioni specifiche sulle tempistiche più opportune per effettuare un follow-up immunologico.

## **Ematologia**

- Per le patologie autoimmuni in ambito ematologico, rituximab (così come altri mAb) è impiegato per il trattamento di diverse condizioni patologiche. Anche in questo contesto, poter monitorare adeguatamente e nel tempo i marcatori immunologici è fondamentale per verificare se e come il paziente risponde alla terapia e quindi per intervenire tempestivamente nella ridefinizione della strategia terapeutica.

- Importanti risultati sono stati ottenuti nel trattamento della porpora trombotica trombocitopenica e delle anemie emolitiche Coombs-positive sostenute da autoanticorpi IgG “caldi”.
- Nella porpora trombocitopenica idiopatica autoimmune il trattamento con rituximab può affiancare con successo le terapie con agonisti della trombopoietina nei casi refrattari.
- Evidenze positive sull'utilizzo di rituximab sono state ottenute anche nelle più rare ma gravi condizioni di emofilia acquisite e sindrome catastrofica da anticorpi anti-fosfolipidi.
- Anche nei pazienti oncologici che ricevono terapia con CAR-T il monitoraggio immunologico può essere importante per valutare l'effetto memoria e quindi la persistenza delle *CAR-T cell*, studiarne la funzionalità, comprendere la reazione del sistema immunitario, controllare lo stato di “esaurimento” e l'attivazione dei linfociti T.



## 3. Le malattie autoimmuni

### 3.1 Generalità

L'autoimmunità si verifica quando i meccanismi alla base dell'auto-tolleranza si alterano o sono elusi.<sup>6</sup> Il mancato mantenimento della tolleranza immunologica è dovuto all'attivazione di entrambi i linfociti T e B, che producono **reazioni infiammatorie croniche nei tessuti bersaglio**. La malattia autoimmune è una condizione patologica in cui è venuta a mancare la tolleranza immunologica verso uno o più antigeni *self*. Il risultato della scomparsa della tolleranza è la formazione di autoanticorpi e/o linfociti T autoreattivi che inducono il danno tessutale e la malattia.

Ogni anno più di 4mila persone su 100mila vengono colpite in Europa da patologie autoimmuni; chi ne soffre – quasi il 5% della popolazione nei Paesi occidentali – attraversa fasi di riacutizzazione e di remissione, è costantemente sotto controllo medico e deve adeguare farmaci e dosaggi all'evoluzione della malattia. In letteratura sono descritte oltre **80 malattie autoimmuni**: dalla malattia di Crohn, all'artrite reumatoide, alla sclerosi multipla, alla neuromielite ottica.<sup>7</sup>

Per molti anni l'unico rimedio per il paziente autoimmune sono stati cortisonici e farmaci antinfiammatori, ma negli ultimi due decenni è via via cresciuto il numero di farmaci cosiddetti immunospecifici, l'ultima frontiera dei farmaci immunomodulanti, che agiscono sull'attività del sistema immunitario bloccando determinati punti critici della risposta immune. Con gli anticorpi monoclonali sono cambiati l'approccio nei confronti delle malattie autoimmuni e la qualità della vita dei pazienti. Sebbene l'immunopatogenesi delle malattie autoimmuni sistemiche ad oggi rimanga non completamente chiarita, i meccanismi effettori coinvolti nell'autoimmunità organo-specifica sono stati principalmente correlati all'attività dei linfociti T helper (Th) CD4+ e T citotossici (Tc) CD8+.<sup>6</sup>

### 3.2 L'immunoterapia nelle malattie autoimmuni

Nell'autoimmunità l'obiettivo è promuovere la soppressione immunitaria e frenare l'infiammazione.<sup>8</sup> Uno studio molto recente, pubblicato da Chen et al. su *Nature Biomedical Engineering* nel 2019,<sup>9</sup> ha dimostrato che una singola catena dell'anticorpo anti-PD-1, coniugato a una tossina batterica, è in grado di uccidere in maniera selettiva, nei topi, linfociti T auto-reattivi, cioè è in grado di indurre diabete o encefalite autoimmune. Gli autori concludono affermando che la lisi mirata dei linfociti T auto-reattivi che esprimono PD-1 potrebbe essere efficace nel trattamento di una vasta gamma di malattie autoimmuni.

Anche le terapie CAR-T possono colpire gli autoantigeni per sopprimere l'autoimmunità.<sup>8</sup> Ellebrecht et al. già nel 2016, in uno studio pubblicato su *Science*,<sup>10</sup> avevano progettato un recettore artificiale *CAR-like* potenzialmente capace di indurre i linfociti T dei pazienti ad attaccare solo i linfociti B che producevano anticorpi nocivi anti-Dsg3 nella malattia autoimmune cutanea *pemphigus vulgaris*. I risultati dello studio indicano che cellule CAR possono essere sviluppate per riconoscere i linfociti B autoreattivi ed eliminarli selettivamente, per fornire una strategia efficace e universale per il *targeting* specifico dei linfociti B autoreattivi in malattie autoimmuni mediate da anticorpi.

Uno studio pubblicato da Kansal et al. nel 2019,<sup>11</sup> basato su una sperimentazione sui topi che ha dato risultati promettenti, conferma che la terapia CAR potrebbe funzionare anche per le malattie autoimmuni.

## 4. Focus sulle malattie autoimmuni in ematologia, nefrologia, neurologia e reumatologia

Nel presente capitolo sarà fornita una breve descrizione delle principali patologie autoimmuni e delle strategie terapeutiche immunologiche adottate.

### 4.1 Utilizzo di anticorpi monoclonali in ematologia

#### Anemie emolitiche autoimmuni (AIHA)

L'anemia emolitica autoimmune da anticorpi caldi (*warm autoimmune hemolytic anemia*, wAIHA) è caratterizzata dalla distruzione dei globuli rossi (emolisi) che vengono attaccati da autoanticorpi caldi, appartenenti alla classe IgG, attivi a un optimum termico di 37 °C (range termico 25-37 °C) e diretti contro gli antigeni (proteine) presenti sulla loro superficie. L'incidenza annuale della wAIHA è da 1 a 3 casi per 100.000 persone.<sup>12,13</sup> In due studi randomizzati e controllati la terapia con glucocorticoidi più rituximab ha dimostrato di essere superiore alla monoterapia con glucocorticoidi, che è il trattamento di 1° linea.<sup>14,15</sup> Inoltre, recenti linee guida del Regno Unito consigliano rituximab come **seconda linea** di trattamento rispetto alla splenectomia, ne attestano l'efficacia in circa l'80% dei casi e indicano che rituximab può essere ripetuto diverse volte mantenendo i risultati ottenuti.<sup>16</sup>

Rituximab è risultato efficace anche nell'**anemia emolitica autoimmune da anticorpi fredi** (*cold AIHA*, cAIHA), caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi che vengono definiti fredi perché risultano attivi a 4-20 °C e nella **malattia da agglutinine fredde** (*cold agglutinin disease*, CAD), con tassi di efficacia dal 45 al 66%.<sup>12,17</sup> La CAD, una malattia rara del sangue, cronica e grave, nella quale il sistema del complemento attacca per errore i globuli rossi sani, è stata trattata con successo con bortezomib<sup>18</sup> ed eculizumab<sup>19,20</sup> nei pazienti non responsivi a rituximab.

#### Porpora trombocitopenica idiopatica autoimmune

La porpora trombocitopenica idiopatica autoimmune è una malattia autoimmune caratterizzata da carenza acuta di piastrine nel sangue (piastrinopenia) in assenza di altre patologie associate. Nei pazienti che non rispondono o che vanno incontro a recidive dopo trattamento con glucocorticoidi rituximab ha dimostrato la sua efficacia nel 60% dei casi, con una risposta completa nel 40% dei casi.<sup>21,22</sup>

#### Porpora trombotica trombocitopenica (sindrome di Moschowitz)

Nella porpora trombotica trombocitopenica, una microangiopatia trombotica aggressiva multisistematica, rituximab agisce come soppressore della produzione degli anticorpi anti-ADAMTS13

mediante deplezione dei linfociti B, ed è indicato nei pazienti refrattari o che presentano recidive dopo trattamento con glucocorticoidi, con una buona risposta nel 60% dei casi a 6 mesi e nel 30% a 2 anni; il trattamento può essere ripetuto.<sup>23</sup> Rituximab è risultato altamente efficace anche nella **profilassi delle recidive acute**.<sup>24</sup>

Rituximab è risultato efficace anche nel trattamento di prima linea nell'**emofilia acquisita dell'adulto** in studi monocentrici o case report<sup>25,26</sup> e nella **sindrome catastrofica anti-fosfolipidi** (*catastrophic antiphospholipid syndrome*, CAPS), un raro disturbo autoimmunitario sistematico associato a formazione di coaguli sanguigni, in cui *catastrophic* si riferisce all'alta mortalità (50%) dei pazienti con CAPS. Nella CAPS recenti case report o expert opinion, supportati dalle ultime linee guida EULAR (2019), indicano **eculizumab**, un anticorpo monoclonale che inibisce l'attivazione della parte terminale del complemento, come nuovo trattamento.<sup>27,28</sup>

## 4.2 Utilizzo di anticorpi monoclonali in nefrologia

In nefrologia sono in studio diversi anticorpi monoclonali diretti contro proteine di membrana espresse sui linfociti B, contro citochine stimolanti i linfociti B o contro i componenti del complemento.<sup>29,30</sup>

### Glomerulonefrite membranosa

La glomerulonefrite membranosa (*membranous nephropathy*, MN) è una patologia glomerulare cronica caratterizzata da alterazioni strutturali delle pareti capillari glomerulari con la deposizione di immunocomplessi sul versante epiteliale della membrana basale glomerulare, che provoca proteinuria e può progredire verso l'insufficienza renale cronica. Essa rappresenta una delle cause maggiori di sindrome nefrosica dell'adulto.<sup>31</sup> Quando l'eziologia rimane sconosciuta la malattia è definita idiopatica. Circa un quarto dei casi di MN può originare da cause secondarie: lupus eritematoso sistematico, infezione virale (ad es., epatite B) o neoplasia.

