

***Alma Mater Studiorum – Università di Bologna***

**DOTTORATO DI RICERCA**

**Ematologia clinica e sperimentale ed Ematopatologia**

**Ciclo XXI**

Settore scientifico disciplinare di afferenza: **Malattie del sangue MED/15**

**TITOLO TESI**

**Selezione e processazione di cellule Natural Killer  
da donatore aploidentico “KIR-ligand” incompatibile per  
l’immunoterapia adottiva di pazienti con Leucemia Acuta  
Mieloblastica ad alto rischio**

Presentata da: **Dr.ssa Elisa Dan**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof. S. PILERI**

**Prof. R.M. LEMOLI**

Esame finale anno 2008

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
1. Le cellule Natural Killer .....	3
1.1 <i>Origine e differenziamento</i> .....	4
1.2 <i>Ruolo fisiologico</i> .....	5
1.3 <i>Attività citolitica</i> .....	6
1.4 <i>Recettori delle cellule NK</i> .....	7
1.5 <i>Recettori Killer Immunoglobulin-like (KIR)</i> .....	9
2. Ruolo delle cellule NK nel trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche .....	12
3. Immunoterapia con cellule NK aploidentiche purificate .....	15
<b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....	17
<b>PAZIENTI E METODI</b> .....	18
4. Pazienti .....	18
5. Selezione e processazione delle cellule NK di donatore.....	20
5.1 <i>Selezione immunomagnetica “doppio step”</i> .....	20
5.2 <i>Criopreservazione del prodotto purificato</i> .....	22
6. Analisi della funzionalità delle cellule NK purificate.....	23
7. Chemioterapia immunosoppressiva e infusione delle cellule NK alloreattive .....	23
8. Saggi di Microchimerismo .....	24
9. Analisi dell’apoptosi di cellule NK indotta da cellule leucemiche ..	24

<b>RISULTATI</b> .....	25
10. Analisi della procedura di selezione .....	25
11. Infusione delle cellule NK nei pazienti con LAM .....	28
12. Risposta clinica e follow-up dei pazienti .....	31
<b>DISCUSSIONE</b> .....	33
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	35

# INTRODUZIONE

## **1. Le cellule Natural Killer**

Le cellule Natural Killer (NK) costituiscono il 10-15% dei linfociti circolanti e hanno un ruolo cruciale nell'immunità innata attraverso la lisi delle cellule target e il rilascio di molecole immunoregatorie, senza che ci sia il riconoscimento di un antigene specifico o una pregressa sensibilizzazione.

Morfologicamente si presentano come "Large granular lymphocytes" (LGL) e fenotipicamente sono caratterizzate dall'espressione degli antigeni di superficie CD56 (NKH-1, Leu-19) e CD16 (Fc $\gamma$  R III) (1). L'antigene CD56, isoforma della molecola di adesione delle cellule neuronali NCAM, è responsabile dell'interazione tra le cellule NK e le cellule bersaglio, mentre il CD16, come recettore a bassa affinità della porzione Fc delle immunoglobuline G, è coinvolto nella citotossicità cellulare anticorpo mediata (2).

Le cellule NK, non riarrangiando i geni del recettore dei linfociti T, non esprimono neppure il corecettore CD3, a differenza di una sottopopolazione di linfociti T (5%), anch'essa con attività citotossica antigene-indipendente, che esprime sia CD56 che CD3.

In base alla densità di superficie degli antigeni CD56 e CD16 si sono individuate due sottopopolazioni: le cellule che esprimono CD56 a bassa intensità (CD56<sup>dim</sup>) e CD16 ad alta intensità (circa 90%) e le cellule che esprimono CD56 ad alta intensità (CD56<sup>bright</sup>) e sono negative per CD16 o lo esprimono a bassa intensità (figura 1). Le cellule CD56<sup>dim</sup> svolgono prevalentemente un'azione citotossica, mentre le cellule CD56<sup>bright</sup> sono principalmente cellule secernenti citochine (2).

Un ruolo centrale nella regolazione delle cellule NK lo ricopre la citochina interleuchina 2 (IL-2) che, legando i recettori ad intermedia ed alta affinità costitutivamente espressi, induce la proliferazione delle cellule CD56<sup>bright</sup> ed incrementa l'attività citolitica nelle cellule CD56<sup>dim</sup>.

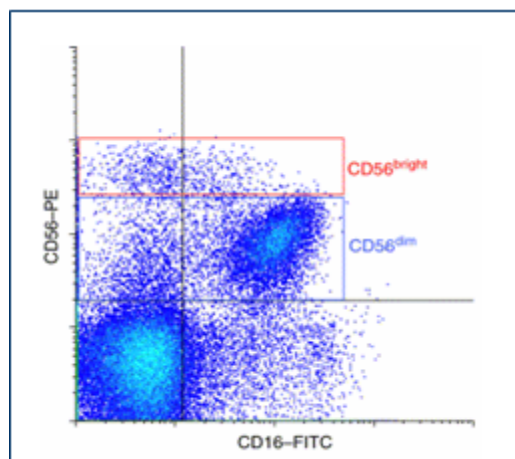


Figura 1. Analisi citofluorimetrica delle cellule NK

## 1.1 Origine e differenziamento

Le cellule NK derivano da progenitori del midollo osseo CD34+/Lin- e necessitano del microambiente midollare per completare la maturazione; infatti lo stroma produce sia i fattori di crescita KL (ligando di c-kit) e FL (ligando di flt3) che agiscono nelle prime fasi di sviluppo, che l'interleuchina 15 (IL-15), che trasforma il precursore NK intermedio in una cellula NK funzionale CD56<sup>bright</sup> (2). Per spiegare l'origine delle cellule CD56<sup>dim</sup> sono state formulate diverse ipotesi, come l'esistenza di un precursore alternativo o di altri fattori che agiscono sul precursore CD34+/IL-15R+, ma quella più accreditata suggerisce che le CD56<sup>dim</sup> derivino dalle CD56<sup>bright</sup> (figura 2).

La maggior parte delle cellule NK, dopo il rilascio dal midollo osseo, resta in circolo o migra nella milza, mentre una quota molto esigua è rilevabile nel timo o nei linfonodi (1).

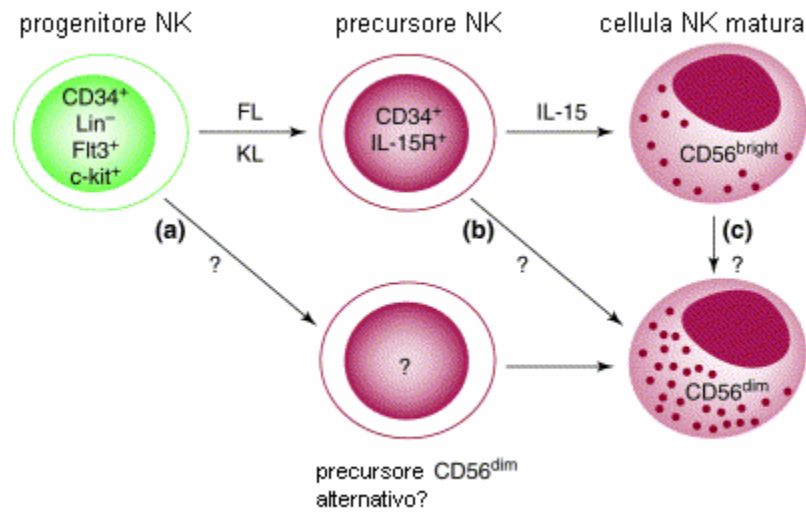


Figura 2. Origine e differenziamento delle cellule NK

## 1.2 Ruolo fisiologico

Le cellule NK intervengono nelle prime fasi della risposta immunitaria attraverso:

- la secrezione di citochine, come il “tumor necrosis factor  $\beta$ ” (TNF- $\beta$ ), l’interferone  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), la IL-10, la IL-13 e il fattore di crescita dei granulociti-macrofagi (GM-CSF). Mediante la produzione di queste citochine, le cellule NK agiscono sulla risposta infiammatoria, modulano l’immunità adattiva ed inducono la maturazione delle cellule dendritiche; inoltre le cellule NK sono coinvolte nella regolazione dell’emopoiesi;
- l’attività citotossica mediata da recettori di membrana denominati Recettori Natural Killer (NKR) e anticorpo mediata (ADCC) per l’eliminazione di cellule infettate da virus e cellule tumorali (2).

La figura 3 schematizza l’espressione dei recettori e la secrezione di citochine delle due popolazioni di cellule NK; si può vedere come le cellule  $CD56^{dim}$  abbiano una attività citotossica più spiccata rispetto alle cellule NK  $CD56^{bright}$  che sono principalmente cellule secernenti (2).

