



*Istituto
Gaslini*

*per la cura, difesa ed assistenza
dell'infanzia e della fanciullezza*

ISTITUTO A CARATTERE SCIENTIFICO

16148 Genova Quarto
Telefono 010 56361

UNITÀ OPERATIVA DI NEFROLOGIA

Modulo Assistenza Trapianti

010-5636 643

Fax

010-395214

E-mail fabrizioginevri@ospedale-gaslini.ge.it

Titolo Progetto: MONITORAGGIO E TRATTAMENTO DELLA INFEZIONE DA POLYOMAVIRUS BK (BKV) NEL TRAPIANTO DI RENE IN ETÀ PEDIATRICA.

Coordinatore: Fabrizio Ginevri, l'Unità Operativa di Nefrologia dell'Istituto Gaslini di Genova

Unità Operative Partecipanti: Alberta Azzi, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Firenze (Sezione di Virologia); Patrizia Comoli, Laboratorio di Immunologia, Dipartimento di Pediatria, Policlinico San Matteo, Pavia.

Razionale e scopo dello studio

Le complicanze legate alla infezione da polyomavirus BK (BKV) incidono in modo significativo sulla sopravvivenza dei trapianti di rene. La terapia immunosoppressiva utilizzata per impedire il rigetto altera la risposta immunitaria, favorendo l'infezione primaria o la riattivazione dallo stato di latenza di BKV, e, in conseguenza del mancato controllo della replicazione virale, l'insorgenza delle patologie associate. L'infezione da BKV è causa di nefrite interstiziale, con perdita di funzione dell'organo trapiantato, nel 2-10% dei riceventi un trapianto renale. La riduzione della terapia immunosoppressiva, unica possibilità in assenza di una terapia antivirale specifica di provata efficacia, aumenta il rischio di rigetto, inducendo un circolo vizioso dovuto alla necessità di potenziare nuovamente l'immunosoppressione. Il ruolo centrale dell'immunità cellulo-mediata nel controllo delle infezioni virali è stato ampiamente documentato. E' stato recentemente dimostrato come sia possibile ricostituire l'immunità cellulare virus-specifica, e prevenire o trattare le complicanze associate all'infezione virale, in riceventi di trapianto di midollo, mediante infusione di popolazioni di linfociti T citotossici (CTL) specifici per EBV e cytomegalovirus derivati dal sangue periferico dei loro donatori. Un'analoga strategia terapeutica può essere applicata a riceventi di trapianto d'organo solido, riattivando ed espandendo in vitro CTL antigene-specifici autologhi, in mancanza di un donatore HLA-fenotipicamente identico.

Finanziamento 2002: risultati ottenuti

Obiettivi della prima fase della ricerca

1) In merito al primo obiettivo, valutazione dell'incidenza di questa infezione nella popolazione in studio e monitoraggio dell'insorgenza di infezione primaria e/o riattivazione nel periodo post-trapianto, con lo scopo di attuare l'intervento terapeutico atto a prevenire lo sviluppo delle complicanze: è stata condotta un'analisi trasversale dell'infezione da BKV su 100 pazienti di età pediatrica, trapiantati di rene ed afferenti all'Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto dell'Istituto Gaslini, Genova. La determinazione dei livelli di BKV DNA ha evidenziato positività urinaria in 26/100 pazienti, con concomitante positività plasmatica in 5 soggetti. L'analisi dei fattori di rischio ha dimostrato un'associazione significativa tra infezione attiva da BKV e i) sieronegatività del ricevente pre-trapianto, e ii) trattamento immunosoppressivo con micofenolato mofetile.

Pubblicazioni rilevanti:

- Ginevri F, De Santis R, Comoli P, N Pastorino, C Rossi, G Botti, I Fontana, A Nocera, M Cardillo, MR Ciardi, F Locatelli, R Maccario, F Perfumo, A Azzi: Polyomavirus BK infection in pediatric kidney allograft recipients: a single center analysis of incidence, risk factors and novel therapeutic approaches. *Transplantation* 2003; 75: 1266-70.
- F Ginevri, N Pastorino, R de Santis, I Fontana, A Sementa, G Losurdo, A Santopietro, F Perfumo, F Locatelli, R Maccario, A Azzi, P Comoli. Retransplantation after kidney graft loss due to polyoma BK virus nephropathy: successful outcome without original allograft nephrectomy. *Am J Kidney Dis* 2003, submitted.

2) Per quanto concerne il secondo obiettivo, generazione in vitro e l'espansione di popolazioni di linfociti T citotossici (CTL) BKV-specifici dal sangue periferico dei pazienti risultati positivi per riattivazione virale: è stata dimostrata la possibilità di riattivare linee cellulari citotossiche specifiche per BKV da soggetti sani di controllo e da riceventi un trapianto renale. Le linee ottenute hanno caratteristiche fenotipiche e funzionali tali da consentirne l'uso in vivo.

