



FONDAZIONE I.R.C.C.S. POLICLINICO SAN MATTEO
LABORATORI SPERIMENTALI DI RICERCA

**Studio delle funzioni immunitarie dei linfociti T specifici per citomegalovirus umano
necessarie per il controllo dell'infezione nel paziente ricevente trapianto di organo solido**

(Protocollo di studio: HCMV SOTR-immunità)

Proponente: Prof. Giuseppe Gerna
Laboratori Sperimentali di Ricerca-Area Trapiantologia
Tel: 0382 502815
Fax: 0382 502648
e.mail: g.gerna@smatteo.pv.it

1. RAZIONALE

Le infezioni da citomegalovirus umano (HCMV) rappresentano una delle complicanze infettive più frequenti e pericolose nei pazienti riceventi trapianto di organi solidi (SOTR) (Fishman *et al.*, 1998). La terapia immunosoppressiva necessaria per evitare il rigetto dell'organo trapiantato comporta infatti, nei primi mesi dopo il trapianto, una riduzione dell'efficienza del sistema immunitario che, in alcuni casi, non è più in grado di controllare infezioni virali, quali quella da HCMV, che sono invece pressoché innocue nel soggetto immunocompetente. La successiva ricostituzione delle funzioni immunitarie, conseguente anche alla riduzione nel tempo della terapia immunosoppressiva, permette al paziente di ritornare a controllare l'infezione.

Al fine di determinare l'efficacia dell'immunità cellulo-mediata nei confronti di HCMV, è stato sviluppato presso il Servizio di Virologia della Fondazione un sistema che impiega cellule dendritiche (DC) autologhe infettate con un ceppo selvaggio di HCMV come stimolatrici dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ specifici, riproducendo *in vitro* le fisiologiche interazioni tra cellule presentanti l'antigene e linfociti T (Lozza *et al.*, 2005). Applicando tale metodo allo studio della risposta immune HCMV-specifica nel paziente ricevente trapianto d'organo, si è osservato come la presenza di >0,4 linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ HCMV-specifici/μl di sangue fosse associata alla capacità di controllare l'infezione, mentre i pazienti con livelli di linfociti T specifici inferiori a questo cutoff sviluppavano infezioni severe (Gerna *et al.*, 2006). In seguito, uno studio prospettico condotto su 132 SOTR per verificare la validità di questi cutoff, ha dimostrato come i pazienti che mantenevano o ricostituivano livelli di linfociti T sia CD4⁺ che CD8⁺ HCMV-specifici superiori al cutoff non andavano più incontro ad infezione da HCMV (manoscritto in preparazione). Risulta quindi utile applicare il test della determinazione della risposta immune cellulo-mediata HCMV-specifica come parametro guida del monitoraggio virologico e dell'eventuale intervento terapeutico nei SOTR, al fine di discriminare i pazienti in grado di controllare spontaneamente l'infezione (ossia quelli che hanno ricostituito il livello protettivo di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺), da quelli invece a rischio di sviluppare infezioni gravi e recidivanti, che necessitano quindi di un monitoraggio più stretto, in modo da intervenire prontamente con la terapia antivirale prima dell'insorgenza di una malattia da HCMV (terapia pre-emptive).

Tuttavia, mentre la presenza di linfociti T CD4⁺ HCMV-specifici >0,4/μl di sangue predice il controllo dell'infezione in >95% dei casi, meno chiaro è il ruolo dei linfociti T CD8⁺. Infatti si è osservato come, in assenza dei linfociti T CD4⁺ specifici, i linfociti T CD8⁺ non sono sempre in grado di controllare l'infezione da HCMV (nel 20% dei casi circa si sviluppano infezioni severe che richiedono il trattamento antivirale). Mentre nel soggetto immunocompetente in corso di infezione da HCMV lo sviluppo di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ specifici è simultaneo ed entrambe le popolazioni permangono nel tempo, nei SOTR la presenza di CD8⁺ HCMV-specifici in assenza di CD4⁺ si può verificare in due momenti: a) nella fase iniziale della ricostituzione della funzione immunitaria, quando la ricostituzione dei CD8⁺ precede quella dei CD4⁺; b) in corso di trattamento steroideo per insorgenza di rigetto acuto, situazione in cui si è osservato spesso un abbattimento della risposta T CD4⁺ HCMV-specifica mentre vengono preservati i CD8⁺. Inoltre, in corso di trattamento anti-rigetto, in qualche caso è possibile che anche se viene mantenuta la risposta CD4⁺ il virus possa tornare a replicarsi. Risulta quindi necessario indagare i fattori che possono essere associati alla capacità dei linfociti T CD8⁺ di controllare o meno.