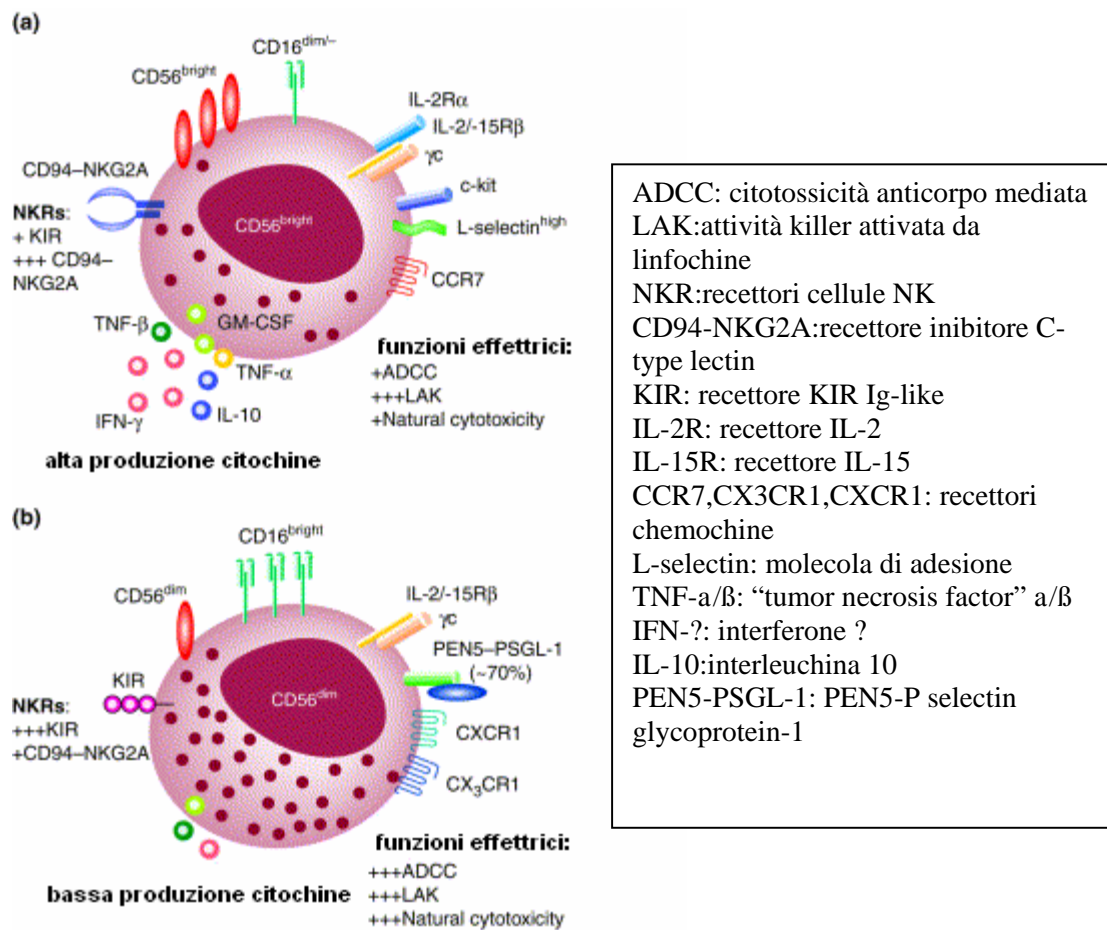


Figura 3. (a) cellula NK CD56<sup>bright</sup>, (b) cellula NK CD56<sup>dim</sup>

### 1.3 Attività citolitica

Le cellule NK svolgono la loro funzione di cellule effettrici attraverso la citossicità "anticorpo-indipendente non-MHC-restricted", mediata dai recettori NK di superficie, e la ADCC, mediata dall'antigene CD16. Nonostante queste due attività citotossiche implicino l'attivazione di cascate di segnalazione intracellulari differenti, i meccanismi effettori terminali sono gli stessi e hanno come risultato finale l'apoptosi della cellula bersaglio.

La cellula NK presenta nel citoplasma dei granuli litici che contengono molecole, come perforina, granzimi e granzulina, che inducono apoptosi. Quando la cellula NK

riconosce la cellula bersaglio si ha la degranolazione: le molecole litiche vengono rilasciate nel punto di contatto cellula-cellula (3).

I granzimi sono proteine solubili della famiglia delle serin-proteasi in grado di attivare le caspasi, enzimi cruciali del processo apoptotico, e di agire direttamente frammentando il filamento di DNA e idrolizzando proteine. La granulisina è una piccola proteina cationica che interagisce con i lipidi della membrana mitocondriale della cellula bersaglio danneggiandola, con conseguente rilascio del citocromo-C e diminuzione della funzionalità mitocondriale (3).

La perforina all'interno dei granuli è in forma monometrica, ma una volta ancorata alla membrana citoplasmatica della cellula target polimerizza formando dei pori transmembrana. Attraverso i pori avviene l'ingresso dei granzimi e della granulisina e lo scambio di ioni che genera uno sbilanciamento osmotico.

Le cellule NK promuovono la lisi cellulare anche attraverso la secrezione di tossine solubili; il fattore citotossico NK più importante è il TNF che, legandosi al suo recettore (TNFR) sulla cellula bersaglio, innesca una via di segnalazione intracellulare che ha come eventi finali l'attivazione della cascata delle caspasi e le alterazioni mitocondriali (3).

## **1.4 Recettori delle cellule NK**

I recettori NK si dividono in attivatori ed inibitori, in base al tipo di effetto che hanno sull'attività citotossica. I recettori inibitori più importanti sono i "Killer immunoglobulin-like receptor" (KIR) e il recettore eterodimerico CD94-NKG2A, contenente domini lectinici "C-type" nella porzione extracellulare. Essi hanno come ligandi le molecole del sistema maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC classe I). Gli antigeni MHC di classe I, HLA-A, -B e -C e i non classici HLA-E,-G ed -F, sono espressi costitutivamente in quasi tutte le cellule nucleate dell'organismo, anche se con diversa intensità, e sono in grado di presentare gli antigeni ai linfociti T citotossici, innescando una risposta immunitaria contro cellule infettate da virus e



cellule allogeniche. Gli antigeni MHC di classe I sono eterodimeri costituiti da una catena  $\alpha$ , altamente polimorfica, non covalentemente legata alla  $\beta$ 2-microglobulina. Spesso le cellule infettate da virus o trasformate, per sfuggire al sistema immunitario, diminuiscono o perdono l'espressione delle molecole MHC di classe I e, secondo l'ipotesi del "missing-self" di Ljunggren e Kärre (4), è proprio questa alterazione che le rende bersaglio delle cellule NK.

Nella famiglia dei KIR ci sono anche recettori attivatori che hanno gli stessi ligandi di quelli inibitori.

Recentemente sono stati identificati altri recettori sulla superficie delle cellule NK (NKR), come i recettori della citossicità naturale (NKp46, NKp30, NKp44), e co-recettori, che riconoscono molecole non MHC. La maggior parte di queste molecole vengono sovraespresse o espresse *de novo* in cellule sottoposte a stress, attivazione cellulare, infezione virale e trasformazione tumorale (5). *In vitro*, cellule di leucemia acuta mieloblastica, di leucemia mieloide cronica, di leucemia acuta linfoblastica T, di leucemia linfatica cronica, di linfoma non Hodgkin e di mieloma multiplo vengono lisate da cellule NK alloreattive (6); alcune leucemie acute linfoblastiche (fenotipo "common" dell'adulto) sono risultate resistenti all'azione delle NK alloreattive, probabilmente perché il clone neoplastico non esprime LFA-1, molecola di adesione indispensabile per l'interazione tra la cellula NK e la cellula bersaglio (7).

La cellula NK stabilisce il contatto con la potenziale cellula target attraverso l'interazione dei suoi recettori, attivatori ed inibitori, con i ligandi disponibili sulla superficie di membrana di quest'ultima. L'integrazione dei segnali trasdotti dai NKR attivati determina l'attivazione o l'inibizione dell'attività citotossica. La figura 4 A mostra il caso in cui la cellula target presenta solo i ligandi per NKR inibitori e non viene lisata, situazione che si presenta quando la cellula NK incontra una cellula normale. Se la cellula target presenta solo i recettori per i ligandi attivatori e non esprime MHC di classe I, per esempio cellule infettate da virus e cellule trasformate, diventa bersaglio dell'azione citotossica delle cellule NK (figura 4 B).

Evidenze sperimentali suggeriscono che il grado di inibizione degli NKR inibitori è proporzionale alla quantità di molecole MHC di classe I espresse dalla cellula target (figura 4 D) (8).

Inoltre, in modelli sperimentali, è stato osservato che l'attivazione simultanea di più recettori attivatori o l'attivazione di un recettore attivatore "potente" (8) permette alle cellule NK di eliminare cellule target anche se esprimono i ligandi dei recettori inibitori (figura 4 C). Comunque l'interazione tra i recettori NK inibitori e le molecole MHC di classe I rappresenta il checkpoint più importante nella regolazione dell'attivazione delle cellule NK e per questo ogni cellula NK esprime almeno un recettore KIR inibitore che riconosce il "self" (9).

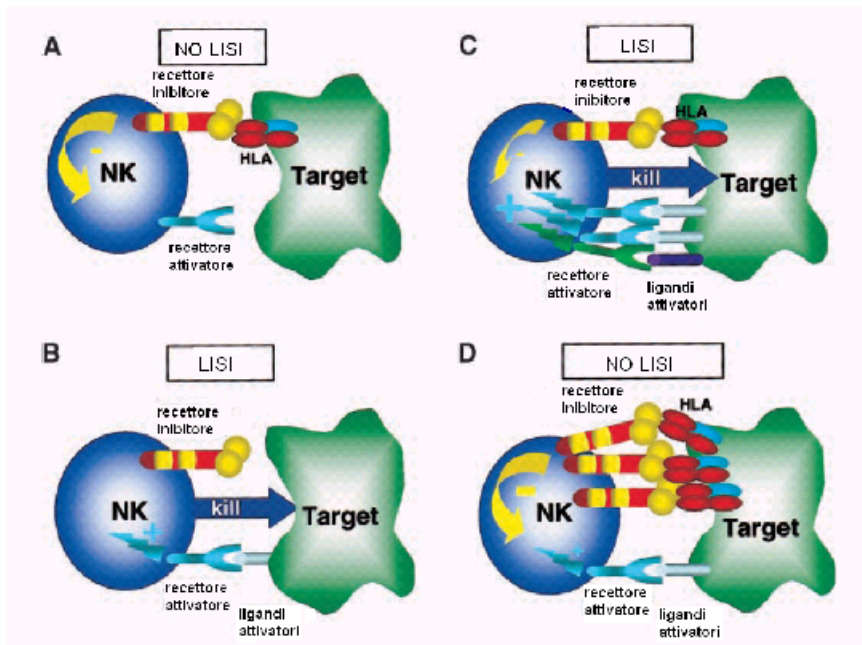


Figura 4. Regolazione dell'attività citolitica delle cellule NK verso una cellula bersaglio

### 1.5 Recettori Killer Immunoglobulin-like (KIR)

I recettori KIR appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline e sono strutturalmente caratterizzati da 2 o 3 domini immunoglobulinici extracellulari (KIR2 e KIR3). Si dividono in inibitori ed attivatori ed avendo gli stessi domini

extracellulari riconoscono gli stessi antigeni: HLA-A, HLA-B e HLA-C di MHC di classe I, anche se i KIR inibitori hanno un'affinità di legame maggiore. I geni KIR clusterizzano in una regione di 150 kb sul cromosoma 19q13.4 e c'è un'alta omologia di sequenza tra i geni che codificano per i recettori attivatori e quelli che codificano per gli inibitori (5).