La MN è una malattia cronica e il suo decorso include remissioni spontanee (in circa il 30% dei pazienti con manifestazioni più lievi, solitamente entro i primi 2 anni dalla diagnosi) e frequenti ricadute, fino all'insufficienza renale cronica.<sup>32</sup> Una revisione sistematica della letteratura dal 1980 al 2010 ha evidenziato un'incidenza globale di 1,2 casi ogni 100.000 per anno, con un'ampia prevalenza nel sesso maschile caucasico di età >40 anni.<sup>33</sup> Negli ultimi 10 anni sono stati definiti i precisi meccanismi patogenetici della malattia che hanno aperto nuovi scenari di trattamento.

Rituximab si è dimostrato efficace come terapia innovativa nella MN idiopatica e secondaria e numerosi RTC (*randomized controlled trial*) (GEMRITUX) e studi osservazionali internazionali ne hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza sulla deplezione degli anticorpi PLA2R, causa della malattia.<sup>31,32,34,35</sup>

Fervenza et al.<sup>36</sup> hanno pubblicato sul *New England Journal of Medicine* i risultati dello studio RTC MENTOR, condotto negli USA, che conferma che la terapia con rituximab è superiore a quella con ciclosporina nella cura della NM idiopatica, con una remissione completa o parziale della proteinuria dopo 12 mesi, ed è superiore nel mantenerla fino a 24 mesi. Altri trial evidenziano nuovi orientamenti della ricerca su meccanismi di blocco specifico (belimumab)<sup>37</sup> e aspecifico (ACTH), confrontati con la ciclofosfamide e con gli inibitori della calcineurina. Segnalazioni più occasionali prendono in considerazione nuove possibili opzioni terapeutiche, quali ofatumumab<sup>37</sup>, bortezomib<sup>38</sup> ed eculizumab<sup>37</sup>.

## Altre glomerulopatie

La glomerulonefrite membranoproliferativa HCV-correlata è caratterizzata da alterazioni della membrana basale glomerulare associate a depositi di immunocompleSSI sul versante endoteliale e a proliferazione mesangiale. È associata alla sindrome crioglobulinemica acuta nei pazienti HCV-positivi e si manifesta con ematuria e proteinuria nefrosica. Il suo decorso può portare a una riduzione progressiva della funzione renale.<sup>39-41</sup>

La sindrome nefrosica steroido-dipendente o steroido-resistente dovuta a glomerulopatia a lesioni minime o a glomerulosclerosi focale e segmentale è un'altra patologia renale in cui è stato utilizzato rituximab, come nelle forme di vasculite associate alla presenza di ANCA, sia P-ANCA sia C-ANCA. Negli studi è emerso che rituximab è efficace al pari della ciclofosfamide nell'indurre la remissione delle fasi acute, ma lo è ancora di più nel trattamento delle forme refrattarie e/o ricidivanti di queste malattie.<sup>42-57</sup>

## 4.3 Utilizzo di anticorpi monoclonali in neurologia

Negli ultimi 20 anni l'utilizzo dei mAb in neurologia ha rivoluzionato la cura di differenti malattie neuroimmunologiche. Se la **sclerosi multipla** fa da capostipite, grazie all'introduzione di natalizumab, mAb umanizzato diretto contro l'alfa-4-integrina VLA4, e successivamente di mAb immunodepletivi come alemtuzumab, rituximab e ocrelizumab, più recentemente l'uso dei mAb si è esteso a molte altre patologie immunomediate del sistema nervoso centrale e del sistema nervoso periferico. In particolare, l'uso di mAb anti-B (rituximab) si è diffuso per la cura della neuromielite ottica, delle patologie associate ad anticorpi anti-MOG (di recente classificazione nosografica), delle encefaliti autoimmuni e paraneoplastiche, della miastenia gravis e delle polineuropatie infiammatorie.<sup>58,59</sup>

### Sclerosi multipla

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune cronico-degenerativa ingravescente che colpisce il sistema nervoso centrale.<sup>60</sup> La SM rappresenta la principale causa di disabilità non traumatica nei giovani adulti: in Italia l'ASM stima che oltre 122.000 persone ne siano colpite, con una diffusione doppia nelle donne rispetto agli uomini; si stimano più di 3400 nuovi casi l'anno, con un'incidenza stimata tra 5,5 e 6 su 100.000 (12 su 100.000 per la Sardegna).<sup>60</sup>

Oltre l'80% dei malati presenta un fenotipo clinico a riacutizzazioni e remissioni, seguito dopo 10-20 anni di malattia da una forma secondariamente progressiva, caratterizzata da accumulo di disabilità neurologica in assenza di evidente attività infiammatoria. Dal 10 al 15% dei pazienti, invece, mostra sin dall'inizio una variante ad andamento primariamente progressivo, che per molti decenni è rimasta orfana di terapie.<sup>61</sup>

Dopo una prima fase storica negli anni '90 caratterizzata da cure con farmaci biologici, come l'interferone, l'approvazione dell'uso di natalizumab nel 2003 ha rivoluzionato l'ambito di trattamento di questa patologia.<sup>62</sup> Natalizumab blocca l'interazione tra VLA4 e ICAM1 inibendo la transmigrazione linfocitaria attraverso la barriera emato-encefalica, riducendo in misura altamente significativa l'attività infiammatoria di malattia, il tasso di recidive cliniche e la progressione della disabilità.<sup>62</sup>

Negli ultimi anni poi l'introduzione di alemtuzumab, mAb umanizzato anti-CD52 a lunga durata d'azione, ha evidenziato come l'immunodeplezione seguita da immunoricostituzione possa rappresentare una strategia di cura soprattutto per quelle forme di malattia ad alta attività

refrattarie alle terapie tradizionali o come strategia induttiva all'esordio.<sup>62</sup> Tale strategia terapeutica tuttavia è gravata da un alto rischio di effetti collaterali, tra cui l'induzione di patologie autoimmuni secondarie (tiroiditi, porpora trombocitopenica autoimmune, nefropatie) probabilmente legate alla diversa cinetica di immunoriconstituzione di linfociti B e T.<sup>62</sup> La recente evidenza di un ruolo non marginale dei linfociti B nell'immunopatogenesi della SM ha portato a un ampio uso *off-label* di rituximab.<sup>58</sup>

Recentemente è stato approvato un nuovo anti-CD20 umanizzato, ocrelizumab, per la cura sia delle forme a riacutizzazioni e remissioni sia delle forme primariamente progressive, e sono in studio altri mAb diretti contro i linfociti B (ofatumumab) nonché farmaci che interferiscono con i meccanismi regolatori e attivatori dei linfociti B come ibrutinib (inibitore della tirosin-chinasi di Bruton-BTK).<sup>58,62,63</sup>

Ocrelizumab ha dimostrato in differenti trial clinici un'ottima efficacia nel ridurre il tasso di recidive di malattia ma anche, per la prima volta, la progressione di disabilità nelle forme primariamente progressive, essendo il primo farmaco con approvazione ufficiale per la cura di questo fenotipo di malattia.<sup>62-64</sup>

### **Neuromielite ottica e patologie associate ad anticorpi anti-MOG**

I disturbi dello spettro della neuromielite ottica (*neuromyelitis optica spectrum disorders*, NMOSD), precedentemente noti come malattia di Devic o neuromielite ottica, sono disturbi infiammatori del sistema nervoso centrale caratterizzati da demielinizzazione grave immuno-mediata e danno assonale che colpisce principalmente i nervi ottici e il midollo spinale.<sup>65,66</sup> La patogenesi è secondaria allo sviluppo di anticorpi diretti contro la proteina canale dell'acqua acquaporina-4 (AQP4) che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della concentrazione di acqua intra- ed extracellulare nel sistema nervoso centrale.<sup>65,66</sup> Tali anticorpi determinano danno astrocitario a livello cerebrale e spinale mediante attivazione del complemento e coinvolgimento dell'immunità adattativa e innata, in cui sembra svolgere un ruolo fondamentale l'interleuchina-6 (IL6).<sup>65</sup> La scoperta di anticorpi specifici (anti-AQP4) ha portato nel 2015 a una revisione dei criteri diagnostici con inserimento, oltre i classici quadri di neuromielite ottica e mielite estesa longitudinalmente, di nuovi quadri clinico-radiologici caratteristici come sindrome dell'area postrema, sindrome diencefalica e sindrome troncoencefalica.<sup>66</sup>

Ancora più recentemente alcuni fenotipi clinici rientranti nelle definizioni dei più nuovi criteri diagnostici, ma in assenza di anticorpi anti-AQP4, sono stati correlati alla presenza di anticorpi diretti contro la glicoproteina mielinica oligodendrocitaria (MOG).<sup>67</sup> Il successivo riconoscimento di altre sindromi cliniche associate alla presenza di tali anticorpi e la caratterizzazione di un danno demielinizzante primario hanno permesso la definizione di un nuovo gruppo nosologico chiamato gruppo dei disordini associati a MOG (MOGAD).