Il test da noi utilizzato per la determinazione dei linfociti T HCMV-specifici valuta solo una delle loro funzioni, ossia la produzione di IFN γ dopo stimolazione (Lozza *et al.*, 2005). Tuttavia diverse attività sono svolte dai linfociti T CD8⁺ nel controllo dell'infezione da HCMV, in primo luogo l'attività citotossica nei confronti delle cellule infettate, per la quale è necessaria la produzione di perforina da parte dei linfociti T CD8⁺. La determinazione della neosintesi di perforina risulta quindi essere un buon surrogato dell'attività citotossica (Hersperger *et al.*, 2008, Makedonas *et al.*, 2009), nonché un marcatore dell'attività protettiva nei confronti di HCMV (Makedonas *et al.*, 2010). Inoltre, la capacità di produrre diverse citochine oltre all'IFN γ (Precopio

et al., 2007) ed in particolare IL-2, fattore importante per la differenziazione e l'acquisizione delle diverse funzioni effettrici da parte dei CD8⁺, risulta essere un importante fattore correlato al controllo delle infezioni virali (Harari *et al.*, 2004, Makedonas *et al.*, 2010). Infine, i linfociti T di memoria possono essere differenziati, a seconda dei alcuni marcatori di membrana, in "central memory" (T_{CM}, CCR7⁺CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻), "effector memory" (T_{EM}, CCR7⁻CD27^{+/-}CD28^{+/-}CD45RA⁻), ed "effector memory" con fenotipo terminalmente differenziato che ri-esprimono CD45RA (T_{EMRA}, CCR7⁻CD27⁻CD28⁻CD45RA⁺); l'emergenza di linfociti T_{EMRA} HCMV-specifici, è stato correlato alla scomparsa del virus dal sangue sia nei pazienti trapiantati (Gamadia *et al.*, 2003) che nei soggetti immunocompetenti (Lillieri *et al.*, 2008) con infezione primaria da HCMV.

E' ipotizzabile quindi che la terapia immunosoppressiva possa alterare una o più delle suddette funzioni (produzione di perforina e quindi citotossicità, produzione di IL-2) nonché lo stato di differenziazione dei linfociti T CD8⁺, preservando invece la produzione di IFN γ , che è l'ultima delle attività ad essere persa in corso di esaurimento funzionale dei linfociti T CD8⁺ (Wherry and Ahmed, 2004).

Ci si propone quindi di approfondire lo studio delle attività dei linfociti T HCMV-specifici nei SOTR, analizzando in particolare la correlazione tra la capacità di controllare l'infezione da HCMV e la: a) presenza linfociti T CD8⁺ in grado di produrre perforina (come surrogato dell'attività citotossica); b) presenza di linfociti T CD8⁺ multifunzionali (in grado di produrre IL-2 e TNF α in associazione all'IFN γ); c) presenza di linfociti T CD8⁺ con fenotipo T_{EMRA}.

Verrà inoltre preliminarmente indagato anche il possibile ruolo dell'immunità innata (linfociti T $\gamma\delta$ ed NK) a supporto della immunità HCMV-specifica, e verranno valutati sistemi di stimolazione alternativi alle DC infettate, mediante l'uso di un lisato di cellule infettate e di una miscela peptidica di diverse proteine di HCMV (Zelini et al, 2010), che possano consentire di ottenere risultati egualmente affidabili in minore tempo (il test basato sulle DC richiede 7 giorni) e utilizzando un minor quantitativi di sangue.