I due gruppi di recettori differiscono per i domini transmembrana e per la lunghezza delle code dei domini citoplasmatici, lunghe (long-L) nei KIR inibitori e corte (short-S) negli attivatori; proprio questi domini determinano le cascate di segnalazione che si innescano al contatto con il ligando. L'unica eccezione è il recettore KIR2DL4 che è attivatore nonostante le code citoplasmatiche lunghe e riconosce l'HLA-G, molecola esclusivamente espressa nel feto. Nella tabella 1 sono riassunti i recettori KIR ed i rispettivi ligandi, se conosciuti (5,10).

<b>KIR ATTIVATORI</b>	<b>LIGANDI</b>	<b>KIR INIBITORI</b>	<b>LIGANDI</b>
2DS1	HLA-C gruppo 2	2DL1	HLA-C gruppo 2
2DS2	HLA-C gruppo 1	2DL2	HLA-C gruppo 1
2DS3	sconosciuto	2DL3	HLA-C gruppo 1
2DS4	sconosciuto	2DL5	sconosciuto
2DS5	sconosciuto	3DL1	HLA-Bw4
2DL4	HLA-G,-A3,-B46	3DL2	HLA-A3,-A11
3DS1	sconosciuto	3DL3 (o 3DL7)	sconosciuto

Tabella 1. recettori KIR e ligandi specifici. HLA-C gruppo 1 (Ser77-Asn80): -Cw1,-Cw3,-Cw7,-Cw8; HLA-C gruppo 2 (Asn77-Lys80): -Cw2,-Cw4,-Cw5, -Cw6. HLA-Bw4: es. -B27, -B44, -B51.

I recettori KIR sono distribuiti clonalmente ed ogni clone presenta un diverso set di KIR; la clonalità è mantenuta grazie al meccanismo epigenetico della metilazione del

DNA costituente la zona a monte della regione dei geni KIR e, inoltre, è stata dimostrata la correlazione tra stato di metilazione ed espressione del gene (5).

Come schematizzato nella figura 5, il KIR attivatore è associato alla proteina adattatrice DAP-12 i cui domini ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motifs), al momento del legame del recettore con il ligando, vengono fosforilati dalle chinasi della famiglia src e reclutano le tirosin chinasi della famiglia Syk. Queste ultime iniziano la cascata di segnalazione citoplasmatica che porta all'attivazione della cellula NK. Quando il KIR inibitore si attiva, le chinasi src fosforilano i domini ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs) presenti nelle code citoplasmatiche. I residui fosforilati interagiscono con il dominio SH2 della proteina tirosin fosfatasi SHP-1 che va a colpire diversi componenti della cascata attivata dai motivi ITAM bloccandola, così da inibire l'attivazione della cellula NK (10).

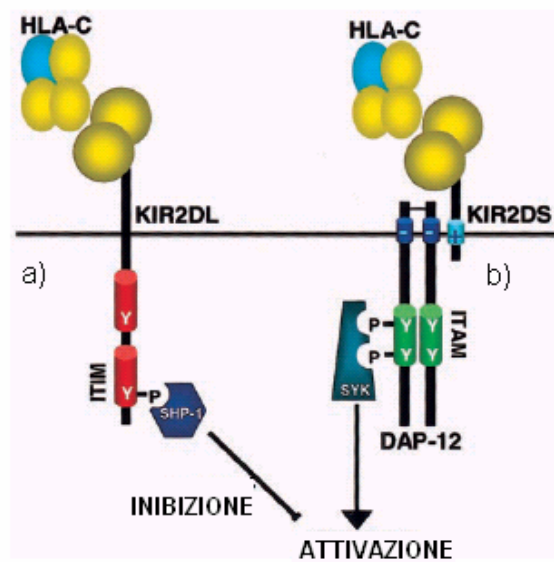


Figura 5. Meccanismi di trasmissione intracellulare del segnale innescati dai recettori KIR: a) inibitori e b) attivatori.

## **2. Ruolo delle cellule NK nel trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche**

Nel trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (CSE) si possono innescare due reazioni avverse mediate dai linfociti T: quella dell'ospite contro trapianto (Host versus Graft -HvG), che impedisce l'attecchimento, e quella del trapianto contro l'ospite (graft versus host- GvH), che può generare la malattia del GvH (GvHD), ma anche un'azione antileucemica (graft versus leukemia- GvL). Per prevenire la HvG e la GvH si applicano regimi di condizionamento pre-trapianto immunosoppressivi ad alta intensità; nel trapianto di CSE aploidentico (un solo aplotipo HLA compatibile) la GvH viene ulteriormente limitata dall'eliminazione dei linfociti T dall'inoculo, anche se con la T-deplezione aumenta la probabilità di ricaduta post-trapianto.

Nel trapianto allogenico di CSE, quando il donatore e il ricevente presentano un'incompatibilità a livello dei ligandi dei recettori KIR (KIR-ligand incompatibilità), cioè esprimono almeno una molecola HLA di classe I diversa, si ha anche l'alloreattività mediata dalle cellule NK, sia GvH che HvG. In caso di alloreattività NK in direzione GvH una frazione delle cellule NK del donatore, derivate dalle cellule staminali trapiantate, esprime dei KIR che non riconoscono gli alleli HLA di classe I del ricevente (figura 6) (11). In tabella 2 sono riassunte le combinazioni di espressione HLA di classe I predittive dell'alloreattività NK del donatore verso il ricevente, considerando i ligandi dei recettori KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR3DL1. Il ricevente non ha un donatore "KIR-ligand" incompatibile, per i recettori presi in considerazione, se esprime HLA-C gruppo 1 e 2 e HLA-Bw4.

Diversi studi condotti a Perugia, da Ruggeri e colleghi (7,11), sul trapianto aploidentico di CSE in pazienti con leucemie acute hanno permesso di indagare sul ruolo biologico delle cellule NK alloreattive.

In pazienti affetti da leucemia acuta mieloblastica (LAM) sottoposti a trapianto aploidentico di CSE T-depleto è stato visto che, in caso di "KIR-ligand" incompatibilità donatore verso ricevente, le cellule NK del donatore, non riconoscendo come "self" i blasti del ricevente, svolgono una azione GvL, che si

concretizza con lo 0% di ricadute a 5 anni dal trapianto, contro il 75% in caso di compatibilità.

Inoltre, nei pazienti con donatore “KIR-ligand” incompatibile, non si è manifestata la GvHD (0% vs 13,7% nei “KIR-ligand” compatibili). La T deplezione da sola non spiega l’assenza di GvHD, infatti dati sperimentali indicano che le NK alloreattive hanno un ruolo nell’eliminazione delle cellule presentanti l’antigene (APC) del ricevente responsabili di innescare i linfociti T del donatore (11); inoltre le stesse cellule NK non generano GvHD perchè solo le cellule emopoietiche esprimono i ligandi attivatori dei recettori NK (11,12).

In più questi pazienti hanno una probabilità di sopravvivenza a 5 anni del 60% rispetto al 5% dei pazienti “KIR-ligand” compatibili (11).

Anche in pazienti pediatrici con leucemia acuta linfoblastica sottoposti a trapianto aploidentico di CSE, la presenza di “KIR-ligand” incompatibilità donatore verso ricevente correla con esito clinico favorevole con percentuale di sopravvivenza a 5 anni superiore all’80% (13).

Considerato l’impatto della “KIR-ligand” incompatibilità sulle esito clinico del trapianto aploidentico di CSE, diversi studi hanno indagato il significato dell’alloreattività NK nel trapianto allogenico di CSE da donatore compatibile (14).

Sono stati valutati retrospettivamente 218 trapianti di CSE di cordone ombelicale in pazienti con leucemie acute ed è stato visto che in caso di “KIR-ligand” incompatibilità l’incidenza di ricaduta sia significativamente ridotta e la sopravvivenza libera da malattia sia migliore, soprattutto in pazienti con LAM (14).

Gli studi condotti su pazienti sottoposti a trapianto allogenico di CSE da donatore compatibile volontario (“matched unrelated donor” o MUD) hanno prodotto risultati contrastanti. La maggior parte degli studi hanno dimostrato che la presenza di alloreattività NK non porta benefici, probabilmente perché la ricostituzione o la funzionalità degli NK è inibita dai linfociti T del donatore stesso presenti nell’inoculo. A sostegno di ciò, solo nei pazienti ai quali è stata somministrata la ATG (“antithymocyte globulins”), per promuovere la T deplezione *in vivo*, è stato

rilevato un effetto GvL delle cellule NK (14). Questa azione “competitiva” dei linfociti T nei confronti delle cellule NK nelle altre tipologie di trapianto di CSE non si manifesta perché i linfociti T sono quantitativamente pochi (trapianto aploidentico) o sono meno immunocompetenti (trapianto di cordone ombelicale).

