



Università degli Studi di Trieste

XXIV ciclo del Corso di Dottorato di Ricerca in
MEDICINA MATERNO INFANTILE,
PEDIATRIA DELLO SVILUPPO E DELL'EDUCAZIONE,
PERINATOLOGIA

Attivazione e deplezione selettiva di linfociti antigene-specifici

Settore scientifico disciplinare MED/38 – Pediatria generale e specialistica

Dottoranda
Elisa Piscianz

Coordinatore
Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura

Tutore
Dr. Marco Rabusin

Correlatore
Dr. Alberto Tommasini

Anno accademico 2010/2011

Riassunto

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (TSCE) consiste nell'infusione di cellule staminali di donatore in grado di ripopolare l'intero sistema emopoietico del ricevente. Con il TSCE, però, viene infusa anche una certa quota di linfociti maturi specifici contro vari antigeni. Questi sono capaci di dar origine ad una risposta immune "positiva" o "utile" che può proteggere il ricevente da infezioni e recidive, perché una volta infusi nel ricevente sono capaci di rispondere ai patogeni (*Graft versus Infection*) o agli antigeni tumorali (*Graft versus Tumor*). D'altra parte, però, linfociti specifici contro gli antigeni dell'ospite possono dar origine alla reazione di rigetto del "trapianto contro l'ospite" (*Graft versus Host Disease*, GvHD) in cui i linfociti del donatore riconoscono come *non-self* gli antigeni tissutali del ricevente (alloantigeni).

Recentemente diversi gruppi hanno studiato come migliorare l'esito del trapianto, mettendo a punto diversi protocolli per eliminare solo le cellule responsabili di GvHD, ma molto va ancora fatto per ottimizzare queste tecniche e far sì che non vengano persi anche i linfociti patogeno-specifici o regolatori.

Questo lavoro ha voluto mettere a punto un metodo di deplezione basato sull'uso di piccole molecole in grado di interferire con il processo di attivazione e proliferazione dei linfociti in risposta allo stimolo allogenico.

Per fare questo sono state selezionate diverse molecole: il Metotrexate, che interferisce con il metabolismo di sintesi delle basi puriniche; il Phenoxodiololo che altera il potenziale di membrana; il Tasocitinib che blocca la via di trasduzione del segnale di JAK3; il Bortezomib, un inibitore del proteosoma; l'acido 3-idrossiantranilico (3-HAA), che agisce consumando il GSH necessario durante il processo proliferativo e induce l'apoptosi per *burst* ossidativo, effetto che può essere aumentato dalla presenza di ioni di manganese.

Inizialmente i farmaci sono stati testati sia su cellule non stimulate che su cellule attivate con PHA, per identificare il farmaco in grado di esercitare la massima azione tossica sulle cellule attivate ma non su quelle non stimulate. In questa fase, il 3-HAA (con o senza l'aggiunta di ioni manganese) e il Bortezomib sono risultati i farmaci dotati di maggiore selettività e potenza. Nella fase successiva, è stata studiata l'azione di questi farmaci su linfociti sottoposti ad uno stimolo allogenico, costituito da linee linfoblastoidi trasformate con virus di *Epstein Barr*. Infine il 3-HAA in associazione con gli ioni di manganese è stato utilizzato per depletare i linfociti attivati in co-coltura con cellule dendritiche. Dopo la coltura primaria le cellule sono state restimate con cellule dendritiche dello stesso donatore o di donatore diverso per verificarne la reattività residua.

I risultati mostrano che tra i farmaci selezionati inizialmente, il 3-HAA, in associazione con $MnCl_2$ mostra una sufficiente azione tossica selettivamente sulle cellule attivate, risparmiando le cellule non attivate. Il Bortezomib che inizialmente aveva dato risultati interessanti, non ha mostrato negli esperimenti successivi un effetto ripetibile.

Uno dei problemi emersi, che resta da valutare, è la relativa non-responsività alla restimolazione nelle cellule trattate con i farmaci, forse per la persistenza del farmaco o del suo effetto al loro interno. Il passo successivo sarà mettere a punto le tempistiche ottimali per verificare la reattività residua dopo la deplezione.