2. OBIETTIVO GENERALE DELLO STUDIO

Studio di diversi aspetti della risposta immune cellulo-mediata HCMV-specifica nel paziente SOTR e loro correlazione con la terapia immunosoppressiva e col controllo dell'infezione

2.1. Obiettivo primario. Valutazione della correlazione tra controllo dell'infezione e: a) attività citotossica (produzione di perforina); b) presenza di linfociti T CD8⁺ multifunzionali (producenti IL-2/TNF α oltre a IFN γ); c) presenza di linfociti T_{EMRA} CD8⁺ HCMV-specifici.

2.2. Obiettivi secondari. Studio della cinetica di ricostituzione delle diverse funzioni immunologiche HCMV-specifiche dopo trapianto d'organo. Analisi preliminare del ruolo dell'immunità innata (linfociti T $\gamma\delta$ ed NK) nel controllo dell'infezione da HCMV nei SOTR. Valutazione di un sistema di stimolazione alternativo a quello delle DC infettate.

3. DISEGNO DELLO STUDIO

- 3.1. Si propone uno studio osservazionale, longitudinale e prospettico** della durata di tre anni su pazienti riceventi trapianto di cuore, polmone e rene
- 3.2. Valutazioni virologiche ed immunologiche.** L'infezione da HCMV verrà monitorata e gestita secondo le procedure diagnostico-terapeutiche adottate presso la Fondazione. Per le indagini immunologiche verranno raccolti prelievi sequenziali per 12 mesi dal trapianto.

4. ELIGIBILITÀ

4.1. Criteri di inclusione

- 4.1.1. Pazienti di età >18 anni sieropositivi per HCMV riceventi trapianto di cuore, rene o polmone da donatore sieropositivo o sieronegativo.
- 4.1.2. Pazienti di età >18 anni sieronegativi per HCMV riceventi trapianto di cuore, rene o polmone da donatore sieropositivo.
- 4.1.3. Consenso informato.

4.2. Criteri di esclusione

- 4.2.1. Pazienti sieronegativi per HCMV riceventi trapianto di cuore, rene o polmone da donatore sieronegativo
- 4.2.2. Pazienti di età <18 anni
- 4.2.3. Assenza di consenso informato.

5. DURATA DELLO STUDIO E VALUTAZIONI PREVISTE

- 5.1. Durata dello studio.** Si prevede una durata di 3 anni: 2 anni per l'arruolamento dei soggetti e 1 anno per completare il follow-up.

5.2. Raccolta dei campioni

- 5.2.1. Il monitoraggio virologico dell'infezione da HCMV sia a livello sistemico (sangue periferico) che locale (lavaggio broncoalveolare -BAL- e biopsie d'organo) seguirà le procedure in atto presso la Fondazione. Verrà determinata la DNAemia una volta la settimana (due volte la settimana in presenza di HCMV DNA nel sangue) per i primi tre mesi dal trapianto, e una volta al mese fino al giorno +360. In caso di presenza di HCMV DNA nel sangue a 3 mesi dal trapianto, il monitoraggio virologico verrà proseguito fino alla scomparsa del virus dal sangue. In corso di terapia anti-rigetto verrà ripreso il monitoraggio virologico settimanale. In presenza di sintomatologia d'organo suggestiva per una possibile

localizzazione di HCMV verrà determinata la carica di HCMV DNA nel BAL o nelle biopsie d'organo.