Entrambi i disordini qui descritti vengono generalmente trattati in prima linea con rituximab e in particolare con un approccio di *redosing* secondario al monitoraggio dei linfociti B circolanti: in particolare il monitoraggio di CD27 sembra avere dei vantaggi in termini di risposta clinica rispetto a quello dei CD19, tanto che una recente determina AIFA suggerisce l'uso di tale parametro come indice di risposta clinica. Il trattamento con rituximab è anche correlato alla riduzione del titolo di anticorpi anti-AQP4 e anti-MOG.<sup>65,67</sup>

È noto in letteratura lo stretto legame tra risalita dei linfociti B circolanti, aumento del titolo anticorpale e rischio di ricaduta di malattia. Qualora la risposta terapeutica non sia adeguata, l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale tocilizumab diretto contro il recettore dell'IL6 rappresenta la strategia di terapia *rescue*.<sup>68</sup>

Inoltre, molto recentemente, tre nuovi anticorpi monoclonali hanno dimostrato efficacia nel controllo della NMOSD con o senza anticorpi anti-AQP4, in differenti trial clinici, in singola terapia o in *add-on*. Tali farmaci sono rappresentati da un nuovo anticorpo monoclonale anti-linfoцитi B diretto contro l'antigene CD19 (inebilizumab), da satralizumab diretto contro il recettore dell'IL6, che rappresenta un prodotto di bioingenierizzazione, e dall'anticorpo diretto contro il fattore 5 del complemento eculizumab.<sup>69</sup> La prossima introduzione sul mercato di tali farmaci aprirà quindi inevitabilmente la necessità di creare pannelli di monitoraggio immunologico ad hoc per verificare sia la risposta terapeutica sia i potenziali eventi avversi dei diversi farmaci.

#### 4.4 Utilizzo di anticorpi monoclonali in reumatologia

I farmaci biologici hanno cambiato completamente la vita di molti pazienti affetti da malattie reumatiche. Da oltre 20 anni questi farmaci hanno fatto la loro comparsa nel panorama della reumatologia italiana e dopo un'iniziale fase di sperimentazione e di utilizzo “ad uso compas- sionevole”, molte molecole fanno ormai parte a pieno titolo dell’armamentario terapeutico del reumatologo, con indicazioni progressivamente sempre più ampie. Sono state introdotte nel 1998 per il trattamento dell’artrite reumatoide, con un completo “sovvertimento” dello scenario terapeutico disponibile, ottenendo ottimi outcome in termini di qualità della vita, disabilità, morbilità e mortalità, grazie anche a una graduale estensione delle indicazioni di nuove e vecchie molecole. E la ricerca è molto attiva in questo campo, con l’introduzione di nuove molecole biologiche.

##### Artrite reumatoide

L’artrite reumatoide (AR) è una patologia autoimmune a elettiva localizzazione articolare, con carattere erosivo, deformante e talora anchilosante, ad andamento cronico e progressivo, contraddistinta dalla presenza, in una grande percentuale di casi, di auto-anticorpi anti-im- munoglobuline di classe IgG (fattori reumatoidi).<sup>70</sup> La prevalenza della malattia è compresa tra lo 0,3% e l’1,5% della popolazione mondiale. La distribuzione della malattia è uniforme in tutto il mondo e sembra non risentire di fattori meteorologici, geografici e socio-economici. Si è valutato che in Italia colpisce circa lo 0,5% della popolazione generale (0,6% delle donne e 0,25% degli uomini); quindi circa 170.000 donne e 60.000 uomini sono affetti da AR, per una prevalenza totale di 230.000 persone in età adulta. Benché la prevalenza dell’AR sia nettamen- te inferiore a quella di altre condizioni quali l’artrosi, la frequente gravità del quadro clinico e l’elevato potenziale invalidante ne fanno una malattia dall’impatto socio-economico rilevante in termini di costi, disabilità e perdita di produttività.

I pazienti con AR vengono trattati inizialmente con uno o più farmaci di fondo (*disease-modifying anti-rheumatic drugs*, DMARD), quali ad esempio methotrexato, sulfasalazina, leflunomide e idrossiclorochina. Da tempo sono disponibili farmaci biologici con differenti target tera- peutici per i pazienti con AR.<sup>71</sup>

L’AR è caratterizzata da un’infiammazione sinoviale che porta alla distruzione osteoarticolare. Nell’AR i linfociti B autoreattivi, insieme ai linfociti T, sono alla base dell’ezio- logia e del mante- nimento dell’infiammazione autoimmune della malattia.<sup>72-74</sup> Ampie evidenze cliniche indica- no l’interruzione dei processi regolati dai linfociti B nella patogenesi dell’AR e di altri disturbi autoimmuni, fornendo il razionale della terapia di deplezione dei linfociti B nell’AR.<sup>72,74</sup>

Rituximab trova classicamente indicazione nel trattamento delle forme refrattarie di AR e, se pur a dosaggi ridotti, anche nel mantenimento del controllo clinico a basso rischio infettivo.

Infatti in molti studi clinici rituximab si è dimostrato efficace nel ridurre i segni e i sintomi di AR insieme all'inibizione della progressione di danno articolare, agendo marcatamente sulla deplezione dei linfociti B periferici e, in misura minore, nei tessuti, in pazienti adulti che hanno mostrato inadeguata risposta o intolleranza ad altri DMARD, comprendenti uno o più inibitori del fattore di necrosi tumorale (TNF).<sup>71,74</sup>

L'efficacia della risposta e la sua durata a lungo termine correlano con l'entità della deplezione B-linfocitaria, più frequentemente registrata nei soggetti positivi agli anticorpi anti-citrullina e al fattore reumatoide, nei soggetti non fumatori e nei soggetti in trattamento associato con altri farmaci immunosoppressori.

La somministrazione di rituximab causa una rapida e quasi completa deplezione dei linfociti B positivi nel sangue periferico e solo un parziale esaurimento nel tessuto sinoviale e nel midollo osseo.<sup>71</sup> Il trattamento con rituximab induce un miglioramento clinico nella maggior parte dei pazienti con autoanticorpi positivi all'AR, ma un'ampia percentuale di pazienti (>50%) recidiva o non risponde a rituximab. La ragione della resistenza può essere dovuta al fatto che circa il 50% dei pazienti mostra livelli ridotti (se non del tutto assenti) di infiltrazione di linfociti B nel tessuto sinoviale.

Uno studio recente ha valutato il trattamento con **tocilizumab** vs rituximab. Tocilizumab è risultato più efficace di rituximab nel raggiungimento di decrementi significativi di attività di malattia in pazienti con AR classificati in base alla presenza di bassi livelli di linfociti B nel tessuto sinoviale, non responsivi ai DMARD e ai farmaci anti-TNF. Questi risultati indicano la strada per una **personalizzazione della terapia** più appropriata, nell'ambito del trattamento di questa malattia.<sup>75</sup>

### **Lupus eritematoso sistemico**

Il LES è una malattia reumatica infiammatoria cronica a patogenesi autoimmune e rappresenta, sia per la potenziale estensione a molti organi e apparati sia per la gravità delle lesioni, la connettivite di maggior rilievo. In Italia sono 240.000 circa i malati di LES con rapporto F/M di 9:1. L'età di insorgenza più frequente è tra 25 e 40 anni. L'etiologya, multifattoriale, comprende fattori genetici, endocrini e ambientali (infettivi, fisici, chimici, farmacologici). Il recente aggiornamento delle linee guida EULAR per la gestione del LES (2019)<sup>76</sup> ha ridefinito gli obiettivi di trattamento della malattia:

1. remissione o ridotta attività di malattia (2b/B);
2. prevenzione delle recidive in tutti gli organi (2b/B);
3. ricorso a una terapia di mantenimento con la dose più bassa possibile di glucocorticoidi (GC).

