

**PROPOSTA DI UN PROTOCOLLO PER LA PROFILASSI  
DELLA INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS  
IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI MIDOLLO  
MEDIANTE INFUSIONE DI CLONI LINFOCITARI  
CMV-SPECIFICI GENERATI IN VITRO**

Responsabili:

Prof. Pierluigi Rossi Ferrini  
Dr. Alessandro M. Vannucchi

Collaboratori:

Dr. Alberto Bosi  
Dr. Silvia Linari  
Dr. Stephanie Glinz  
Dr. Riccardo Saccardi  
Dr. Stefano Guidi  
Dr. Letizia Lombardini  
Dr. Alberto Grossi

La riattivazione del citomegalovirus (CMV) latente nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo e' causa di grave morbilita' e mortalita'. Sebbene la profilassi con aciclovir o ganciclovir abbia ridotto la incidenza delle complicazioni piu' importanti della riattivazione del CMV, la mortalita' da polmonite interstiziale dovuta a CMV oscilla ancora tra il 30 e il 60%. La infezione da CMV e' inoltre causa di depressione midollare e di complicanze gastrointestinali potenzialmente fatali; infine, sembra esistere una sorta di sinergismo (o facilitazione) tra comparsa della riattivazione del CMV e malattia trapianto contro ospite (GVHD). A cio' va aggiunto che la stessa terapia con ganciclovir e' gravata da neutropenia marcata, che accresce il rischio infettivo batterico gia' elevato in questi pazienti immunodepressi (1).

Poiche' la carenza di linfociti con citotossicita' anti-CMV, che persiste per un periodo di alcuni mesi dopo il trapianto in conseguenza della terapia di condizionamento, rappresenta il principale fattore patogenetico nella malattia da riattivazione del CMV, uno dei più promettenti approcci per la prevenzione della malattia citomegalica e' rappresentato dalla possibilita' di intervenire sulla condizione di carenza immunitaria, relativamente alla componente linfocitaria. Questa forma di immunoterapia adottiva si basa su osservazioni precedenti, relative sia al citomegalovirus in particolare che al virus di Epstein-Barr. Infatti, cloni di linfociti T-citotossici con specificita' anti-CMV possono essere isolati dal sangue periferico di soggetti con positivita' sierologica per il CMV; questi cloni sono rivolti contro le proteine strutturali del virus pp65 e pp150, che sono presentate ai linfociti T-citotossici prima che avvenga il completamento dell'assemblaggio del virione all'interno delle cellule infettate (2,3). Per quanto riguarda il virus di Epstein-Barr (EBV), l'infusione di popolazioni policlonali di linfociti del donatore e' stata utilizzata per il trattamento di quadri linfoproliferativi, EBV-associati, insorti nel ricevente dopo trapianto allogenico (4). Linfociti T-citotossici con specificita' anti-EBV possono essere ottenuti in vitro, e sono stati utilizzati con successo in terapia (5). Un ulteriore esempio di immunoterapia adottiva applicata a pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo, seppure con modalita' e finalita' diverse, e' rappresentato dalla infusione di linfociti del donatore per il trattamento delle ricadute di leucemia mieloide cronica dopo trapianto allogenico (6).

In un recente studio di Fase I (7) e' stata valutata la fattibilita', sicurezza, ed efficacia della reinfusione di cloni di linfociti sensibilizzati contro il CMV in pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo allogenico.

La procedura descritta prevede la selezione di cloni di linfociti CD8 con specificita' anti-CMV dal donatore, CMV-positivo, e la loro espansione in vitro prima della reinfusione nei riceventi.

Schematicamente, la procedura prevede:

- 1-purificazione di linfociti dal sangue periferico dei donatori CMV+
- 2-selezione di cloni linfocitari con attivita' citolitica CMV-specifica dopo rimozione (con anticorpo monoclonale) dei linfociti CD4+
- 3- espansione in vitro dei cloni CD8+, in presenza di IL-2 e di anticorpo anti-CD3 (o fibroblasti autologhi infettati con CMV)
- 4- caratterizzazione dei cloni con attivita' anti-CMV per escludere la presenza di cellule CD4+ prima della reinfusione
- 5- reinfusione dei cloni generati nei pazienti trapiantati.

I cloni linfocitari così ottenuti sono stati reinfusi, in quattro somministrazioni diverse, a partire dal primo mese dopo il trapianto, in 14 pazienti sottoposti a

trapianto allogenico da donatore familiare HLA-compatibile. Il riarrangiamento dei geni per il T-cell receptor, analizzato mediante tecniche di PCR, è stata utilizzato come marcatore per valutare la presenza e la sopravvivenza dei cloni linfocitari con specificità anti-CMV nel ricevente. I risultati di questo studio indicano che la procedura permette il trasferimento dell'immunità anti-CMV per almeno 12 settimane dopo la fine della reinfusione, senza segni alcuno di tossicità, e con la completa assenza di manifestazioni della malattia citomegalica, o della sola viremia CMV. In 11 dei 14 pazienti così trattati, la attività citotossica anti-CMV risultava sovrapponibile ai livelli dei donatori normali. Infine, la rimozione dei linfociti CD4+ ha permesso di eliminare il rischio di comparsa di malattia da trapianto contro ospite (GVHD), che è prevalentemente mediata da cloni di linfociti CD4+.

Considerata la potenziale importanza di questa procedura, è nostra intenzione allestire la metodica descritta, in fase iniziale su piccola scala al fine di valutarne la fattibilità tecnica, prima di poterne programmare l'applicazione clinica. Mentre le attrezzature di laboratorio necessarie sono quasi interamente disponibili presso i laboratori annessi alla Divisione di Ematologia, l'alto costo e la unicità dei reagenti richiedono un finanziamento, che si può prevedere approssimativamente nell'ordine di cento milioni, necessario per l'attivazione della fase preliminare di messa a punto del sistema e le prime applicazioni cliniche. Questa cifra è rivolta, come dettagliato di seguito, all'acquisto delle plastiche di laboratorio, delle linee cellulari necessarie per la espansione del CMV e dei reattivi per la loro coltura, degli anticorpi monoclonali necessari per la caratterizzazione e purificazione dei cloni CD8+, dei reattivi di biologia molecolare per il monitoraggio della presenza del CMV. Inoltre, sono richieste piccole apparecchiature di laboratorio per metodiche di biologia molecolare ed un incubatore a CO<sub>2</sub> specificamente dedicato alla coltura delle linee cellulari infettate dal CMV (che, per ovvi motivi, non può essere effettuata negli incubatori, già a nostra disposizione, che sono utilizzati per altre colture cellulari). Infine, si prevede il pagamento di personale non strutturato, laureato e/o tecnico di laboratorio, per un periodo di anni uno, esclusivamente impegnato nella ricerca di cui sopra.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI ESSENZIALI

1. FORMAN SJ, et al. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do we stand?. *blood* 1994; 83: 2393.
2. RIDDELL SR, et al. Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol* 1991; 146:2795.
3. McLAUGHIN-TAYLOR E, et al. identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* 1994; 43:103.
4. PAPADOPOULOS ED, et al. Infusion of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *New Engl J Med*; 1994; 330:1185.
5. ROONEY CM, et al. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345:9.
6. PORTER DL, et al. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 1994; 330:100.
7. WALTER EA, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *New Engl J Med* 1995; 333:1038.