In generale però, questi risultati mostrano che l'allodeplezione con i farmaci è una strada percorribile, anche se molto va ancora fatto per ottimizzare le tempistiche di somministrazione dei farmaci e sulla valutazione della reattività residua.

Abstract

Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) consists in an infusion of donor haematopoietic stem cells that can reconstitute the entire hematopoietic system in the host. With HSCT, a variable percentage of mature lymphocytes can be infused together with stem cells. These lymphocytes can result useful, protecting the host from infections (Graft versus Infection) and disease relapse (Graft versus Tumor). On the other side, these lymphocytes can react against tissue host antigens, recognized as *non-self* (alloantigens) and cause the so called Graft versus Host Disease (GvHD).

Recently, several groups tried to improve the outcome of transplantation, by developing different protocols to deplete cells responsible of GvHD, while sparing useful lymphocytes. Unfortunately, much has still to be done to optimise these methods and in particular to ensure that pathogen-specific lymphocytes or regulatory cells are not depleted together with alloreacting cells. With this work, we tried to develop a drug-based method for allodepletion, by using molecules that can interfere with the lymphocyte metabolism of activation and proliferation against alloantigens.

Five molecules have been selected for this purpose: Methotrexate, that interferes with the metabolism of purine synthesis; Phenoxodiol, that impairs the cell membrane potential; Tasocitinib, that blocks the JAK3 pathway of signal transduction; Bortezomib, that inhibits the proteasome; 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA), that uses up the GSH during proliferation and induces apoptosis by means of oxidative burst, effect that can be enhanced by the administration of manganese ions.

A first evaluation of these drugs was accomplished by treating with the different drugs both resting and PHA-stimulated lymphocytes to verify if selective toxicity could be obtained on activated cells, compared to resting cells. 3-HAA (+/- MnCl₂) and Bortezomib showed the most selective effect on activated cells and were selected for the following phases of the study. In a second phase these drugs were applied on a model of alloreactive response, using as stimulators allogeneic EBV-transformed lymphocytes.

Finally, 3-HAA and MnCl₂ were used to deplete lymphocytes activated against allogenic dendritic cells. After the co-culture in the presence of the drug, the yield of depletion was evaluated by measuring the residual reactivity of lymphocytes against the same dendritic cells or against third party dendritic cells. In conclusion, our results showed that, among the selected drugs, only 3-HAA, in association with manganese ions, was able to have a sufficient selective toxic effect on activated cells while sparing resting cells. The effect of Bortezomib was less consistent.

Some technical problems remain to be addressed. In particular, in the restimulation test, treated cells seemed to be unresponsive also to third party, probably because a persistence of the drug in the cells. In general, this work showed that allodepletion with drugs is a feasible procedure, but much more has to be done to optimise the timing of administration and the evaluation of residual reactivity.

Indice

Introduzione	1
Il trapianto di cellule staminali emopoietiche	1
Problematiche del trapianto: istocompatibilità, attecchimento, <i>Graft versus Host Disease</i> , infezioni	5
Istocompatibilità, sistema HLA e alloantigeni	5
Homing e attecchimento delle CSE	9
Complicanze del trapianto: <i>Graft versus Host Disease</i>	10
Complicanze del trapianto: le infezioni	11
L'infusione di linfociti maturi nel trapianto: due facce della stessa medaglia	14
Manipolazioni per migliorare il trapianto	15
Inattivazione delle cellule dendritiche autologhe	15
Maturazione timica dei linfociti	15
Deplezione dei linfociti maturi del donatore	17
Infusione di linfociti del donatore attivi contro i patogeni	18
Infusione di cellule regolatorie	18
Deplezione specifica delle cellule alloreattive	19
Farmaci e piccole molecole per l'allodeplezione	21
Obiettivi	27
Obiettivo generale	27

Obiettivi specifici	27
Materiali e metodi	28
Disegno sperimentale	28
Colture cellulari	29
Coltura di linee linfoblastoidi trasformate con EBV (LCL-EBV)	29
Maturazione <i>in vitro</i> di cellule dendritiche (DC)	29
Test di Reazione Linfocitaria Mista (MLR)	31
Deplezione delle cellule attivate con farmaci	32
Selezione dei farmaci	32
Deplezione dopo stimolo allogenico	33
Valutazione delle reattività residua dopo deplezione	34
Risultati e discussione	35
Selezione dei farmaci	35
MLR con LCL-EBV	37
Acido 3-idrossiantranilico e ioni di manganese	38
Acido 3-idrossiantranilico e Bortezomib	40
MLR con DC e test di restimolazione	42
Conclusioni	45
Bibliografia	48