HLA DONATORE	HLA RICEVENTE
HLA-Bw4	HLA-C gruppo 1, HLA-C gruppo 2
HLA-C gruppo 2	HLA-C gruppo 1, HLA-Bw4
HLA-C gruppo 1	HLA-C gruppo 2, HLA-Bw4
HLA-C gruppo 2 o HLA-Bw4	HLA-C gruppo 1
HLA-C gruppo 1 o HLA-Bw4	HLA-C gruppo 2

Tabella 2. Combinazioni HLA donatore-ricevente predittivi di alloreattività NK in direzione GvH.

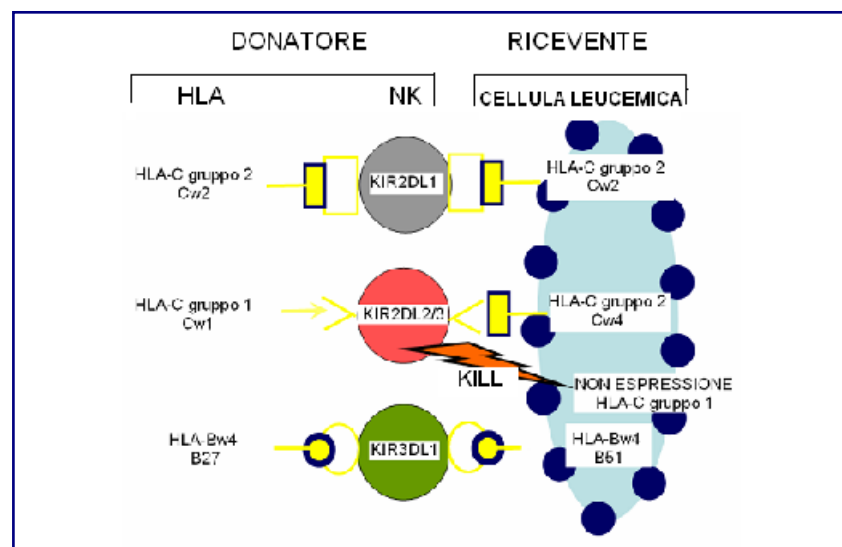


Figura 6. Esempio di coppia donatore-ricevente con “KIR-ligand” incompatibilità in direzione GvL.

### **3. Immunoterapia con cellule NK aploidentiche purificate**

Passweg e colleghi (15) hanno condotto uno studio pilota utilizzando cellule NK aploidentiche purificate per consolidare l'attecchimento in 5 pazienti con ematopatie maligne sottoposti a trapianto aploidentico di CSE. La leucaferesi del donatore è stata sottoposta ad una metodica di selezione immunomagnetica, che prevede 2 passaggi ("doppio step"): la selezione negativa delle cellule CD3+ seguita dall'arricchimento delle cellule CD56+. La deplezione dei linfociti T ottenuta è stata di 3,5-4 logaritmi, con un recupero di cellule NK del 30-60% e una purezza superiore al 90%. La dose di cellule (numero di cellule per kg peso corporeo del ricevente) mediana infusa è stata di  $0,97 \times 10^7$  cellule NK/kg e di  $0,22 \times 10^5$  linfociti T/kg senza insorgenza di GvHD o complicanze di altra natura. Questo studio ha verificato la fattibilità della procedura di selezione e la sicurezza dell'infusione, anche se il numero di pazienti trattati è stato esiguo.

Un altro importante lavoro è quello di Miller e colleghi (16) che hanno trattato sia pazienti con tumori solidi che pazienti con LAM ad alto rischio con cellule NK di donatore aploidentico e, in questo caso, l'inoculo conteneva anche monociti e linfociti B, dato che sulla linfocitoferesi del donatore veniva eseguita solo una deplezione dei linfociti T. Questo studio ha dimostrato che le cellule NK adottive possono espandersi in vivo se vengono somministrate anche:

- una terapia immunosoppressiva preinfusione comprendente ciclofosfamide e fludarabina ad alte dosi (HI-Cy/Flu), che elimina le cellule immunocompetenti del ricevente, e che fa aumentare i livelli endogeni di IL-15, citochina regolatoria dell'omeostasi delle cellule NK;
- iniezioni giornaliere sottocutanee di IL-2 dopo l'infusione.

Di particolare interesse sono i 19 pazienti con LAM ad alto rischio inclusi in questo studio che hanno ben tollerato l'infusione di  $2 \times 10^7$  NK/kg senza presentare tossicità ematologica ed extraematologica dipendenti dal regime di condizionamento e dalla somministrazione di IL-2. Dopo trattamento, 5 pazienti hanno raggiunto la remissione completa, con una tasso di remissione superiore in caso di incompatibilità dei KIR



(75% vs 13%); inoltre, solo nei pazienti in remissione completa le cellule NK adottive sono state rilevate in circolo fino a 14-28 giorni dopo l'infusione.

## SCOPO DEL LAVORO

I pazienti con LAM con più di 60 anni hanno meno del 50% di possibilità di essere vivi in remissione completa ad un anno dalla diagnosi (sopravvivenza mediana 7-13 mesi), mentre pazienti più giovani con malattia attiva dopo chemioterapia di induzione hanno una prognosi altamente sfavorevole ed una aspettativa di vita di pochi mesi.

I lavori ad oggi pubblicati sull'utilizzo di cellule NK aploidentiche hanno dimostrato che l'azione GvL delle cellule NK è significativamente superiore se tra donatore e ricevente esiste l'incompatibilità dei ligandi dei recettori KIR in direzione GvH. Buoni risultati si sono ottenuti in pazienti con LAM ad alto rischio; circa un 40-50% di pazienti con LAM hanno un donatore aploidentico KIR incompatibile nella direzione GvH (7,11).

Alla luce di questo, è stato sviluppato uno studio di fase I-II di immunoterapia con cellule NK di donatore aploidentico "KIR-ligand" incompatibile in pazienti con LAM ad alto rischio. Si è scelto di utilizzare la metodica di selezione "doppio step" con sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec) in modo da ottenere una popolazione di NK altamente purificata. La dose ottimale di cellule NK da recuperare e da infondere è  $5 \times 10^6/\text{kg}$  e la dose minima è di  $1 \times 10^6/\text{kg}$ ; questi valori sono stati scelti basandosi sui risultati ottenuti in studi preclinici (11) e sui dati di efficienza della metodica di selezione presenti in letteratura (15). Per escludere l'insorgenza della GvHD da parte dei linfociti T del donatore la dose massima di cellule CD3+ da infondere è  $1 \times 10^5/\text{kg}$ . Questo lavoro si pone l'obiettivo di valutare:

- la fattibilità della procedura di selezione su una casistica più ampia di pazienti con donatori "KIR-ligand" incompatibili in direzione GvH;
- la sicurezza dell'infusione delle cellule NK selezionate;
- l'efficacia del trattamento attraverso parametri clinici e studi biologici correlativi *in vitro*.

## PAZIENTI E METODI

### **4. Pazienti**

Sono stati arruolati 34 pazienti con LAM ad alto rischio. I criteri di eleggibilità sono riassunti in tabella 3. Il paziente e i possibili donatori sono stati tipizzati per i loci HLA-A, -B, -C e -DRB1 (tipizzazione sierologia e genomica). Il donatore è idoneo quando esprime almeno uno dei ligandi dei recettori KIR2DL2/KIR2DL3, KIR2DL1 e KIR3DL1, rispettivamente le molecole HLA-C di gruppo 1 e 2 e HLA-Bw4, che il ricevente non esprime (tabella 4).

13 pazienti avevano un donatore “KIR-ligand” incompatibile nella direzione GvH. L’età mediana dei pazienti era di 62 anni (53-73) e la distribuzione per sesso era 5 donne e 8 uomini. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte in tabella 5.

Ai pazienti è stata somministrata una chemioterapia di induzione o consolidamento ed in coda al trattamento è stato raccolto un “back-up” di cellule staminali CD34+ autologhe di  $1 \times 10^6$ /kg, da reinfondere in caso di severa mielosoppressione indotta dalle cellule NK aploidentiche. Dopo la reinfusione delle cellule NK nei primi 6 pazienti, un emendamento al protocollo non ha più reso necessaria la conservazione del “back-up”.

<b>CRITERI DI INCLUSIONE</b>	<b>CRITERI DI ESCLUSIONE</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• LAM de-novo o secondaria con età maggiore di 18 anni e malattia misurabile dopo terapia di reinduzione e consolidamento o in remissione completa, non candidati al trapianto di cellule staminali.</li><li>• Consenso informato.</li><li>• Performance Status <math>\geq 70\%</math> (indice di Karnofsky) o <math>\leq 2</math> (WHO).</li><li>• Età superiore a 18 anni.</li><li>• Disponibilità di un donatore aploidentico KIR incompatibile.</li><li>• Adeguata funzionalità renale (creatinina <math>&lt; 2</math> mg/dl), polmonare (Sat O<sub>2</sub> = 96%) ed epatica (ALT/AST <math>&lt; 2.5 \times N</math>).</li><li>• Disponibilità cellule staminali autologhe CD34+ criopreservate</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Età inferiore a 18 anni.</li><li>• Persona incapace di dare consenso informato.</li><li>• Positività HIV.</li><li>• Positività HCV con alto titolo virale.</li><li>• Danno d’organo intercorrente o problemi medici che potrebbero interferire con la terapia.</li><li>• Stato di gravidanza.</li><li>• Presenza di infezione non controllata.</li><li>• Non disponibilità di cellule staminali autologhe criopreservate.</li></ul>