- 5.2.2. La terapia pre-sintomatica dell'infezione da HCMV verrà iniziata in presenza di >300.000 copie di HCMV DNA/ml di sangue o 100.000 copie di HCMV DNA/ml BAL.
- 5.2.3. Allo stesso modo, il monitoraggio della farmacocinetica dei farmaci immunosoppressori impiegati verrà condotto secondo le procedure in atto presso la Fondazione.
- 5.2.4. Verranno raccolti 20ml di sangue in eparina prima del trapianto e a 30-45-60-90-120-180-270-360 giorni dal trapianto.
- 5.2.5. In caso di trattamento antirigetto verranno raccolti 20ml di sangue in eparina al giorno 0 e al giorno +7 (dall'inizio del trattamento antirigetto); in caso di scomparsa dei linfociti in grado di eseguire una o più delle funzioni immunitarie oggetto dello studio (sintesi di perforina, IL-2, TNF α , fenotipo T_{EMRA}) verrà raccolto un prelievo ogni 15 giorni fino al ripristino delle funzioni immunitarie precedenti il trattamento antirigetto.
- 5.2.6. 200 μ l di sangue verranno conservati a -80°C per la conferma dei risultati virologici o per eventuali indagini future che venissero suggerite dai dati ottenuti nel corso o alla fine dello studio.
- 5.2.7. 500 μ l di sangue saranno destinati alla determinazione delle sottopopolazioni linfocitarie.
- 5.2.8. La rimanente parte di sangue verrà utilizzata per la separazione dei linfomonociti (per le indagini immunologiche) e del plasma, di cui verranno conservate a -80°C 3 aliquote da 1ml per eventuali indagini future sulla risposta immune umorale. 10x10⁶ PBMC verranno utilizzati per la generazione delle DC (necessari 5-7 giorni). Nel caso in cui il paziente presentasse una conta di linfociti T sia CD4⁺ che CD8⁺ <50/ μ l di sangue, il test non verrà eseguito ma gli verrà attribuito un risultato negativo alla determinazione dei linfociti T HCMV specifici (è verosimile che in questo caso la frequenza dei linfociti T HCMV-specifici sia inferiore alla soglia). Altrimenti, in presenza di almeno 50 linfociti T CD4⁺ o CD8⁺/ μ l di sangue le DC verranno infettate con HCMV e quindi cocoltivate con la frazione non aderente dei PBMC criopreservata al momento della generazione delle DC (Lozza *et al.*, 2005). Verrà determinata la frequenza dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ in grado di produrre IFN γ in risposta allo stimolo fornito dalle DC infettate. Questo risultato verrà comunicato al clinico nell'ambito del routinario monitoraggio virologico e immunologico dell'infezione da HCMV. In presenza di linfociti T HCMV-specifici (ossia IFN γ ⁺) >0,4/ μ l di sangue sulle stesse cellule verranno eseguite le indagini addizionali previste per lo studio.
- 5.2.9. In base ai risultati del monitoraggio immunologico, il clinico potrà prendere in considerazione la possibilità di dilazionare il monitoraggio virologico e l'intervento terapeutico dopo la ricostituzione dell'immunità protettiva (linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ HCMV-specifici \geq 0,4 cellule/ μ l di sangue) o decidere se intensificare il monitoraggio (anche dopo i 100 giorni dal trapianto) in assenza di immunità protettiva. Una volta verificata e confermata in due prelievi successivi la ricostituzione dell'immunità protettiva, il monitoraggio immunologico non avrà più valenza diagnostica (se non in corso di trattamento anti-rigetto) ma verrà eseguito solo a scopo di ricerca. In questo caso il risultato non verrà comunicato al clinico.
- 5.2.10. 1,5-3x10⁶ PBMC verranno utilizzati per la stimolazione con lisato di cellule infette e miscela peptidica (Zelini *et al.*, 2010).
- 5.2.11. La quota di linfomonociti non utilizzata per i saggi immunologici verrà conservata in azoto liquido in aliquote da 3-5x10⁶ per la conferma dei risultati o per eventuali indagini future che venissero suggerite dai dati ottenuti nel corso o alla fine dello studio.