Gli studi randomizzati e controllati sul LES sono limitati e il trattamento di solito comprende GC e idrossiclorochina per i gradi di malattia da lieve a moderata e immunosoppressori nelle forme più severe. Rituximab, disponibile dal 2004 e utilizzato *off label*, è indicato dalle Linee Guida EULAR nei casi refrattari o con intolleranze/controindicazioni ai farmaci immunosoppressivi standard. Il trattamento precoce dei pazienti con LES con rituximab è risultato sicuro ed efficace e consente una riduzione dell'uso di steroidi.<sup>77</sup>

Aguiar et al.<sup>78</sup> hanno dimostrato, in un'analisi retrospettiva di una coorte di pazienti londinesi trattati con rituximab tra il 2000 e il 2013, che il trattamento con rituximab è in grado di assi-

curare nel lungo termine (>14 anni di follow-up) un'efficace riduzione dell'attività di malattia e dell'incidenza di eventi avversi in pazienti con LES di entità severa o refrattari al trattamento. I risultati hanno mostrato livelli della proteina del complemento C3 aumentati di almeno il 25% nel 36,5% dei partecipanti allo studio dopo il primo ciclo di trattamento con rituximab, mentre nel 38,2% dei pazienti è stata osservata una riduzione di almeno il 50% dei livelli di dsDNA. La deplezione delle cellule CD19+ è stata raggiunta nel 94% dei pazienti partecipanti allo studio. Gli autori dello studio hanno ricordato come "rituximab rappresenti il farmaco biologico caratterizzato per l'utilizzo off-label più diffuso nel trattamento del LES refrattario".<sup>78</sup> Dal 2013 è disponibile in Italia **belimumab**, un anticorpo monoclonale totalmente umanizzato anti-B-lys, una citochina particolarmente aumentata nei pazienti con lupus in fase attiva avendo la funzione di incrementare la differenziazione, la proliferazione e la maturazione dei linfociti B. Nel LES, così come in altre malattie autoimmuni, valori elevati di B-lys possono favorire la produzione di autoanticorpi, che attaccano e distruggono i tessuti dell'organismo stesso. Grazie alla somministrazione di belimumab, quindi, si inibisce il meccanismo che mantiene e incrementa il danno a carico degli organi e degli apparati nei pazienti con LES ad alto grado di attività di malattia.<sup>76</sup>

Recentemente, in uno studio pilota presentato a Madrid in occasione del Congresso EULAR 2019, è stato dimostrato che l'adozione di un regime di trattamento di combinazione a base di rituximab e belimumab sembra essere molto efficace nel LES in severo e refrattario ai trattamenti in essere.<sup>79</sup>

### Sindrome di Sjögren

È una malattia infiammatoria cronica, a patogenesi autoimmune, che interessa potenzialmente vari organi e apparati ma che può interessare particolarmente le ghiandole esocrine (salivari, lacrimali, pancreas, vie biliari, tubuli renali). Al pari di altre malattie autoimmuni sistemiche l'etiologia è multifattoriale e la prevalenza sembra essere non inferiore a quella dell'AR. La malattia si associa a un rischio elevato di linfoma il cui tasso standardizzato di incidenza può oscillare dal 7,1 al 15,57%. Oltre ai segni e sintomi sistematici (astenia, febbre, artralgie) e ai segni di interessamento d'organo, nelle fasi avanzate della malattia è possibile rilevare i segni e sintomi di insufficienza funzionale di alcune ghiandole esocrine (xerostomia e xeroftalmia, tumor parotideo).

Vi sono molti studi che sembrano confermare il possibile ruolo "induttore" del citomegalovirus e dell'EPV, entrambi orientati verso una naturale localizzazione nelle ghiandole salivari. La patogenesi riconoscerebbe un meccanismo autoimmune, slatentizzato da un'infezione virale, orientato verso le strutture ghiandolari esocrine, a tipo mimetismo molecolare e/o di attivazione aspecifica policlonale. L'ipergammaglobulinemia, la positività al fattore reumatoide e potenzialmente anche delle crioglobuline, la positività agli autoanticorpi e l'alta incidenza di linfoma B-cellulare sono chiare evidenze del ruolo chiave dei linfociti B nella patogenesi della sindrome di Sjögren. L'infiltrazione B-cellulare, pur essendo accompagnata da linfociti T, cresce con la severità dell'infiammazione e quindi del danno d'organo.

L'iperattività dei linfociti B è la chiave per il trattamento con rituximab, che ha dimostrato effetti benefici sulla morfologia ghiandolare, nella secchezza degli occhi e della bocca, nell'astenia e in altre manifestazioni extra-ghiandolari, anche se al momento non esiste un consenso unanime nella comunità scientifica su questo tipo di trattamento.<sup>80</sup> Alcuni studi recenti, se pur non controllati e con coorti poco numerose, hanno registrato un'efficace risposta al trattamen-

to con rituximab, soprattutto nei pazienti con maggiori infiltrati B-cellulari e centri germinativi all'esordio, particolarmente se caratterizzati dal CD20+. <sup>81</sup>

Vari DMARD (idrossiclorochina, micofenolato mofetile, methotrexato, ciclofosfamide) sono stati usati nella sindrome di Sjögren con alterni risultati, e comunque non significativi, nei vari studi.

### **Miopatie infiammatorie idiopatiche**

Le miopatie infiammatorie idiopatiche rappresentano un gruppo di patologie del tessuto connettivo sistematico acquisite ed eterogenee, e comprendono la polimiosite, la dermatomiosite, la dermatomiosite giovanile e le miositi associate al cancro o ad altra patologia del tessuto connettivo, nonché le miositi da corpo di inclusione.<sup>82</sup>

Studi limitati con rituximab sono stati condotti nelle dermatomiositi e nelle polimiositi, malattie croniche autoimmunitarie caratterizzate da astenia muscolare e, anche, da coinvolgimento polmonare, articolare, cutaneo e gastrointestinale in alcuni pazienti. I pazienti con miopatia refrattari a precedenti trattamenti sembrano rispondere efficacemente e in modo duraturo al rituximab anche se i risultati interessano percentuali di popolazioni diverse in relazioni agli studi (in parte anche per l'assenza di criteri di omogeneizzazione delle popolazioni studiate). Minore responsività clinica sembra essere stata registrata nell'impegno cutaneo, nei soggetti giovani e nella disfagia. Tuttavia, anche se i risultati di rituximab sono stati efficaci rimane ancora non chiaro quando usarlo e con quale regime terapeutico.<sup>82,83</sup>

### **Altre patologie reumatologiche**

Rituximab è stato valutato anche in altre numerose patologie reumatologiche.

La **sclerosi sistemica**<sup>84</sup> è una connettivite caratterizzata da micro- e macroangiopatia in varia misura coesistenti nello stesso paziente, associate all'*hallmark* istopatologico della malattia che è la fibrosi degli interstizi parenchimali con tipica, ma non esclusiva, espressione clinica a livello cutaneo e polmonare. Se ne riconoscono una forma a espressione cutanea limitata e una diffusa, quest'ultima più frequentemente correlata a fibrosi polmonare, positività auto-anticorpale anti-Scl70 e prognosi peggiore, mentre la forma a espressione cutanea limitata si associa più frequentemente a ipertensione arteriosa polmonare e frequente specificità anticorpale anti-centromerica. Il fenomeno di Raynaud delle acro-sedi di mani e piedi ne caratterizza gli esordi. Le ulcere digitali delle acro-sedi sono invece espressioni più o meno tardive di una condizione non adeguatamente curata dall'inizio. L'eziopatogenesi è complessa e non del tutto chiarita. Il ruolo dei linfociti B sembra tuttavia essere riconosciuto come centrale nei meccanismi patogenetici extra-vascolari, che orientano il quadro clinico verso la fibrosi. Per questo motivo rituximab trova spazio nei pazienti non responder alle terapie tradizionali, in particolare in caso di interstiziopatia polmonare e forma cutanea diffusa,<sup>85,86</sup> anche se il miglioramento dei parametri respiratori non è stato confermato in altri studi.<sup>87</sup>

L'**arterite di Takayasu**<sup>88</sup> è una vasculite dei grossi vasi arteriosi che interessa l'aorta toracica e quella addominale con i suoi rami maggiori, oltre alle arterie polmonari. È tipicamente appannaggio del sesso femminile, con massima incidenza tra 15 e 40 anni, anche se non sono escluse età di esordio minori e più avanzate. La razza asiatica è quella più colpita. L'incidenza annuale negli USA è di 2,5 casi per milione di abitanti. L'eziologia non è conosciuta, mentre la patogenesi è almeno in parte cellulo-mediata. L'efficacia della risposta a rituximab in alcuni casi refrattari alle terapie tradizionali sottolinea, tuttavia, il possibile ruolo patogenetico dei linfociti B. Dati aneddotici della letteratura hanno infatti registrato negli ultimi anni casi di

pazienti responsivi a rituximab dopo essere stati resistenti a farmaci immunosoppressivi tradizionali (modulatori della co-stimolazione T cellulare, anti-TNF alfa, anti IL6).