Tabella 3. Criteri di eleggibilità dei pazienti

<b>paziente</b>	<b>ricevente</b>	<b>donatore</b>	<b>incompatibilità HLA</b>
<b>B.T.D.</b>	A*29 B*44 C*16 DRB1*11 A*24 B*18 C*07 DRB1*07	A*29 B*44 C*16 DRB1*11 A*02 B*57 C*06 DRB1*07	- C gruppo 2
<b>I.C.</b>	A*03 B*55 C*03 DRB1*13 A*29 B*58 C*07 DRB1*01	A*03 B*55 C*03 DRB1*13 A*03 B*27 C*02 DRB1*07	-C gruppo 2
<b>F.L.A.</b>	A*32 B*40 C*02 DRB1*16 A*31 B*51 C*02 DRB1*07	A*32 B*40 C*02 DRB1*16 A*33 B*14 C*08 DRB1*01	-C gruppo 1
<b>M.M.</b>	A*01 B*35 C*04 DRB1*12 A*23 B*44 C*04 DRB1*07	A*01 B*35 C*04 DRB1*12 A*02 B*51 C*07 DRB1*13	-C gruppo 1
<b>L.V.</b>	A*68 B*39 C*12 DRB1*08 A*33 B*14 C*08 DRB1*03	A*68 B*39 C*12 DRB1*08 A*02 B*44 C*05 DRB1*11	-C gruppo 2 e -Bw4
<b>V.V.</b>	A*32 B*14 C*08 DRB1*14 A*24 B*38 C*12 DRB1*07	A*32 B*14 C*08 DRB1*14 A*03 B*35 C*04 DRB1*16	-C gruppo 2
<b>D.S.F.S.</b>	A*11 B*35 C*04 DRB1*01 A*03 B*35 C*04 DRB1*11	A*11 B*35 C*04 DRB1*01 A*02 B*27 C*01 DRB1*01	-C gruppo 1 e -Bw4
<b>M..A.</b>	A*02 B*39 C*12 DRB1*16 A*24 B*41 C*17 DRB1*13	A*02 B*39 C*12 DRB1*16 A*02 B*51 C*04 DRB1*04	-Bw4
<b>Z.G.</b>	A*24 B*51 C*04 DRB1*04 A*03 B*35 C*04 -DRB1*08	A*24 B*51 C*04 DRB1*04 A*26 B*55 C*03 DRB1*14	-C gruppo 1
<b>R.C.</b>	A*02 B*50 C*06 DRB1*13 A*02 B*50 C*06 DRB1*13	A*02 B*50 C*06 DRB1*13 A*34 B*51 C*14 DRB1*15	-C gruppo 1 e -Bw4
<b>P.R.</b>	A*02 B*44 C*05 DRB1*14 A*02 B*57 C*06 DRB1*07	A*02 B*44 C*05 DRB1*14 A*33 B*14 C*08 DRB1*11	-C gruppo 1
<b>D.D.</b>	A*26 B*50 C*06 DRB1*07 A*02 B*37 C*06 DRB1*08	A*26 B*50 C*06 DRB1*07 A*02 B*08 C*07 DRB1*03	-C gruppo 1
<b>D.P.C.</b>	A*26 B*14 C*08 DRB1*04 A*24 B*01 C*07 DRB1*11	A*26 B*14 C*08 DRB1*04 A*30 B*35 C*04 DRB1*16	-C gruppo 2

Tabella 4. Tipizzazione HLA donatore e ricevente. In rosso sono indicati gli alleli incompatibili predittivi dell'alloreattività NK GvL.

paziente	età	sesso	FAB	tipo LAM	cariotipo	stato malattia prima immunoterapia NK
<b>B.T.D.</b>	68	F	M2	de novo	46 XX	RP
<b>I.C.</b>	66	M	M1	de novo	46 XY	ricaduta
<b>F.L.A.</b>	65	M	M1	de novo	46 XY	ricaduta
<b>M.M.</b>	62	F	M1	de novo	46 XX	ricaduta
<b>L.V.</b>	62	M		secondaria	complesso	ricaduta
<b>V.V.</b>	59	F	M1	de novo	46 XX	RC
<b>D.S.F.S.</b>	73	M	M5	de novo	46 XY	RC
<b>M.A.</b>	58	M	M4	de novo	46 XY	RC
<b>Z.G.</b>	69	M	M1	de novo	46 XY	RC
<b>R.C.</b>	53	F	M1	de novo	46 XX +8-7	RC - remissione cariotipica
<b>P.R.</b>	67	M	M0	de novo	n.v.	RC
<b>D.D.</b>	61	M		secondaria	46 XY	RC
<b>D.P.C.</b>	58	F	M1	de novo	46 XX inv(16)	RC - ricaduta molecolare

Tabella 5. Caratteristiche dei 13 pazienti arruolati per l'immunoterapia.

RC= remissione morfologica completa: <5% blasti nel midollo osseo; RP= remissione morfologica parziale: <30% blasti nel midollo osseo e <10% blasti nel sangue periferico.  
n.v.= non valutabile

## **5. Selezione e processazione delle cellule NK di donatore**

### **5.1 Selezione immunomagnetica “doppio step”**

Il prodotto di partenza per ottenere le cellule NK purificate era una leucaferesi del donatore non mobilizzata (linfocitoafesi) contenente almeno  $5 \times 10^9$  cellule mononucleate totali e  $3 \times 10^6$  cellule NK/kg.

Solo per 1 paziente (L.V.) si sono processate 2 linfocitoafesi perché con la prima raccolta non si raggiungeva la quota di cellule NK posta come limite.

E' stato utilizzato il sistema di selezione CliniMACS (Miltenyi Biotec) basato sull'utilizzo di microbiglie superparamagnetiche, coniugate ad anticorpi monoclonali, per marcare le cellule di interesse, e di colonne di selezione a cui viene applicato un campo magnetico per trattenere le cellule marcate. Tutta la procedura avviene in un sistema chiuso in modo da garantire le condizioni GMP (figura 7).

Il limite di marcatura dell'anticorpo anti-CD3 utilizzato è di  $15 \times 10^9$  cellule target su  $40 \times 10^9$  cellule mononucleate totali caricabili in colonna, mentre per l'anticorpo anti-CD56+ il limite è  $2 \times 10^9$  cellule. In 2 casi (pazienti F.L.A. e L.V.) un'aliquota della linfocitoferesi non è stata processata perché si superava il limite di cellule CD3+ processabili.

La metodica di selezione prevede due passaggi :

1. selezione negativa delle cellule CD3+, in modo da eliminare le cellule marcate con l'anticorpo (programma: DEPLETION 3.1);
2. selezione positiva delle cellule CD56+, per ottenere un prodotto finale arricchito in cellule NK (programma: ENRICHMENT 1.1).

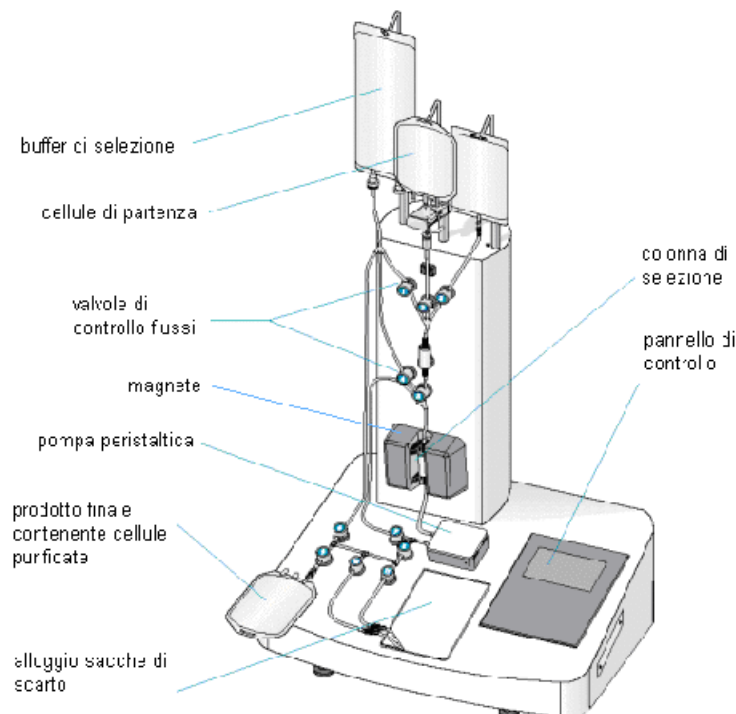


Figura 7. Apparecchio CliniMACS

La linfocitoferesi di partenza e tutti i prodotti del processo di selezione sono stati valutati in citofluorimetria a flusso (BD FACSCanto II, Becton Dickinson BD) con anticorpi anti-CD3 (CD3-Fitc BD ref. 345764) e anti-CD56 (CD56-Pe BD ref. 345812) coniugati con fluorocromi per determinare la purezza e le quantità delle cellule NK e dei linfociti T (figura 8). Sul prodotto finale di selezione è stata valutata la vitalità cellulare (Trypan Blue).

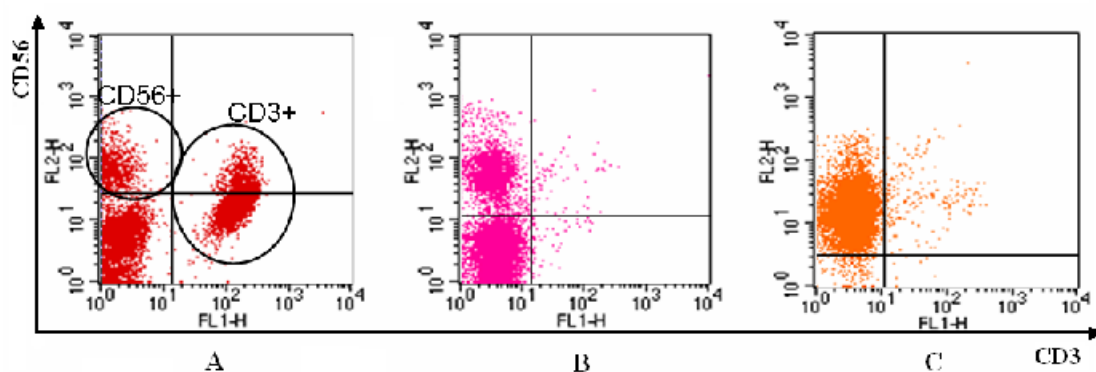


Figura 8. Valutazione citofluorimetrica: A) linfocitoferesi di partenza; B) prodotto finale della selezione negativa delle cellule CD3+; C) prodotto finale arricchito in cellule CD56+CD3-.