5.3. Saggi virologici e immunologici

- 5.3.1. **Quantificazione del DNA di HCMV** su sangue, BAL e biopsie d'organo mediante Real-Time PCR (Gerna *et al.*, 2006b)
- 5.3.2. **Sottopopolazioni linfocitarie:** conta assoluta dei linfociti T CD4⁺, T CD8⁺, T $\gamma\delta$, B ed NK.
- 5.3.3. **Determinazione dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ HCMV-specifici:** lo stimolo specifico sarà fornito da DC autologhe infettate con HCMV (Lozza *et al.*, 2005). Verrà valutata mediante determinazione citofluorimetrica (CFC, cytokine flow cytometry) la quota dei linfociti T HCMV-specifici in grado di produrre IFN γ . In parallelo, verrà determinata la frequenza dei linfociti T HCMV-specifici in grado di produrre IFN γ dopo stimolazione con lisato di cellule infette e miscela peptidica (Zelini *et al.*, 2010).
- 5.3.4. **Analisi aggiuntive sulla funzionalità dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ HCMV-specifici** valutazione della percentuale degli stessi linfociti T HCMV-specifici (IFN γ ⁺ dopo stimolazione) in grado di produrre perforina (attività citotossica), IL-2 e TNF α .
- 5.3.5. **Differenziazione dei linfociti T HCMV-specifici:** valutazione della percentuale degli stessi linfociti T HCMV-specifici (IFN γ ⁺ dopo stimolazione) che esprimono CCR7, CD45RA, CD27, CD28.

5.4. Monitoraggio clinico

- 5.4.1. Verranno segnalati la terapia immunosoppressiva e le sue eventuali variazioni, gli episodi di rigetto e il relativo trattamento.
- 5.4.2. Verrà segnalato lo sviluppo di sintomatologia d'organo o sistemica potenzialmente correlata all'infezione da HCMV ed i relativi segni radiologici, endoscopici e istologici.

6. NUMEROSITÀ DEL CAMPIONE/PIANO DI ANALISI

- 6.1 **Si arruoleranno (in 12-18 mesi) 60 SOTR**, dei quali almeno il 10% (valore minimo dell'intervallo di confidenza al 95% della frequenza dell'evento) svilupperà una risposta CD8⁺ non in grado di proteggere dall'infezione da HCMV (ossia raggiungeranno il cutoff per il trattamento dell'infezione sistemica pari a 300.000 copie di HCMV DNA/ml di sangue in presenza di >0.4 linfociti T CD8⁺ HCMV-specifici). Ipotizzando che uno dei tre potenziali parametri protettivi esaminati (perforina, IL-2/TNF α , fenotipo T_{EMRA}) sia presente in <10% dei pazienti "non protetti" e in almeno il 70% dei pazienti "protetti" e utilizzando il test esatto di Fisher, saranno infatti necessari 60 pazienti (6 non protetti *vs* 54 protetti) per evidenziare tale differenza tra i due gruppi con un livello di significatività <0.05 e una potenza >0.80.
- 6.2 **Piano di analisi dell'obiettivo primario:** alla fine dello studio verranno confrontate la frequenza dei pazienti "non protetti" che presentano CD8⁺ HCMV-specifici positivi per a) perforina, b) IL-2/TNF α , c) fenotipo T_{EMRA}) prima dell'inizio del trattamento antivirale e la frequenza dei pazienti "protetti" che presentano CD8⁺ HCMV specifici positivi per i tre suddetti parametri prima della risoluzione spontanea dell'infezione.

6.3 Piano di analisi degli obiettivi secondari:

- a. analisi della frequenza dei pazienti che ricostituiscono la capacità di produrre perforina, IL-2/TNF α , fenotipo T_{EMRA} ai diversi tempi dal trapianto esaminati;
- b. analisi della frequenza dei linfociti T $\gamma\delta$ ed NK nei pazienti “protetti” vs “non protetti”;
- c. analisi delle alterazioni provocate dalla terapia anti-rigetto nelle funzioni linfocitarie studiate;
- d. confronto dei risultati ottenuti col test basato sulle DC e col test basato sulla stimolazione con lisato di cellule infette e miscela peptidica.