La **malattia di Kawasaki**,<sup>89</sup> una rara malattia infiammatoria febbrale di solito autolimitante-si, appartenente alle vasculiti sistemiche, interessa l'età infantile dai primi mesi di vita agli 8 anni. Lievemente più frequente nel sesso maschile, si caratterizza per un esordio acuto con febbre, linfo-adenomegalia latero-cervicale, flogosi oro-faringea e congiuntivale, eritema del palmo delle mani e pianta dei piedi che tende alla desquamazione dei polpastrelli. Possibile l'interessamento cardiaco, e in particolare delle coronarie (15-30% dei casi) con sviluppo di aneurismi alternati a trombosi. La terapia con acido acetilsalicilico soprattutto se associato alle Immunoglobuline endovenosa ad alto dosaggio di solito è efficace anche per ridurre le complicanze coronarie. In una percentuale significativa di casi non vi è tuttavia risposta alle Immunoglobuline endovenosa. Visto l'importante livello autoanticorpale di questa vasculite e l'attività B-cellulare nelle fasi acute della patologia,<sup>90</sup> l'uso di rituximab sembra rappresentare una valida alternativa alla terapia tradizionale.<sup>89</sup>

La **malattia di Behçet**<sup>91</sup> è una rara (1:500.000) malattia infiammatoria cronica a patogenesi autoimmune caratterizzata dall'alternanza di meccanismi infiammatori e vasculitici dei piccoli vasi. Più frequente nel bacino del mediterraneo che nelle aree asiatiche, la malattia di Behcet rappresenta la più frequente causa acquisita di cecità in Giappone, dove non è rara (1:1000). Vari organi e apparati possono essere colpiti. I rischi per la vita sono di solito correlati all'interessamento neurologico centrale, intestinale e vascolare arterioso. Segni frequenti sono l'affoso oro-genitale dolente, l'interessamento anteriore e/o posteriore dell'occhio, le manifestazioni cutanee (forunculosi, eritema nodoso, *pathergy reaction*) e quelle articolari (artralgie/ artriti). Frequenti la positività per il B51. Varie le opzioni terapeutiche, sia tra i DMARD tradizionali sia biologici di sintesi. Nelle forme vasculitiche posteriori dell'occhio refrattarie alle terapie tradizionali vi sono evidenze, se pur aneddotiche o comunque con numeri non significativi, di efficacia e rapidità di risposta a rituximab, a supporto di una patogenesi B-linfocitaria.<sup>92-94</sup>

La **vasculite idiopatica del SNC** è una patologia spesso refrattaria a vari farmaci citotossici. Rituximab, attraverso la deplezione B-linfocitaria, si è dimostrato efficace nell'indurre la remissione clinica e nel ridurre le riacutizzazioni cliniche, oltre a ridurre le dosi di cortisone. Nonostante tali risultati che pongono rituximab come farmaco di scelta sia nell'induzione della remissione sia nella gestione delle fasi di riacutizzazione, non è spiegabile l'evidenza di fenomeni di resistenza clinica al trattamento con rituximab anche nel caso di deplezione B-linfocitaria. I casi studiati sono pochi in letteratura.

Le **vasculiti ANCA-correlate** (granulomatosi con poliangioite – Wegener<sup>95</sup> – e poliangioite microscopica) a patogenesi B-linfocitaria sono patologie caratterizzate dalla presenza di ANCA circolanti e infiltrati vascolari leucocitari, oltre che da necrosi fibrinoide; sono gravate da un alto tasso di mortalità a 1-2 anni e da frequenti riacutizzazioni cliniche. In questo setting clinico rituximab, in associazione anche con basse dosi di steroide, rappresenta oggi una delle strategie di riferimento, essendo la sua efficacia sovrapponibile a quella della ciclofosfamide nell'induzione della remissione delle fasi acute, e superiore a quest'ultimo farmaco citotossico nel controllo delle frequenti riacutizzazioni cliniche.



# Conclusioni

Pur considerati i vantaggi offerti dal monitoraggio immunologico, è importante sottolineare che il focus al momento è limitato al contesto di terapie con anticorpi monoclonali anti-CD20. Il notevole potenziale di questa metodica, che ha gettato una nuova luce sulla gestione di patologie difficili, può essere ulteriormente studiato e ampliato, ma occorre identificare altri marcatori e altre tipologie cellulari da valutare. Una sfida è rappresentata dallo sviluppo di nuovi schemi di monitoraggio ritagliati su ciascun agente biologico impiegato, sulla strada segnata dall'esperienza ormai consolidata con rituximab. È quindi necessario approfondire ogni modello biologico alla base delle diverse patologie autoimmuni e i nuovi approcci di trattamento con le tecnologie analitiche sempre più sofisticate oggi a nostra disposizione (analisi di *receptor occupancy*, *signatures molecolari* dell'autoimmunità, identificazione di nuovi tipi cellulari a significato patogeno, come cellule mesenchimali e dendritiche circolanti portatrici di segnali associati al danno tissutale).

## KEY POINTS

- *Il monitoraggio immunologico dei trattamenti immunosoppressivi con rituximab e altri farmaci biologici nelle patologie autoimmuni fornisce un valore aggiunto di misure obiettive al semplice criterio clinico osservazionale dello stato di remissione di malattia.*
- *Il monitoraggio immunologico consente di identificare prontamente i soggetti refrattari a specifiche terapie o che per varie ragioni biologiche presentano fenomeni di resistenza al trattamento.*
- *Un adeguato monitoraggio immunologico potrebbe permettere di adeguare le scelte terapeutiche al singolo paziente o a specifici subset clinico-immunologici.*
- *Il monitoraggio immunologico tiene sotto controllo l'effetto globale dei trattamenti sulla risposta immune. Non vanno infatti dimenticati i rischi legati all'eccesso di immunosoppressione, che in alcuni pazienti possono generare uno stato di immunodeficienza secondaria a volte grave.*



## Appendice - Immunoterapia con cellule CAR-T

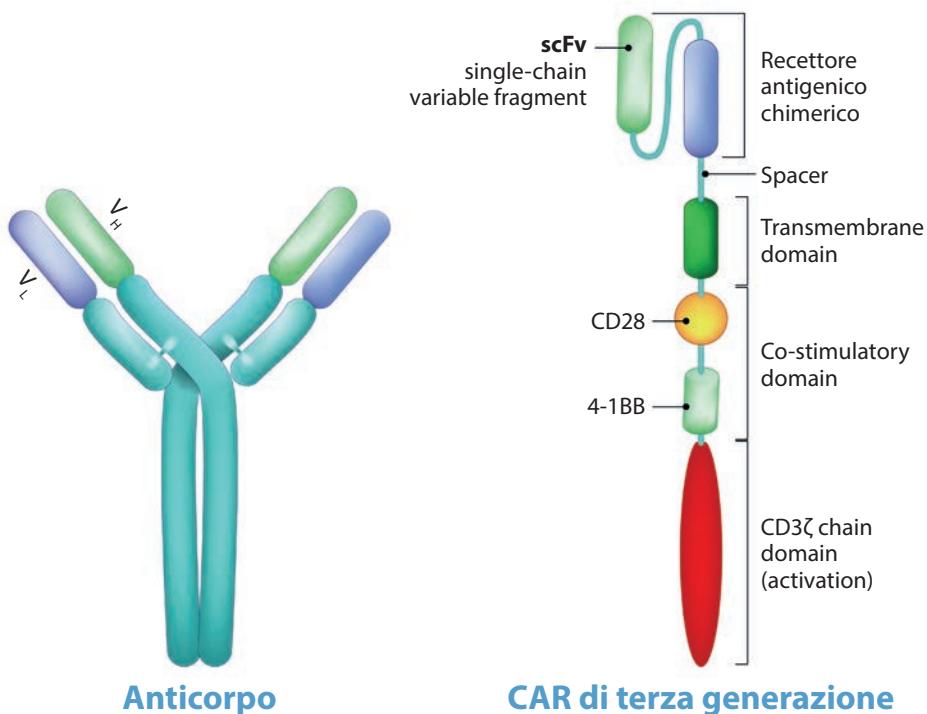
Le cellule CAR-T, sviluppate a partire dalla fine degli anni '80, sono linfociti T citotossici ingegnerizzati con un recettore antigenico chimerico, composto da una singola catena dei frammenti variabili delle immunoglobuline VL e VH (in grado di legarsi all'antigene) fusa con i domini transmembrana e intracellulare del TCR (in grado di trasmettere il segnale di attivazione e amplificazione delle CAR-T).