## 5.2 Criopreservazione del prodotto purificato

Le cellule NK altamente purificate sono state criopreservate in sacche secondo la metodica standard che prevede l'utilizzo del crioprotettore DMSO al 10% del volume finale ed un congelamento programmato (Kryo 560-16, Planer Plc) fino ad una temperatura di -140°C (17).

Le cellule criopreservate sono state conservate poi in azoto liquido o in vapori di azoto (-196°C/-140°C) fino al momento dell'infusione. Prima della criopreservazione è stato prelevato un campione sul quale sono stati eseguiti test microbiologici per valutare un'eventuale contaminazione di batteri e miceti.

## **6. Analisi della funzionalità delle cellule NK purificate**

Per valutare l'attività litica dopo selezione immunomagnetica le cellule NK purificate sono state messe in coltura con cellule K562, una linea cellulare leucemica NK-sensibile derivata da un paziente con leucemia mieloide cronica in crisi blastica (medium: RPMI-1640 arricchito con 10% di siero fetale bovino scomplementato, 1% di L-Glutamina e 1% di penicillina/streptomicina). Sono stati testati i seguenti rapporti cellule effettrici e target: 1:2; 2:1; 4:1; 10:1 (controllo: cellule K562 in medium di coltura). Dopo 4 ore è stata valutata la percentuale di lisi delle cellule K562 in citofluorimetria a flusso (test annessina V e propidio ioduro, SIGMA).

## **7. Chemioterapia immunosoppressiva e infusione delle cellule NK alloreattive**

La chemioterapia immunosoppressiva pre infusione di cellule NK è consistita in:

- Fludarabina 25mg/mq/giorno in 30 minuti per 5 giorni (dal giorno -7 al giorno -3);
- Ciclofosfamida 4 g/mq (giorno -2)

Dopo 2 giorni dalla somministrazione di ciclofosfamida si è proceduto all'infusione delle cellule NK purificate (giorno 0).

Le cellule NK criopreservate sono state scongelate rapidamente in bagno termostatico a 37-38°C. Su un campione è stata valutata la conta cellulare e la vitalità al Trypan Blue. La dose prestabilita (dose minima  $1 \times 10^6$  NK/kg – dose ottimale  $5 \times 10^6$  NK/kg con contaminazione massima di  $1 \times 10^5$ /kg linfociti T) è stata prelevata tenendo conto della vitalità cellulare.

Dopo l'infusione è stata somministrata IL-2 sottocute ad un dosaggio di  $10 \times 10^6$  UI/giorno per 3 volte a settimana per 2 settimane (6 dosi totali). Non è stata somministrata la profilassi per la GvHD.

Per valutare l'engraftment sui pazienti è stata eseguita tutti i giorni la conta dei WBC e delle piastrine fino al raggiungimento del recupero ematologico (polimorfonucleati  $> 0,5 \times 10^9$ /L e piastrine  $> 20 \times 10^9$ /L mantenuto per 3 giorni consecutivi). Questi esami



sono stati eseguiti settimanalmente fino ad un conteggio di piastrine  $> 50 \times 10^9/L$ , e poi mensilmente per i primi tre mesi dopo il trattamento.

Per determinare lo stato della malattia dopo l'infusione il paziente è stato sottoposto ad una serie di esami di laboratorio tutti i mesi per il primo anno dopo l'immunoterapia. Esami eseguiti: conta WBC e striscio di sangue periferico, SGOT, SGTP, LDH, fosfatasi alcalina, bilirubina, azotemia, glicemia, proteine totali, albumina sierica, calcio, potassio, sodio, immunofenotipo, aspirato midollare o biopsia midollare, citogenetica classica o molecolare e valutazione molecolare della malattia minima residua, se il clone neoplastico è caratterizzato da un'alterazione citogenetica o da un marker molecolare.

## **8. Saggi di Microchimerismo**

Per determinare la presenza e la persistenza delle cellule NK del donatore dopo l'infusione è stato valutato il microchimerismo. A determinati tempi su campioni di sangue periferico e di sangue midollare del paziente si analizza in PCR un pannello di Variable Number Tandem Repeat (VNTR: D3S1358, VWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820) e l'amelogenina per identificare i cromosomi XY (15).

## **9. Analisi dell'apoptosi di cellule NK indotta da cellule leucemiche**

Per verificare un'eventuale influenza delle cellule leucemiche sulle cellule NK sono state messe in coltura (medium: RPMI-1640 arricchito con 10% di siero fetale bovino scomplementato, 1% di L-Glutammina e 1% di penicillina/streptomina) blasti di pazienti con LAM e cellule NK nei rapporti 1:20, 1:1, 20:1 (controllo: cellule NK in medium di coltura). Dopo 4 ore è stata valutata la percentuale di lisi delle cellule NK in citofluorimetria a flusso (test annessina V e propidio ioduro, SIGMA).

## **RISULTATI**

### **10. Analisi della procedura di selezione**

La procedura di selezione ha permesso un arricchimento percentuale mediano delle cellule CD56+CD3- da 7,70% (1,26-11,70) a 93,50% (66,41-99,20). La quantità mediana di cellule CD56+CD3- ottenuta è stata pari a  $9,83 \times 10^6$ /kg (1,47-15,76), con una contaminazione mediana di linfociti T di  $1,55 \times 10^5$ /kg (0,03-12,17) ed una vitalità mediana di 95% (92-98). La dose ottimale di cellule NK è stata raggiunta per 10 pazienti, mentre per i restanti è stata raccolta almeno la dose minima.

Riguardo l'efficienza della selezione il recupero mediano di cellule CD56+CD3- è stato di 53,05% (30,97-72,85) ed il valore mediano del logaritmo di deplezione delle cellule CD3+ è stato 3,03 (2,15-4,52) (tabelle 6 e 7).

L'analisi della funzionalità delle cellule NK ottenute per i diversi pazienti ha prodotto risultati omogenei: le cellule NK purificate mantengono inalterata l'attività citotossica verso cellule leucemiche, infatti sono in grado di lisare le cellule della linea K562 nei diversi rapporti testati (figura 10).

paziente		WBC x10 <sup>9</sup>	%CD56+	CD56+ X10 <sup>6</sup>	% recupero	CD56+ x10 <sup>6</sup> /kg finali
<b>B.T.D.</b>	pre sel	7,17	11,06	792,78	55,81	7,63
	finale	0,47	93,50	442,44		
<b>I.C.</b>	pre sel	26,65	10,84	2888,86	41,57	12,77
	finale	1,34	89,95	1200,83		
<b>F.L.A.</b>	pre sel	25,00	2,13	532,50	72,85	5,54
	finale	0,44	89,10	387,94		
<b>M.M.</b>	pre sel	18,95	10,99	2082,61	43,19	14,75
	finale	0,93	96,48	899,58		
<b>L.V.</b>	pre sel	21,80	1,26	274,68	30,97	1,47
	finale	0,13	66,41	85,07		
<b>V.V.</b>	pre sel	15,08	4,62	696,70	53,05	5,69
	finale	0,46	79,70	369,57		
<b>D.S.F.S.</b>	pre sel	20,23	6,00	1213,80	57,78	9,88
	finale	0,72	96,80	701,32		
<b>M.A.</b>	pre sel	12,15	2,50	303,75	65,40	2,48
	finale	0,22	92,40	198,66		
<b>Z.G.</b>	pre sel	17,25	10,80	1863,00	60,83	14,66
	finale	1,17	97,20	1133,35		
<b>R.C.</b>	pre sel	15,29	4,70	718,63	35,95	4,31
	finale	0,26	99,20	258,32		
<b>P.R.</b>	pre sel	27,61	11,70	3230,37	31,82	13,52
	finale	1,08	94,90	1027,77		
<b>D.D.</b>	pre sel	16,48	8,50	1400,80	45,61	9,83
	finale	0,67	94,90	638,87		
<b>D.P.C.</b>	pre sel	24,07	7,70	1853,39	54,41	15,76
	finale	1,11	90,60	1008,38		
<b>valore mediano</b>					<b>53,03</b>	<b>9,83</b>

Tabella 6. Dati della selezione delle cellule NK CD56+CD3-.

paziente		WBC x10 <sup>9</sup>	%CD3+	CD3+ X10 <sup>5</sup>	log deplezione	CD3+ x10 <sup>5</sup> /kg finali
<b>B.T.D.</b>	pre sel	7,17	47,17	33811,46	2,58	1,55
	finale	0,47	1,90	89,91		
<b>I.C.</b>	pre sel	26,65	62,60	166829	2,36	7,80
	finale	1,34	5,49	732,92		
<b>F.L.A.</b>	pre sel	25,00	66,52	166300	3,03	2,24
	finale	0,44	3,60	156,74		
<b>M.M.</b>	pre sel	18,95	58,87	111558,65	3,21	1,12
	finale	0,93	0,73	68,07		
<b>L.V.</b>	pre sel	21,80	68,80	149984	3,44	0,93
	finale	0,13	4,21	53,93		
<b>V.V.</b>	pre sel	15,08	68,05	102619,4	3,04	1,43
	finale	0,46	2,00	92,74		
<b>D.S.F.S.</b>	pre sel	20,23	59,3	119963,9	3,11	1,33
	finale	0,72	1,30	94,19		
<b>M.A.</b>	pre sel	12,15	58,10	70591,5	4,52	0,03
	finale	0,22	0,10	2,15		
<b>Z.G.</b>	pre sel	17,25	45,40	78315	2,71	1,96
	finale	1,17	1,30	151,58		
<b>R.C.</b>	pre sel	15,29	68,30	104430,7	4,30	0,09
	finale	0,26	0,20	5,21		
<b>P.R.</b>	pre sel	27,61	46,00	127006	2,53	4,99
	finale	1,08	3,50	379,05		
<b>D.D.</b>	pre sel	16,48	62,20	102505,6	2,60	3,94
	finale	0,67	3,80	255,82		
<b>D.P.C.</b>	pre sel	24,07	45,90	110481,3	2,15	12,17
	finale	1,11	7,00	779,10		
<b>valore mediano</b>					<b>3,03</b>	<b>1,55</b>

Tabella 7. Dati della selezione delle cellule CD3+.