Introduzione

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) consiste nella somministrazione di cellule capaci di rigenerare gli elementi ematici maturi. Le CSE si trovano prevalentemente nel midollo osseo, che fino a qualche anno fa, era la sorgente di cellule staminali più utilizzata (si parlava perciò di trapianto di midollo osseo). Una piccola quota di CSE, però circola anche nel sangue periferico e con procedure particolari (mobilizzazione) è possibile raccoglierle a scopo trapiantologico [1]. Per questo oggi è convenzionalmente accettato il termine di “trapianto di cellule staminali emopoietiche” (TCSE) per riferirsi sia al trapianto di midollo che al trapianto di cellule staminali periferiche.

In linea generale, le CSE vengono prelevate dal midollo osseo o dal sangue periferico “mobilizzato” di un donatore e successivamente infuse per via endovenosa al ricevente [2, 3].

In base all’origine delle cellule trapiantate si distinguono diversi tipi di trapianto:

- trapianto autologo (o autotrapianto), quando le CSE vengono prelevate al paziente, che è al tempo stesso donatore e ricevente;
- trapianto allogenico (o allotrapianto), quando il donatore è una persona sana, diversa dal ricevente [1].

Il trapianto autologo è ovviamente riservato a patologie neoplastiche che non infiltrano il midollo osseo (ad esempio nei tumori solidi), dove la conservazione di CSE può consentire di aumentare le dosi dei chemioterapici senza preoccuparsi troppo del danno midollare provocato. L'allogene trapianto è invece preferibile in tutte le patologie maligne del sangue (leucemie acute o croniche) ad alto rischio di recidiva, nelle malattie non maligne genetiche che coinvolgono il sistema emopoietico (immunodeficienze primitive, anemia di Fanconi), nelle malattie non maligne acquisite (anemia aplastica grave) e in alcuni tumori solidi per sfruttare l'attività immunologica dei linfociti del donatore contro il tumore (*Graft versus Tumor*, GvT) [1].

Attualmente, ogni anno, nel mondo vengono effettuati all'incirca 50.000 trapianti di CSE.

Con il trapianto, dalle cellule staminali emopoietiche, hanno origine un nuovo sistema emopoietico e un nuovo sistema immunitario, geneticamente uguali a quelli del donatore, ma in grado di convivere e interagire con tutti gli altri organi e funzioni del ricevente per garantire l'omeostasi corporea. Il trapianto ha modificato, da un lato, le prospettive di sopravvivenza di pazienti affetti da malattie ad esito altrimenti infausto (immunodeficienze primitive; leucemie acute e croniche resistenti alla chemioterapia) e dall'altro ha sostanzialmente migliorato la qualità di vita associata ad alcune patologie (anemia falciforme e *thalassemia major*). È quindi definibile come una vera e propria rivoluzione terapeutica incominciata anni or sono e progressivamente raffinata col tempo grazie ad una serie di scoperte innovative nel campo dell'istocompatibilità, della criobiologia, dell'infettivologia.

Le CSE infuse sono in grado di raggiungere il midollo osseo del paziente (*homing*) e ripopolarlo differenziandosi in tutte le linee emopoietiche. Insieme alle CSE, inoltre, si trova una più o meno ampia quota di cellule mesenchimali, in grado di supportare la differenziazione dei precursori [4]. Il processo di *homing* è dovuto alla presenza nel midollo di fattori chemiotattici e di adesione in grado di

“attirare” le cellule staminali. Questo processo è più accentuato se il midollo viene impoverito in precedenza per mezzo di una chemio-radioterapia (mieloablazione).

Le CSE sono state descritte già dagli anni '70 da diversi autori [5-8] come cellule dotate di un ampio potenziale proliferativo e di capacità di differenziamento in tutte le linee emopoietiche. Queste cellule rappresentano lo 0.005-0.01% della popolazione midollare e possiedono, oltre alle caratteristiche di differenziamento e plasticità, anche la capacità di auto-mantenimento tipica delle cellule staminali.