### Struttura e funzioni delle cellule CAR-T

Nei linfociti T non modificati il riconoscimento antigenico e la formazione della sinapsi immunologica richiedono la presenza di diverse molecole e ligandi oltre al TCR, e sono influenzati da molteplici molecole ad azione inibitoria o stimolatoria. Nelle cellule CAR-T il recettore chimerico riconosce l'antigene specifico e manda un segnale al linfocita T modificato, che reagisce come se avesse riconosciuto il proprio target. Nel corso dello sviluppo delle diverse generazioni di CAR, alla struttura chimerica sono stati aggiunti segnali costimolatori (CD28 o 4-1BB) fusi al CD3 $\zeta$  (nei CAR di terza generazione sono presenti due domini costimolatori).

Un aspetto importante nella costruzione di una cellula CAR efficace è rappresentato dalla scelta dell'antigene ideale, ossia del migliore bersaglio. L'identificazione del target giusto non è sempre facile, considerando che la cellula possiede contemporaneamente anche il proprio TCR endogeno e che vi possono essere problemi di competizione fra questo e il CAR. Le cellule CAR-T persistono indefinitamente nel repertorio immunologico del paziente, permettendo

#### Recettore antigenico chimerico delle cellule T



quindi di fornire a quest'ultimo una cellula memoria che continua a svilupparsi e garantendo una protezione anche per il futuro.

Le cellule CAR-T agiscono, dopo l'infusione, migrando dal torrente circolatorio ai siti tumorali, dove identificano e uccidono le cellule neoplastiche, le quali liberano antigeni specifici, attivando così il sistema immunitario e i linfociti T non CAR. Le principali tossicità sono legate proprio alla massiva lisi tumorale (neurotossicità, sindrome da rilascio di citochine o CRS).

I trial clinici basati sull'uso di CAR-T nel mondo sono in costante ascesa (circa 450 trial a gennaio 2020), con la Cina che costituisce l'area geografica con il maggior numero di studi registrati (seguita dal Nord America).<sup>1</sup> Da sottolineare come l'Italia sia stata in prima linea nello studio di CAR-T.

Sempre per quanto riguarda il nostro Paese, va ricordato il significativo lavoro svolto dal gruppo guidato dal Prof. Andrea Biondi, Ordinario della Clinica Pediatrica dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca e Direttore della Clinica di Pediatria S. Gerardo di Monza, che, già nel 2016, trattò il primo bambino italiano con leucemia linfoblastica acuta (LLA) che è il tumore pediatrico più comune nei bambini e negli adolescenti fino a 25 anni e colpisce circa 450 individui ogni anno. Unitamente al gruppo della Ematologia dell'ASST Papa Giovanni XXIII di Bergamo, diretto dal Prof. Rambaldi, il Prof. Biondi cominciò, diversi anni fa, a utilizzare linfociti T non geneticamente modificati in studi di fase I e II (linfociti chiamati CIK, *cytokine induced killer*, perché attivati in vitro con alcune citochine). Inoltre, il centro di Monza ha partecipato, unico in Italia, allo studio registrativo di tisagenlecleucel. Attualmente, dopo aver ricevuto autorizzazione da parte di AIFA, il Laboratorio di Terapia Cellulare e Genica "S. Verri" dell'Ospedale S Gerardo di Monza, unitamente alla Ematologia della ASST Papa Giovanni XXIII di Bergamo, ha condotto uno studio clinico di fase I con una CAR anti-CD19 prodotta nel loro Laboratorio accademico.<sup>2-5</sup>

## **CAR-T anti-CD19**

Le cellule CAR-T più usate fino ad oggi sono anti-CD19 (non un antigene specifico tumorale, quindi, ma caratteristico dei linfociti B nel loro complesso). Nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta (LAL) del bambino e del giovane adulto e del linfoma non Hodgkin, il trattamento con le CAR-T anti-CD19 ha indotto risultati molto positivi, con alte percentuali di remissione completa in pazienti con multiple linee di terapia precedente. Tuttavia, vi sono limitazioni al loro uso che devono essere considerate, prima fra tutte la difficoltà dell'intera procedura. Infatti in uno studio su 107 pazienti con LAL, solo 92 sono stati arruolati e solo 75 hanno effettivamente ricevuto l'infusione, per un totale di 48 pazienti al follow-up finale).<sup>6</sup> Inoltre, un'altra problematica è rappresentata dalla variabilità dell'efficienza della trasfezione necessaria per l'inserimento del recettore chimerico, che in alcuni casi può essere molto bassa. Ad oggi, le indicazioni per il trattamento con cellule CAR-T sono limitate a INN-tisagenlecleucel (LAL e linfoma diffuso a grandi cellule B) e INN-axicabtagene ciloleucel di Gilead (linfoma a grandi cellule B diffuso e mediastinico). Entrambi i prodotti sono derivati dallo stesso mAb anti-CD19.

## **Monitoraggio delle cellule CAR-T infuse**

Poiché le CAR-T infuse diventano cellule memoria e permangono nell'organismo, sarebbe molto interessante poter utilizzare la tipizzazione immunologica dopo l'infusione, per valutare come queste cellule proliferano, si differenziano e permangono nel paziente. Questo tipo di monitoraggio potrebbe anche permettere di differenziare i diversi fenotipi e di controllare

i fenomeni di tossicità.<sup>7</sup> Al momento, tuttavia, ciò non sembra facile, perché subito dopo l'infusione i livelli di CAR-T diminuiscono e rimangono come cellule di memoria a livelli infinitesimali. Gli studi di monitoraggio eseguiti sono basati sulla PCR, e dicono che i livelli di cellule trasdotte risalgono se la malattia ricompare, ma questa cinetica rimane tutta da dimostrare. È molto interessante che, nell'esperienza italiana condotta con cellule ingegnerizzate con il CAR veicolato da un trasposone, e quindi non dai vettori retrovirali, è stato possibile monitorare anche per lunghi periodi di tempo le cellule geneticamente modificate con una citofluorimetria standard, utilizzando la stessa molecola CD19 come marcatore.<sup>5</sup>

## Limitazioni delle cellule CAR-T

I limiti del trattamento con CAR-T sono legati essenzialmente alle difficoltà di produzione e ai fenomeni di tossicità che scatenano. La produzione di CAR-T autologhe infatti è un processo complesso e costoso, che riduce il numero di pazienti effettivamente sottoposti al trattamento. Una possibile soluzione sarebbe rappresentata da CAR-T *off-the-shelf*, prodotte a partire da cellule CIK cordonali, che possono essere trasdotte con il vettore contenente il CAR e non danno tossicità GvHD quando infuse in aploidentità. La produzione di una banca di CIK da sangue cordonale, da infondere con un criterio di identità 3/6, è fattibile ipotizzando l'espansione in vitro di un ridotto numero di unità di sangue cordonale bancato, tale da coprire la compatibilità (valutata come 3/6 loci a bassa risoluzione) cordonali, di circa il 70% dei pazienti, disponendo così di cellule CAR già pronte per l'uso. Una strategia alternativa è data dalla delezione del TCR endogeno, procedura però molto difficile.

Gli eventi avversi più drammatici associati al trattamento con CAR-T sono legati alla massiva lisi tumorale: Cytokine Release Syndrome (CRS) danni neurologici, sindrome da attivazione dei macrofagi (MAS). La CRS viene oggi trattata con tocilizumab, un anticorpo anti-recettore dell'IL6, sebbene altre citochine siano coinvolte nel processo.

Infine, un'ulteriore limitazione è data dalla perdita o modulazione dell'antigene target alla ripresa della malattia. Si tratta di un evento relativamente frequente, favorito dal fatto che il CD19 può presentare varianti di espressione sulla membrana, che possono far perdere sensibilità all'anti-CD19. Per questa ragione sono al momento attivi trial clinici con l'utilizzo di cellule CAR-T multi-antigene (CD19 e CD22 o CD19 e CD20).

## CAR-T prodotte con trasposoni

In alternativa ai vettori virali (retrovirus o lentivirus) generalmente utilizzati per la produzione delle CAR-T, è possibile impiegare dei trasposoni. In questo caso, il CAR viene inserito in un plasmide e introdotto nella cellula T insieme a un altro plasmide contenente trasposasi: il recettore chimerico si inserisce così in un punto casuale del genoma della cellula T.

È stato disegnato un trial di fase I/IIa, che prevede il trattamento di pazienti con LAL recidivati dopo trapianto allogenico con cellule CIK provenienti dal donatore, in cui è stato inserito il CAR anti-CD19 con trasfezione non virale. Il recettore chimerico utilizzato include oltre alle regioni variabili delle Ig anche CH2 e CH3, permettendo così di seguire le cellule CAR CIK al citofluorimetro. Il protocollo è stato approvato e nei primi pazienti trattati sono state osservate remissioni complete e ridotta tossicità (forse in relazione al tipo di cellula CIK).<sup>5</sup> Un possibile spazio per la tipizzazione immunologica in questo ambito è legato alla tipizzazione delle cellule CAR CIK per valutare il prodotto e al monitoraggio in vivo, al momento tuttavia ancora difficoltoso.