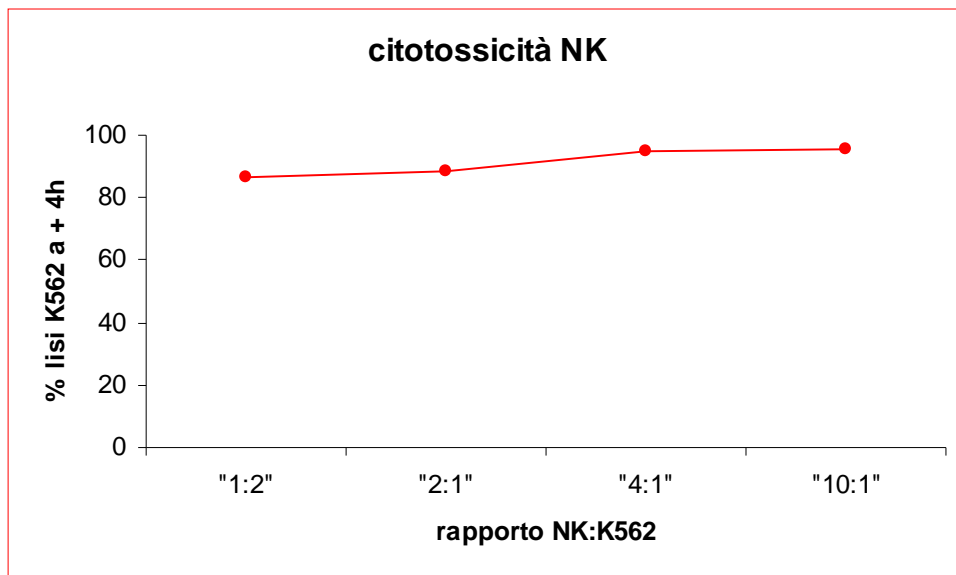


Figura 10. Capacità delle cellule NK purificate di lisare cellule target K562 dopo 4 ore (paziente R.C.)

## **11. Infusione delle cellule NK nei pazienti con LAM**

Tutti i pazienti sono stati reinfusi. La dose mediana di cellule NK aploidentiche infuse è stata  $2,74 \times 10^6/\text{kg}$  (1,11-5,00) con una contaminazione mediana di CD3+ di  $1,00 \times 10^5/\text{kg}$  (0,05-1,00) ed una vitalità mediana dopo scongelamento di 92% (89-97). Come mostrano i dati in tabella 8 in 3 pazienti è stata infusa la dose ottimale di  $5 \times 10^6 \text{NK}/\text{kg}$  e in tutti i pazienti è stata reinfusa almeno la dose minima ( $1 \times 10^6 \text{NK}/\text{kg}$ ). In 6 pazienti non è stato possibile infondere la dose ottimale, anche se raccolta, perché la contaminazione delle cellule CD3+ era superiore alla dose limite da infondere ( $1 \times 10^5/\text{kg}$ ).

L'analisi del microchimerismo è stata eseguita sui campioni di 10 pazienti. Nei pazienti L.V., D.S.F.S., R.C., P.R. e M.A. non sono state rilevate cellule NK del donatore dopo l'infusione. Nella figura 11 sono rappresentati gli andamenti e le quantità percentuali di cellule NK del donatore riscontrate negli altri 5 pazienti

valutati. Per i pazienti Z.G. e B.T.D. le cellule sono state rilevate a diversi tempi dopo l'infusione, fino al giorno +28 per B.T.D.

paziente	CD56+x10 <sup>6</sup> /kg infuse	CD3+x10 <sup>5</sup> /kg infuse	vitalità %
B.T.D.	3,16	1,00	95
I.C.	1,34	1,00	94
F.L.A.	5,00	0,89	95
M.M.	5,00	0,38	97
L.V.	1,11	0,60	89
V.V.	4,00	1,00	90
D.S.F.S.	5,00	0,11	96
M.A.	1,81	0,05	91
Z.G.	2,05	1,00	92
R.C.	3,89	0,08	93
P.R.	2,74	1,00	90
D.D.	2,51	1,00	92
D.P.C.	1,29	1,00	91
<b>valore mediano</b>	<b>2,74</b>	<b>1,00</b>	<b>92</b>

Tabella 8. Dati infusione delle cellule NK .

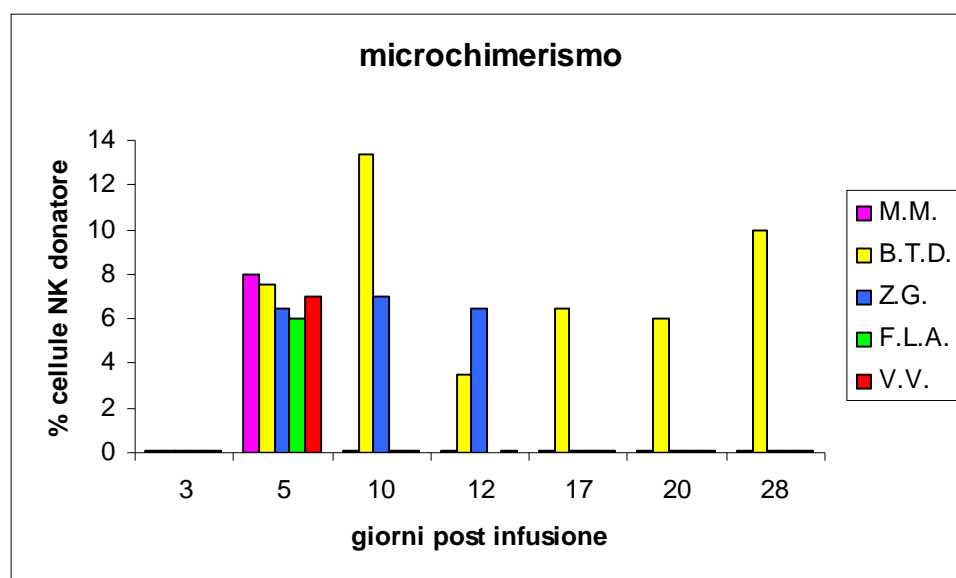


Figura 11. Microchimerismo nei pazienti dopo l'infusione.

Dal punto di vista clinico il recupero ematologico (polimorfonucleati  $> 0,5 \times 10^9/L$  e piastrine  $> 20 \times 10^9/L$  mantenuto per 3 giorni consecutivi) è stato raggiunto da 11 pazienti; il valore mediano per il recupero dei polimorfonucleati è stato 18 giorni (12-45) e per il recupero piastrinico è stato 20 giorni (13-45) (tabella 9).

Durante la fase di citopenia non sono stati registrati decessi dipendenti dall'infusione delle cellule NK e per nessun paziente si è dovuto ricorrere al trapianto con le cellule staminali CD34+ autologhe di "back-up". Inoltre, per nessun paziente sono stati segnalati sintomi legati a tossicità extraematologica o GvHD.

I 2 pazienti che non hanno raggiunto il recupero ematologico sono deceduti per progressione della malattia.

paziente	giorno di recupero	
	PMN $> 0,5 \times 10^9/L$	PLT $> 20 \times 10^9/L$
B.T.D.	14	13
I.C.	15	30
F.L.A.	n.r.	n.r.
M.M.	29	30
L.V.	n.r.	n.r.
V.V.	21	22
D.S.F.S.	18	20
M.A.	17	17
Z.G.	18	18
R.C.	12	13
P.R.	45	45
D.D.	24	24
D.P.C.	17	19

Tabella 9. Recupero ematologico post infusione cellule NK (PMN= polimorfonucleati; n.r.= non raggiunto)

## **12. Risposta clinica e follow-up dei pazienti**

Al momento dell'infusione, dei 13 pazienti trattati 4 mostravano malattia in ricaduta, 1 era in remissione morfologica parziale e 8 erano in remissione morfologica completa (tabella 10).

Nei 4 pazienti trattati in ricaduta vi è stata progressione della malattia e successivo decesso.

Il paziente trattato in remissione parziale ha ottenuto una remissione completa della durata di 6 mesi, seguita da ricaduta e decesso.

Degli 8 pazienti trattati in remissione completa, 5 hanno mantenuto la remissione completa a 18, 15, 4 e 2 mesi; dei restanti, 2 sono ricaduti a 2 mesi dall'infusione e poi deceduti (5, 8 mesi), l'altro è ricaduto a 7 mesi dal trattamento e, ad oggi, è vivo in seconda remissione completa (tabella 10).

Il paziente D.P.C. ha come marcatore di malattia il gene di fusione CBF $\beta$ /MYH (inversione del cromosoma 16), che ha permesso di seguire l'andamento della risposta con metodiche di biologia molecolare (PCR qualitativa e quantitativa su campioni di sangue midollare). Prima dell'infusione delle cellule NK il paziente era in remissione morfologica completa, ma in ricaduta molecolare (presenza del trascritto del gene CBF $\beta$ /MYH); dopo l'infusione è stata raggiunta una remissione molecolare completa (trascritto del gene CBF $\beta$ /MYH non rilevabile) mantenuta ad oggi (2 mesi dall'infusione).