Pubblicazioni rilevanti:

- P Comoli, S Basso, A Azzi, A Moretta, R De Santis, F Del Galdo, R De Palma, U Valente, A Nocera, F Perfumo, F Locatelli, R Maccario, F Ginevri: Dendritic cells pulsed with polyomavirus BK antigen induce ex vivo BKV-specific cytotoxic T cell lines in seropositive healthy individuals and renal transplant recipients. *Blood* 2003, submitted.

Prosecuzione dello studio

Obiettivi della seconda fase della ricerca

- 1) Non esistono a tutt'oggi indicazioni sulla validazione di un test predittivo del rischio di sviluppare nefropatia, elemento cruciale per attuare un trattamento dell'infezione virale attiva finalizzato a prevenire l'instaurarsi della nefropatia conclamata. L'obiettivo in questa fase della ricerca sarà di analizzare, mediante PCR quantitativa, la carica virale urinaria in una coorte di pazienti pediatrici trapiantati di rene con infezione attiva da BKV, al fine di verificare la possibilità di individuare livelli di BKV DNA urinari predittivi di viremia e di danno renale. Questo potrebbe consentire un trattamento precoce, al fine di evitare la progressione verso il danno renale conclamato, mediante impiego delle seguenti strategie: i) riduzione dell'immunosoppressione; ii) nuovi farmaci anti-virali; iii) terapia cellulare con linfociti T citotossici BKV-specifici.
- 2) Sulla scorta delle indicazioni ottenute dallo studio in vitro effettuato in precedenza, e utilizzando metodiche messe a punto dal nostro gruppo, verrà analizzata la risposta immunitaria cellulare specifica per BKV in pazienti sottoposti a trapianto renale, con lo scopo di individuare condizioni di immunodeficienza specifica eventualmente associate al rischio di sviluppo di patologia BKV-correlata. I test utilizzati in questa fase della ricerca potrebbero essere utilizzati anche per la valutazione dell'efficacia clinica di un trattamento preventivo.

Metodologia

Il programma di ricerca prevede le seguenti, ulteriori fasi:

1. **Arruolamento dei pazienti:** nei pazienti sottoposti a trapianto di rene e seguiti presso l'Unità Operativa di Nefrologia dell'Istituto Gaslini di Genova la pregressa esposizione al virus BK verrà valutata mediante studio sierologico pre-trapianto. Nei pazienti sieronegativi pre-trapianto verrà valutata la sierologia del donatore.
2. **Monitoraggio della infezione attiva da BKV nella popolazione oggetto di studio:** in questa fase è previsto il monitoraggio con tecniche di PCR qualitativa/quantitativa della presenza di

DNA virale su campioni di siero e urine. L'analisi sequenziale della viruria, confrontata ai dati di viremia, potrebbe consentire di individuare livelli di BKV-DNA urinari predittivi di viremia e danno renale, contribuendo così a evidenziare gruppi di pazienti a rischio di sviluppare complicanze virus-correlate. Verranno arruolati in protocolli terapeutici innovativi i pazienti con le seguenti caratteristiche: pazienti con nefropatia interstiziale virus-correlata (identificazione e quantificazione del DNA virale nel tessuto renale); pazienti con persistente presenza di quantità elevate di DNA virale nelle urine e/o nel plasma.