## Bibliografia

1. Xi B, Berahovich R, Zhou H, et al. A real-time potency assay for chimeric antigen receptor T cells targeting solid and hematological cancer cells. *J Vis Exp* 2019;153:1-9.
2. Biondi A, Magnani CF, Tettamanti S, et al. Redirecting T-cells with Chimeric Antigen Receptor (CAR) for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Autoimmun* 2017;85:141-52.
3. Arcangeli S, Rotiroti MC, Bardelli M, et al. Balance of anti-CD123 chimeric antigen receptor binding affinity and density for the targeting. *Mol Ther* 2017;25(8):1933-45.
4. Magnani CF, Mezzanotte C, Cappuzzello C, et al. Preclinical efficacy and safety of CD19CAR cytokine-induced killer cells transfected with sleeping beauty transposon for the treatment of acute lymphoblastic leukemia of acute myeloid leukemia. *Hum Gene Ther* 2018;29(5):602-13.
5. Magnani CF, Tettamanti S, Alberti G, et al. Transposon-Based CAR T-Cells in acute leukemias: where are we going? *Cells* 2020;27;9(6):1337.
6. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-Cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:439-48.
7. Sarikonda G, Pahuja A, Kalfoglou C, et al. Monitoring CAR-T cell kinetics in clinical trials by multiparametric flow cytometry: benefits and challenges. *Cytometry B Clin Cytom* 2020. Epub ahead of print.

# Bibliografia

1. Del Bufalo F, Locatelli F. Anticorpi e terapie cellulari: la rivoluzione dell'immunoterapia. *Prospettive in Pediatria* 2019;49(195):189-96.
2. Bucktrout SL, Bluestone JA, Ramsdell F. Recent advances in immunotherapies: from infection and autoimmunity, to cancer, and back again. *Genome Med* 2018;10 (79):1-10.
3. Le terapie geniche CAR-T. AIFA Agenzia del farmaco. <https://www.aifa.gov.it>
4. Brando B, Gatti A, Lurati AM, Faggioli PML. Monitoring anti-B cell immunotherapies in autoimmune diseases: Go with the flow. A Position Paper of the Italian Society for Clinical Cell Analysis (ISCCA). *Beyond Rheumatol* 2019;1:26.
5. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 5 marzo 2018, anno 159, n. 53, pag. 27.
6. Gatti A, Buccisano F, Scupoli MT, Brando B. The ISCCA flow protocol for the monitoring of anti-CD20 therapies in autoimmune disorders. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2021;100:194-205.
7. Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, et al. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocrine Rev* 2007;28(5):492-520.
8. Simmonds MJ, Gough SCL. Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity. *Br Med Bull* 2005; 71: 93-113.
9. Zhao P, Wang P, Dong, et al. Depletion of PD-1-positive cells ameliorates autoimmune disease. *Nat Biomed Eng* 2019;3:292-305.
10. Ellebrecht CT, Bhoj VG, Arben Nace A, et al. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science* 2016;353(6295):179-84.
11. Kansal R, Richardson N, Neeli I, et al. Sustained B cell depletion by CD19-targeted CAR T cell is a highly effective treatment for murine lupus. *Sci Transl Med* 2019;11(482):1-13.
12. Rodrigo C, Rajapakse S, Gooneratne L. Rituximab in the treatment of autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Clin Pharmacol* 2015;79:709-19.
13. Brodsky RA. Warm autoimmune hemolytic anemia. *N Engl J Med* 2019;381(7):647-5.
14. Michel M, Terriou L, Roudot-Thoraval F, et al. A randomized and double-blind controlled trial evaluating the safety and efficacy of rituximab for warm autoimmune hemolytic anemia in adults (the RAIHA study). *Am J Hematol* 2017;92(1):23-7.
15. Birgens H, Frederiksen H, Hasselbalch HC, et al. A phase III randomized trial comparing glucocorticoid monotherapy, versus glucocorticoid and rituximab in patients with autoimmune hemolytic anemia. *Br J Haematol* 2013;163:393-9.
16. Hill QA, Stamps R, Massey E, et al. Guidelines on the management of drug-induced immune and secondary autoimmune, haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2017;177(2):208-20.
17. Barcellini W. New insights in the pathogenesis of autoimmune hemolytic anemia. *Transfus Med Hemother* 2015;42:287-93.
18. Carson KR, Beckwith LG, Mehta J. Successful treatment of IgM-mediated autoimmune hemolytic anemia with bortezomib. *Blood* 2010;115(4):915.
19. Berentsen S. Complement activation and inhibition in autoimmune hemolytic anemia: focus on cold agglutinin disease. *Semin Hematol* 2018;55(3):141-9.
20. Gupta N, Wang ES. Long-term response of refractory primary cold agglutinin disease to eculizumab therapy. *Ann Hematol* 2014;93(2):343-4.
21. Cooper N, Ghanima W. Immune thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2019;381(10):945-55.
22. Page EE, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, et al. Rituximab reduces risk for relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2016;127(24):3092-4.
23. Chen H, Fu A, Wang J, et al. Rituximab as first-line treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Int Med Res* 2017;45(3):1253-60.
24. Westwood J-P, Thomas M, Alwan F, et al. Rituximab prophylaxis to prevent thrombotic thrombocytopenic purpura relapse: outcome and evaluation of dosing regimens. *Blood Adv* 2017;1:1159-66.

25. Boles JC, Key NS, Kasthuri R, et al. Single-center experience with rituximab as first-line immunosuppression for acquired hemophilia. *J Thromb Haemost* 2011;9(7):1429-31.
26. Lim MY, Nielsen B, Lee K, et al. Rituximab as first-line treatment for the management of adult patients with non-severe hemophilia A and inhibitors. *J Thromb Haemost* 2014;12(6):897-901.
27. Tinti MG, Carnevale V, Inglese M, et al. Eculizumab in refractory catastrophic antiphospholipid syndrome: a case report and systematic review of the literature. *Clin Exp Med* 2019;19:281.
28. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis* 2019;78(10):1296-304.
29. Feriozzi S. Ruolo della terapia con anticorpi monoclonali nelle nefropatie immuno-mediate: introduzione al problema. *G Ital Nefrol* 2012;29(3):268-73.
30. Polci R, Feriozzi S. Meccanismi della terapia immunologica nelle glomerulonefriti. *G Ital Nefrol* 2011;28(6):612-21.
31. Bomba AS, Derebail VK, McGregor JG, et al. Rituximab therapy for membranous nephropathy: a systematic review. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:734-44.
32. Bomba AS, Fervenza FC. Membranous Nephropathy: approaches to treatment. *Am J Nephrol* 2018;47(1):30-42.
33. McGrohan A, Franssen CFM, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:414-30.
34. Dahan K, Debiec H, Plaisier E, et al. Rituximab for severe membranous nephropathy: a 6-month trial with extended follow-up. *J Am Soc Nephrol* 2017;28(1):348-58.
35. Hanset N, Esteve E, Plaisier E, et al. Rituximab in patients with phospholipase A2 receptor-associated membranous nephropathy and severe CKD. *Kidney Int Rep* 2019;5(3):331-8.
36. Fervenza FC, Appel GB, Barbour SJ, et al. Rituximab or cyclosporine in the treatment of membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2019;381:36-46.
37. La Manna G, Baraldi O, Cuna V, et al. Membranous glomerulonephritis (MGN), ongoing studies. *G Ital Nefrol* 2017;34(5):113-8.
38. Barbari A, Chehadi R, Assouf HK, et al. Bortezomib as a novel approach to early recurrence membranous glomerulonephritis after kidney transplant refractory to combined conventional rituximab therapy. *Exp Clin Transplant* 2017;15(3):350-4.
39. Dammacco F, Tucci FA, Lauletta G, et al. Pegylated Interferon alpha, ribavirin, rituximab combined therapy for hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia. A long term study. *Blood* 2010;116:343-53.
40. De vita S, Quartuccio L, Isola M, et al. A randomized controlled trial of rituximab for the treatment of severe cryoglobulinemic vasculitis. *Arthritis Reum* 2012;64:843-53.
41. Galli M, Monti G, Marson P, et al. Recommendations for managing the manifestations of severe and life-threatening mixed cryoglobulinemia syndrome. *Autoimmunity Rev* 2019;18:778-85.
42. Cortazar FB, Rosenthal J, Laliberte K, John L Niles JL. Continuous B-cell depletion in frequently relapsing steroid-dependent and steroid resistant nephrotic syndrome. *Clin Kidney J* 2019;2:224-31.
43. Munyentwali H, Bouachi K, Audard V, et al. Rituximab is an efficient and safe treatment in adults with steroid-dependent minimal change disease. *Kidney Int* 2013;83:511-6.
44. Ochi A, Takei T, Nakayama K, et al. Rituximab treatment for adult patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Intern Med* 2012;51(7):759-62.
45. Colucci M, Carsetti R, Cascioli S, et al. B Cell Reconstitution after rituximab treatment in idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(6):1811-22.
46. Miyabe Y, Takei T, Iwabuchi Y, et al. Amelioration of the adverse effects of prednisolone by rituximab treatment in adults with steroid-dependent minimal-change nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol* 2016;20(1):103-10.
47. Marasà M, Cravedi P, Ruggiero B, Ruggenenti P. Refractory focal segmental glomerulosclerosis in the adult: complete and sustained remissions of two episodes of nephrotic syndrome after a single dose of rituximab. *BMJ Case Rep* 2014 Aug 25;2014:bcr2014205507.
48. Ravani P, Bonanni A, Rossi R, et al. Anti-CD20 antibodies for idiopathic nephrotic syndrome in children. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11(4):710-20.