6.4 Scheda raccolta dati: vedi allegato.

7. FINANZIAMENTO

Il finanziamento per i saggi non diagnostici dello studio verrà ottenuto dalla Fondazione Carlo Denegri

8. STRUTTURE PARTECIPANTI E PERSONALE COINVOLTO

Laboratori Sperimentali di Ricerca-Area Trapiantologica

Dr.ssa Eloisa Arbustini
Prof. Giuseppe Gerna
Dr. Daniele Lilleri
Dr.ssa Chiara Fornara
Dr.ssa Manuela Agozzino
Sig.ra Daniela Sartori

Laboratori Sperimentali di Ricerca-Area Biotecnologie

Prof. Giampaolo Merlini

Virologia e Microbiologia

Dr. Fausto Baldanti
Dr. Maurizio Zavattoni
Dr.ssa Milena Furione
Dr.ssa Giuditta Comolli
Dr.ssa Antonella Chiesa
Dr.ssa Vanina Rognoni
Dr.ssa Paola Zelini

Laboratorio di Farmacocinetica Clinica

Dr. Mario Ragazzi

Malattie Infettive 1

Prof. Lorenzo Minoli
Dr.ssa Eleonora Sarchi

Cardiochirurgia

Prof. Mario Vigano
Prof. Andrea D'Armini
Dr. Carlo Pellegrini

Pneumologia

Prof.ssa Federica Meloni
Dr. Tiberio Oggionni
Dr. Alessandro Cascina

Nefrologia

Prof. Antonio Dal Canton
Dr.ssa Teresa Rampino

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- 1) Fishman JA, and Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1741-1751.
- 2) Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood*. 2003; 101: 2686-92.
- 3) Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, Pellegrini C, Meloni F, Rampino T. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2006; 6: 2356-64
- 4) Gerna G, Vitulo P, Rovida F, Lilleri D, Pellegrini C, Oggionni T, Campanini G, Baldanti F, Revello MG. Impact of human metapneumovirus and human cytomegalovirus versus other respiratory viruses on the lower respiratory tract infections of lung transplant recipients. *J Med Virol*. 2006;78:408-16. Erratum in: *J Med Virol*. 2008;80:1869.
- 5) Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood*. 2004;103:966-72.
- 6) Hersperger AR, Makedonas G, Betts MR. Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells. *Cytometry A*. 2008; 73:1050-7.
- 7) Lilleri D, Fornara C, Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific memory CD8+ and CD4+ T cell differentiation after primary infection. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):536-43.
- 8) Lozza L, Lilleri D, Percivalle E, Fornara C, Comolli G, Revello MG, Gerna G. Simultaneous quantification of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells by a novel method using monocyte-derived HCMV-infected immature dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2005;35:1795-804
- 9) Makedonas G, Banerjee PP, Pandey R, Hersperger AR, Sanborn KB, Hardy GA, Orange JS, Betts MR. Rapid up-regulation and granule-independent transport of perforin to the immunological synapse define a novel mechanism of antigen-specific CD8+ T cell cytotoxic activity. *J Immunol*. 2009;182:5560-9.
- 10) Makedonas G, Hutnick N, Haney D, Amick AC, Gardner J, Cosma G, Hersperger AR, Dolfi D, Wherry EJ, Ferrari G, Betts MR. Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000798.
- 11) Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, Asher TE, Douek DC, Harari A, Pantaleo G, Bailer R, Graham BS, Roederer M, Koup RA. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8+ T cell responses. *J Exp Med*. 2007;204:1405-16.
- 12) Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol*. 2004; 78:5535-45.
- 13) Zelini P, Lilleri D, Comolli G, Rognoni V, Chiesa A, Fornara C, Locatelli F, Meloni F, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell response determination: comparison of short-term (24h) assays vs long-term (7-day) infected dendritic cell assay in the immunocompetent and the immunocompromised host. *Clin Immunol*. 2010;136:269-81.