Sono identificate generalmente grazie all'espressione di antigeni di superficie, tra cui il CD34 [4]. L'antigene CD34 è espresso sulle cellule progenitrici precoci e sui precursori mieloidi, mentre non è espresso sulle cellule mature della linea mieloide e sui linfociti T e B maturi. Cellule CD34⁺, inoltre, possono esprimere anche marcatori di membrana della linea T-linfoide (CD2, CD3, CD7) e della linea B-linfoide (CD19) [9].

In realtà, solo una parte delle cellule infuse durante il trapianto è rappresentata da CSE (Figura 1), a meno che non vengano applicate particolari procedure per purificare solo queste cellule. Il campione contiene infatti una quota più o meno elevata di linfociti maturi, selezionati e cresciuti nel donatore e potenzialmente pericolosi per il ricevente.

Nel caso di trapianto autologo, le cellule emopoietiche e immunocompetenti riconoscono gli antigeni di istocompatibilità dell'ospite come propri e non causano quindi alcuna reazione immunologica (rigetto) ed a loro volta non vengono rigettate, dato che sono riconosciute come *self*. Nel trapianto allogenico, invece, le cellule del donatore possono condividere solo una parte degli antigeni di istocompatibilità con quelli del ricevente e possono perciò riconoscere quest'ultime come estranee e dar luogo a reazioni di rigetto contro l'ospite. Di conseguenza è importante considerare il rapporto costi/benefici di questo tipo di trattamento, per ciascuna patologia e sostanzialmente per ciascun paziente.

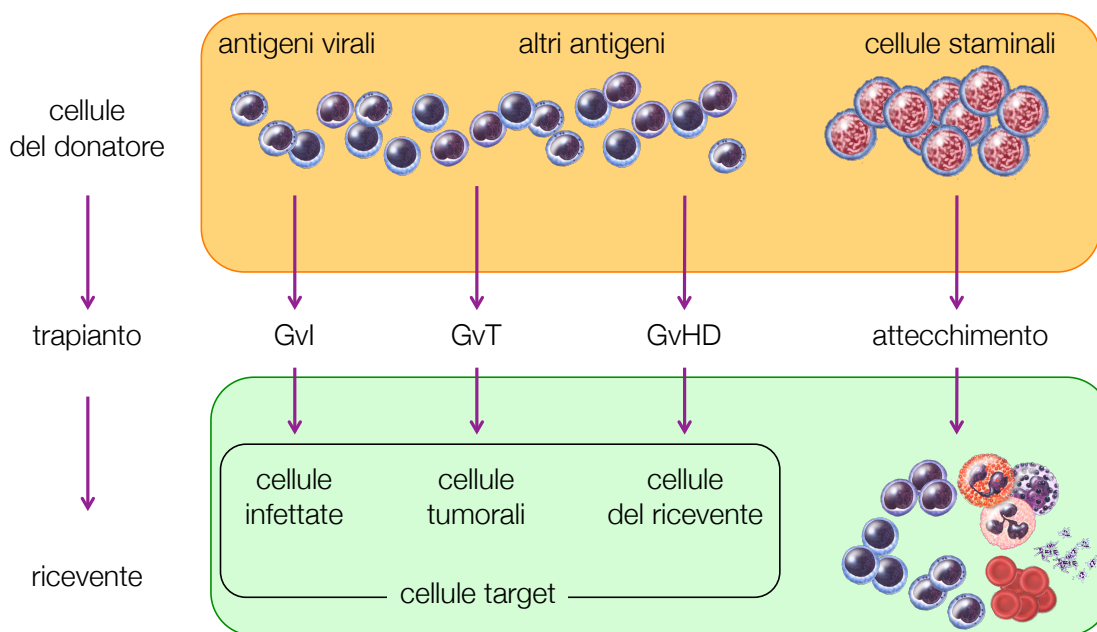


Figura 1. Rappresentazione schematica del trapianto di cellule staminali emopoietiche. Le cellule del donatore (riquadro arancione) contengono le cellule staminali che, una volta infuse nell'ospite (riquadro verde) daranno origine ad un nuovo sistema emopoietico. Tra le cellule espianate persiste però anche una quota di cellule mature reattive contro antigeni virali, antigeni tumorali e alloantigeni (altri antigeni). Queste, una volta infuse nell'ospite possono dar origine alle reazioni immuni contro le cellule infettate da virus (Graft versus Infection, GvI), verso le cellule tumorali (Graft versus Tumor, GvT) e verso le cellule dell'ospite (Graft versus Host Disease, GvHD).