49. Kamei K, Ishikura K, Sako M, et al.; Rituximab for Childhood-Onset Refractory Nephrotic Syndrome (RCRNS) Study Group. Long-term outcome of childhood-onset complicated nephrotic syndrome after a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial of rituximab. *Pediatr Nephrol* 2017;32(11):2071-8.
50. Kamei K, Ishikura K, Sako M, et al. Rituximab therapy for refractory steroid-resistant nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 2020;35(1):17-24.
51. El Khashab S, El Khashab O, El Ghoneimy M, AbdelRassoul MA. Rituximab as a preemptive treatment to prevent recurrence of primary focal segmental glomerulosclerosis: a novel approach. *Exp Clin Transplant* 2019;3:326-9.
52. Kumar J, Shatat IF, Skversky AL, et al. Rituximab in post-transplant pediatric recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 2013;28(2):333-8.
53. Kienzl-Wagner K, Rosales A, Scheidl S, et al. Successful management of recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Transplant* 2018;18:2818-22.
54. Sugiura H, Takei T, Itabashi, M et al. Effect of single-dose Rituximab on primary glomerular diseases. *Nephron Clin Pract* 2011;117:c98-c115.
55. Madanchi N, Bitzan M, Takano T. Rituximab in minimal change disease: mechanisms of action and hypotheses for future studies. *Can J Kidney Dis* 2017;4:1-15.
56. Hassan R, Gaffo AL. Rituximab in ANCA associated vasculitis. *Curr Rheumatol Rep* 2017;19: 6.
57. Sattui SE, Spiera RF. Treatment of antineutrophil cytoplasmatic antibody-associated vasculitis. Is there still a role for Cyclophosphamide? *Rheum Dis Clin N Am* 2019;45:379-98.
58. Whittam DH, Tallantyre EC, Jolles S, et al. Rituximab in neurological disease: principles, evidence and practice. *Pract Neurol* 2019;19:5-20.
59. Shin YW, Lee ST, Park K, et al. Treatment strategies for autoimmune encephalitis. *Ther Adv Neurol Disord* 2018;11:1-19.
60. Bandiera P, Battaglia MA. Barometro della Sclerosi Multipla Estratto. Associazione Italiana Sclerosi Multipla -Onlus, 2019.
61. Montalban X, Gold R, Thompson AT, et al. Clinical Guideline. ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Mult Scler J* 2018;24(2):96-120.
62. Pardo G, Jones DE. The sequence of disease-modifying therapies in relapsing multiple sclerosis: safety and immunologic considerations. *J Neurol* 2017; 264:2351-74.
63. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, et al. Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2017;376:209-20.
64. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus interferon beta-1 $\beta$  in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2017;376:221-34.
65. Novi G, Bovisc F, Capobiancod M, et al. Efficacy of different rituximab therapeutic strategies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler Relat Disord* 2019;36:101430.
66. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 2015;85:177-89.
67. Valentino P, Marnetto F, Letizia Granieri L, et al. Aquaporin-4 antibody titration in NMO patients treated with rituximab. A retrospective study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2017;4:e317.
68. Araki M, Aranami T, Matsuoka T, et al. Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. *Mod Rheumatol* 2013;23:827-31.
69. Pittock SJ, Berthele A, Fujihara K et al. Eculizumab in aquaporin-4-positive neuromyelitis optica spectrum disorder. *N Engl J Med* 2019;381:614-25.
70. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks *Arthritis Rheum* 2006;54:2793-806.
71. Ramwadhoebe TH, van Baarsen LGM, Boumans MJH, et al. Effect of rituximab treatment on T and B cell subsets in lymph node biopsies of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2019;58(6):1075-85.
72. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, et al. Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther* 2009;11(4):R131.

73. Lopez-Olivo MA, Amezaga Urruela M, McGahan L, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2015;1:CD007356.
74. Sellam J, Rouanet S, Hendel-Chavez H, et al. Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63(12):3692-701.
75. Humby F, et al. A Randomised, open labelled clinical trial to investigate synovial mechanisms determining response-resistance to rituximab versus tocilizumab in rheumatoid arthritis patients failing TNF inhibitor therapy. Presented at: 2019 ACR/ARP Annual Meeting; November 8-13, 2019; Atlanta, GA. Abstract 2824.
76. Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2019;78:736-45.
77. Gracia-Tello B, Ezeonyeji A, Isenberg D. The use of rituximab in newly diagnosed patients with systemic lupus erythematosus: long-term steroid saving capacity and clinical effectiveness. *Lupus Sci Med* 2017;4(1):e000182.
78. Aguiar, R., Araújo, C., Martins-Coelho, et al. Use of rituximab in systemic lupus erythematosus: a single center experience over 14 years. *Arthritis Care Res* 2017;69:257-62.
79. Kraaij T, Arends E, Dam LV, et al. Long-term effects of synergistic B-cell immunomodulation with rituximab and belimumab combination treatment in severe, refractory sle: two year results. *Ann Rheum Dis* 2019;78:91-2.
80. Verstappen GM, van Nimwegen JF, Vissink A, et al. The value of rituximab treatment in primary Sjögren's syndrome. *Clin Immunol* 2017;182:62-71.
81. Delli K, Haacke EA, Kroese FG, et al. In primary Sjögren's syndrome high absolute numbers and proportions of B cells in parotid glands predict responsiveness to rituximab as defined by ESSDAI, but not by SSRI. *Ann Rheum Dis* 2016;75(6):e34.
82. Aggarwal R, Bandos A, Reed AM, et al.; RIM Study Group, Oddis CV. Predictors of clinical improvement in rituximab-treated refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(3):740-9.
83. Rios Fernández R, Callejas Rubio JL, Sánchez Cano D, et al. Rituximab in the treatment of dermatomyositis and other inflammatory myopathies. A report of 4 cases and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27(6):1009-16.
84. Daoussis D, Melissaropoulos K, Sakellaropoulos G, et al. A multicenter, open-label, comparative study of B-cell depletion therapy with Rituximab for systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Semin Arthritis Rheum* 2017;46(5):625-31.
85. Jordan S, Distler JHW, Maurer B, et al.; on behalf of the EUSTAR Rituximab study group. Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann Rheum Dis* 2015;74:1188-94.
86. Thiebaut M, Launay D, Rivière S, et al. Efficacy and safety of rituximab in systemic sclerosis: French retrospective study and literature review. *Autoimmun Rev* 2018;17(6):582-7.
87. Elhai M, Boubaya M, Distler O, et al.; for EUSTAR network. Outcomes of patients with systemic sclerosis treated with rituximab in contemporary practice: a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis* 2019;78(7):979-87.
88. Pazzola G, Muratore F, Pipitone N, et al. Rituximab therapy for Takayasu arteritis: a seven patients experience and a review of the literature. *Rheumatology* 2018;57:1151-5.
89. Nomura, O., Fukuda, S., Ota, E. et al. Monoclonal antibody therapy for Kawasaki disease: a protocol for systematic reviews and meta-analysis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2016;5:60.
90. Phuong LK, Curtis N, Gowdie P, et al. Treatment options for Resistant Kawasaki disease. *Paediatr Drugs* 2018;20(1):59-80.
91. Bergantini L, d'Alessandro M, Cameli P, et al. Effects of rituximab therapy on B-cell differentiation and depletion. *Clin Rheumatol* 2020;39(5):1415-21.
92. Saleh Z, Arayssi T. Update on the therapy of Behçet disease. *Ther Adv Chronic Dis* 2014;112-34.
93. Sadreddini, S., Noshad, H., Molaeefard, M. et al. Treatment of retinal vasculitis in Behçet's disease with rituximab. *Mod Rheumatol* 2008;18:306.
94. Davatchi F, Shahram F, Chams-Davatchi C, et al. Behcet's disease in Iran: analysis of 6500 cases. *Int J Rheum Dis* 2010;13:367-73.
95. Guillevin L, Pagnoux C, Karras A, et al. Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2014;371(19):1771-80.





**edra**