Lo studio biologico correlativo sull'apoptosi delle cellule NK indotta dai blasti leucemici ha dimostrato come all'aumento del rapporto cellule leucemiche/cellule NK corrisponda un incremento della percentuale di cellule NK apoptotiche. La figura 12 mostra i dati ottenuti utilizzando i blasti di 4 pazienti con LAM.



paziente	stato malattia prima NK	stato malattia dopo NK	follow-up (mesi)
B.T.D.	RP	RC	ricaduta morfologica (6)/ decesso (22)
I.C.	ricaduta	progressione	decesso (4)
F.L.A.	ricaduta	progressione	decesso (1)
M.M.	ricaduta	progressione	decesso (6)
L.V.	ricaduta	progressione	decesso (2)
V.V.	RC	RC	RC (15)
D.S.F.S.	RC	RC	RC (18)
M.A.	RC	ricaduta morfologica (2 mesi)	decesso (5)
Z.G.	RC	ricaduta morfologica (2 mesi)	decesso (8)
R.C.	RC - remissione cariotipica	RC - remissione cariotipica	ricaduta morfologica (7)/ vivo in 2° RC
P.R.	RC	RC	RC (4)
D.D.	RC	RC	RC (2)
D.P.C.	RC - ricaduta molecolare	RC - remissione molecolare	RC (2) - remissione molecolare

Tabella 10. Stato di malattia prima e dopo l'infusione di cellule NK e follow-up. RC= remissione morfologica completa: <5% blasti nel midollo osseo; RP= remissione morfologica parziale: <30% blasti nel midollo osseo e <10% blasti nel sangue periferico.

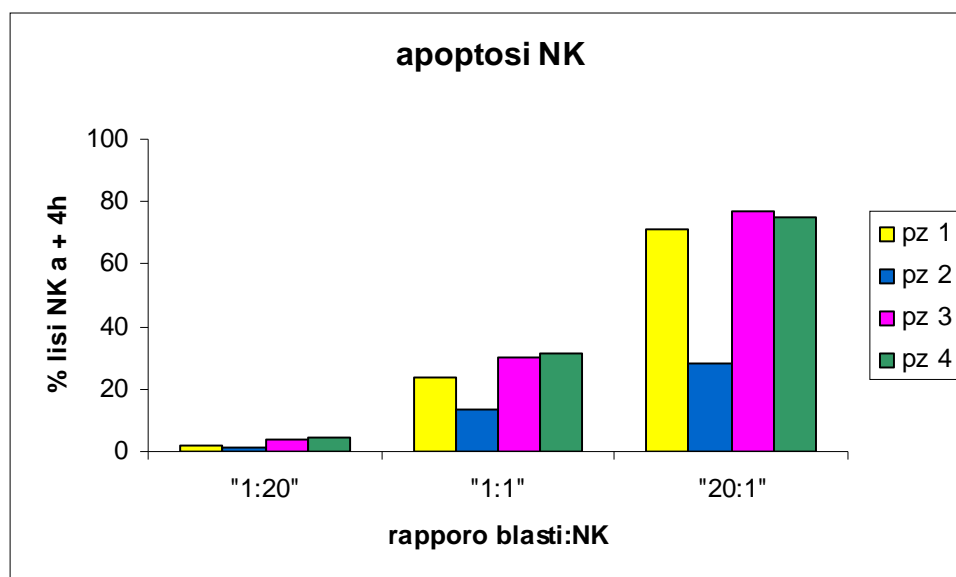


Figura 12. Apoptosi delle cellule NK indotta da blasti di LAM dopo 4 ore.

## DISCUSSIONE

La procedura di selezione “doppio step” con CliniMACS ha permesso di ottenere per 10 pazienti la dose ottimale di cellule NK ( $5 \times 10^6/\text{kg}$ ) e per i restanti più della dose minima ( $1 \times 10^6/\text{kg}$ ). La dose minima di cellule NK è stata quindi infusa a tutti i pazienti, mentre la dose ottimale è stata infusa solo in 3 pazienti perché la contaminazione di cellule CD3+ era superiore al limite di linfociti T ( $1 \times 10^5/\text{kg}$ ) che si era posto come valore massimo infondibile per evitare l’insorgenza di GvHD.

Inoltre, questa metodica di selezione ha permesso di ottenere delle cellule NK altamente purificate (purezza mediana 93,50%), vitali (vitalità >92%) e con attività citotossica verso cellule leucemiche bersaglio.

La quantità di cellule CD3+ nel prodotto finale è risultata essere il fattore limitante più importante per l’infusione della dose ottimale e la deplezione delle cellule CD3+ (valore mediano 3,03 log) è risultata inferiore di 1 logaritmo a quella indicata in letteratura (15). Sono stati riesaminati i dati riguardanti la procedura di selezione, ponendo particolare attenzione alla quantità delle piastrine presenti nella linfocitoafesi, dato che è stato dimostrato come un’elevata contaminazione piastrinica (valore soglia  $1 \times 10^{11}$ ) nel prodotto da sottoporre a immunoselezione influenzi negativamente la marcatura e di conseguenza il recupero cellulare (18). Dall’analisi della composizione della linfocitoafesi e del prodotto intermedio che si ottiene dopo l’incubazione con l’anticorpo anti-CD3+ è risultato che la quantità mediana di piastrine iniziali era  $3,79 \times 10^{11}$  (0,21-6,07). Con i lavaggi previsti (centrifugazione a 1200 rpm per 15 minuti) si è ottenuta una deplezione solo del 20%. Pertanto si potrebbe migliorare l’efficienza della selezione modificando la metodica in modo da eliminare un numero di piastrine superiore.

I primi pazienti trattati sono stati scelti fra quelli con malattia per valutare la tossicità della metodica. Quindi si è passati a trattare i pazienti in remissione completa. L’infusione delle cellule NK è risultata sicura: i tempi di recupero ematologico non sono stati diversi da quelli osservati nell’esperienza clinica del nostro gruppo nella

terapia delle LAM e nessun paziente è deceduto a causa del trattamento. L'infusione delle cellule NK non ha mai indotto una mielosoppressione tale ( $PMN < 0,5 \times 10^9/L$  al giorno + 40) da prevedere la reinfusione delle cellule staminali CD34+ autologhe, pertanto dopo i primi pazienti il "back-up" non è stato più raccolto.

Inoltre, in nessun paziente si è verificata l'insorgenza della GvHD o di altre tossicità. Dopo l'infusione le cellule NK del donatore sono state rilevate nel 50% dei pazienti, sia a livello del midollo osseo che del sangue periferico, e la loro presenza è stata dimostrata almeno fino al giorno +5, valore sovrapponibile al tempo di emivita di cellule NK allojeniche infuse in pazienti con carcinoma renale (19).

Degli 8 pazienti trattati in remissione morfologica completa, 5 sono ancora in RC a 18, 15, 4 e 2 mesi. I pazienti con il follow-up più lungo hanno una sopravvivenza significativamente superiore a quella possibile con terapie convenzionali (7-13 mesi). È importante evidenziare il caso del paziente D.P.C., che dopo l'immunoterapia si è negativizzato per il marker molecolare di malattia, e il caso del paziente B.T.D., che trattato in remissione parziale ha ottenuto la remissione completa; questi risultati clinici suggeriscono che *in vivo* le cellule NK infuse sono in grado di svolgere un'azione GvL.

I pazienti trattati in progressione di malattia non hanno ottenuto nessun beneficio dall'immunoterapia. Gli studi biologici correlativi hanno permesso di osservare che i blasti leucemici inducono l'apoptosi delle cellule NK in modo dose-dipendente. L'analisi dei risultati *in vitro* e dei dati clinici ha suggerito che l'immunoterapia con cellule NK alloreattive risulta efficace quando la taglia di malattia è ridotta. Comunque il numero esiguo di pazienti trattati fino ad ora non permette di fare correlazioni certe fra il numero di cellule infuse, il microchimerismo e la risposta clinica.

Dimostrate la fattibilità e la sicurezza dell'infusione di cellule NK alloreattive e considerata la resa della procedura di selezione utilizzata, si creano i presupposti per l'impiego di un'immunoterapia che preveda somministrazioni ripetute.

## BIBLIOGRAFIA

1. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990; 76(12):2421-2438.
2. Cooper MA, Fehniger TA and Caligiuri MA. The biology of human natural killer –cells subsets. *Trends in immunology*. 2001; 22(11):633-640.
3. Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, et al. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular and molecular Immunology*. 2009; 6(1):15-25.
4. Ljunggren H-G, Karre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*. 1990; 11:273-44.
5. Moretta L. and Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. 2004; 16:626-633.
6. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Current Opinion in Immunology*. 2005; 17:211-214.
7. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999; 94(1):333-339.
8. Lanier LL. NK cell recognition. *Annual Review Immunology*. 2005; 23:225-74.
9. Moretta L, Bottino C, Pende D, et al. Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends in immunology*. 2004; 25(12):670-676.
10. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002; 100(6):1935-1947.

11. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002; 295:2097-2100.
12. Ya YYL., Kumar V., Bennett M. Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Annual Review of Immunology*. 1992; 10:189-213.
13. Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to therapy of acute leukemias. *Immunological Reviews*. 2008; 224:58-69
14. Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Current Opinion in Immunology*. 2008; 20:581-587.
15. Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, et al. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004; 18(11):1835-1838.
16. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis A, et al. Successful adoptive transfer of human haploidentical NK cells in cancer patients. *Blood*. 2005; 105(8):3051-3057.
17. Isidori A, Motta MR, Tani M, et al. Positive selection and transplantation of autologous highly purified CD133+ stem cells in resistant/relapsed chronic lymphocytic leukemia patients results in rapid hematopoietic reconstitution without an adequate leukemic cell purging. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007; 13:1224-1232.
18. Reiser M, Draube A, Schedi C, et al. High platelet contamination in progenitor cell concentrates results in significantly lower yield after immunoselection. *Transfusion*. 2000; 40:178-181.
19. Brand JM, Meller B, Von Hof K, et al. Kinetics and organ distribution of allogenic natural killer lymphocytes transfused into patients suffering from renal cell carcinoma. *Stem Cells and Development*. 2004; 13:307-314.