3. **Valutazione dell'immunità cellulare BKV-specifica dopo trapianto renale:** in questa fase è previsto una valutazione prospettica dell'immunità cellulare BKV-specifica, mediante monitoraggio seriato dei seguenti parametri: i) attività citotossica virus-specifica di linee CTL riattivate dal periferico dei pazienti, misurata in test standard di lisi di cellule target recanti gli antigeni rilevanti, e comparata con la lisi di cellule non infettate; ii) analisi della frequenza di precursori T cellulari virus-specifici, mediante valutazione della produzione specifica di citochine in saggio ELISPOT.
4. **Generazione di linee cellulari T citotossiche (CTL) virus-specifiche:** l'attivazione di CTL virus-specifici verrà ottenuta attraverso il seguente schema: a) preparazione di popolazioni di cellule presentanti l'antigene (APC), da utilizzare per stimolare in vitro la riattivazione di CTL virus-specifici. In particolare, partendo da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di donatori immunocompetenti e dei pazienti oggetto dello studio, verranno generate cellule dendritiche pulsate con BKV inattivato; b) stimolazione in vitro di PBMC di donatori immunocompetenti e dei pazienti oggetto dello studio con le APC descritte al punto a. Verranno stabilite le condizioni ottimali, in termini di numero di cellule *responder*, numero di APC e dose di antigene da utilizzare per pulsare la cellula dendritica per ottenere la riattivazione in vitro di popolazioni di cellule T citotossiche CD8+, HLA-classe I-ristrette o non ristrette virus-specifiche.
5. **Analisi delle caratteristiche di specificità e di sterilità dei CTL virus-specifici:** i CTL, ottenuti secondo il protocollo descritto al punto 3, verranno valutati per immunofenotipo di membrana mediante marcatura con anticorpi monoclonali e analisi citofluorimetrica, per stabilire le percentuali relative delle sottopopolazioni presenti nella linea. Inoltre, le linee saranno testate in un saggio di citotossicità standard a 5 ore contro un pannello di cellule target, tra cui APC infettate e non infettate, e cellule non emopoietiche autologhe o allogene, per determinarne la specificità. Il prodotto finale verrà sottoposto a rigorosi test per escludere la presenza di inquinanti batterici, virali e micotici, ed analizzato per escludere la presenza di endotossine, e quindi criopreservato in aliquote (1 dose di 10×10^6 CTL per aliquota) per l'infusione.
6. **Somministrazione delle linee CTL virus-specifiche:** due dosi da $1-2 \times 10^7$ CTLs verranno somministrate per via endovenosa, a distanza di circa 15 giorni, ai pazienti considerati eleggibili per essere arruolati nel protocollo di terapia cellulare, dopo aver ottenuto un consenso informato. I CTL scongelati verranno risospesi in soluzione fisiologica addizionata del 5% di albumina umana in un volume finale tra 10 e 20 mL prima dell'infusione. Le infusioni potranno essere ripetute in caso di necessità e previo nuovo controllo dei criteri di eleggibilità.
7. **Monitoraggio degli eventuali effetti collaterali e valutazione dell'efficacia clinica del trattamento:** in questa fase è prevista la valutazione dell'efficacia clinica del trattamento cellulare adottivo attraverso controlli dell'obiettività clinica, dei parametri biochimici rilevanti alla patologia in esame, e di idonee valutazioni istologiche quando necessarie. Controlli seriatati dei livelli di DNA virus-specifico permetteranno di correlare le eventuali modificazioni dei parametri sopra riportati con la possibile attività anti-virale osservata in vivo. Saranno inoltre raccolti campioni seriatati di cellule mononucleate del sangue periferico per l'effettuazione di eventuali studi di efficacia immunologica. Il monitoraggio di eventuali effetti avversi dovuti all'infusione di CTL sarà condotto secondo i criteri standard stabiliti dal WHO.

8. **Valutazione della ricostituzione dell'immunità cellulare virus-specifica prima e dopo somministrazione delle linee in protocolli di immunoterapia adottiva:** la ricostituzione dell'immunità cellulare virus-specifica dopo infusione dei CTL autologhi verrà valutata come al punto 3.

Bibliografia

1. Nickeleit V, Hirsch HH, et al. BK-virus nephropaty in renal transplants-tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 324-32
2. Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, et al. Testing for Polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 2000; 342: 1309-15
3. Randhawa PS, Demetris AJ. Nephropathy due to Polyomavirus Type BK. *N Engl J Med* 2000; 342: 1361-63
4. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, et al. Human Polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67 (1): 103-109
5. Shah KV. Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 754-5
6. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1080-1089
7. Binet I, Nickeleit V, Hirsch HH, et al. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs. *Transplantation* 1999; 67:918-22.
8. Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:405-31.
9. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, et al. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992; 257:238.
10. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin S, Li C, Krance RA, Brenner KM. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345:9-12.
11. Comoli P, Locatelli F, Gerna G, Grossi P, Viganò M, Maccario R. Autologous EBV-specific cytotoxic T cells to treat EBV-associated post transplant lymphoproliferative disease (PTLD). *Blood* 1997; 90 (Suppl. 1): 249a.
12. Khanna R, Bell S, Sherritt M, et al. Activation and adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *PNAS* 1999; 96:10391-96.
13. P Comoli, M Labirio, S Basso, F Baldanti, P Grossi, M Furione, M Viganò, R Fiocchi, G Rossi, F Ginevri, B Gridelli, A Moretta, D Montagna, F Locatelli, G Gerna, R Maccario. Infusion of autologous EBV-specific cytotoxic t cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood* 2002; in press.
14. Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, Santos GW, Saral R. Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med* 1986; 315:230.
15. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180:83.
16. Luckacher AE, Moser JM, Hadley A, Altman JD. Visualization of polyoma Virus-specific CD4+ T cells in vivo during infection and tumor rejection. *J. Immunol* 1999; 163: 3369-78.
17. Azzi A, Fanci R, Bosi A, et al. Monitoring of polyomavirus BK viruria in bone marrow transplantation patients by DNA hybridization assay and by polymerase chain reaction: an approach to assess the relationship between BK viruria and hemorrhagic cystitis. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14:235-40.