La decisione di sottoporre un paziente al TCSE dipende, infatti, dalla sua età, dalla patologia (e quindi dalla prognosi: in fase precoce subito dopo la diagnosi, in fase di recidiva o dopo la progressione della patologia) e dalle alternative al trapianto disponibili. Ad esempio, nel caso di forme leucemiche a cattiva prognosi, caratterizzate da un elevato rischio di ricaduta, un paziente che risponde in modo positivo alla chemioterapia o che sconfigge la malattia con un solo ciclo di terapia, viene considerato il candidato migliore per il trapianto.

L'età del ricevente è la più importante variabile per quanto riguarda l'esito del trapianto: nei bambini dà risultati migliori rispetto agli adulti, ed è da tenere in considerazione soprattutto l'età biologica rispetto a quella cronologica [10, 11]. L'uso del trapianto si è esteso a un gran numero di patologie, rispetto a

trent'anni fa, quando questa terapia era indicata solo per malattie rapidamente mortali come le leucemie acute intrattabili, l'anemia aplastica e le immunodeficienze congenite.

Soprattutto in pediatria (dove si ha una maggior percentuale di successo) l'allograft viene utilizzato nella cura di leucemie, di linfomi maligni resistenti alla terapia, di tumori solidi in fase avanzata e richiede innanzitutto la somministrazione di una chemio-radioterapia mieloablative (regime di condizionamento) il cui scopo principale è quello di determinare l'immunosoppressione necessaria per impedire il rigetto del trapianto o nel caso di emopatie maligne di contribuire all'eradicazione del clone neoplastico [2].

Problematiche del trapianto: istocompatibilità, attecchimento, *Graft versus Host Disease*, infezioni

Istocompatibilità, sistema HLA e alloantigeni

Com'è noto, il trapianto di tessuti tra due individui geneticamente diversi provoca una catena di reazioni immuni che terminano con il rigetto, a meno che non si provochi una grave immunodeficienza nel ricevente (od ospite). Quando il tessuto trapiantato è un tessuto immunocompetente, come nel caso delle CSE, bisogna tenere inoltre conto del rischio che i linfociti contenuti e/o originati dal trapianto producano una reazione immune contro l'ospite detta "malattia del trapianto contro l'ospite" (*Graft versus Host Disease*, GvHD). Sia il rigetto che la GvHD sono innescati dalla diversità, tra donatore e ricevente, di un gruppo di antigeni cellulari di superficie che nel loro insieme vengono definiti antigeni di istocompatibilità [2]. La compatibilità dei tessuti è determinata da antigeni codificati da un complesso di geni definiti MHC (*Major Histocompatibility Complex*) anche denominati HLA (*Human Leucocyte Antigens*). Questi geni codificano per molecole glicoproteiche della superficie cellulare in grado di

interagire con antigeni nel loro processo di presentazione, svolgendo quindi un ruolo di fondamentale importanza nei fenomeni della risposta immunitaria.

I geni che codificano per gli antigeni HLA sono situati sul braccio corto del cromosoma 6 e vengono ereditati in blocco, dato che i fenomeni di *crossing-over* in questa regione sono rari. Data l'ampia diversità di alleli disponibili per ciascun *locus*, in ogni individuo si potrà trovare una combinazione caratteristica di HLA, definita come aplotipo.

Vi sono due classi principali di questi antigeni, gli antigeni di classe I e di classe II. Gli antigeni di classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) sono rappresentati da eterodimeri formati da due catene, la catena α , altamente polimorfica, e la β 2-microglobulina; sono espressi in quasi tutte le cellule nucleate dell'organismo e sulle piastrine. Il livello di espressione di questa molecola è altamente variabile e può essere aumentato dall'esposizione ad alcune citochine (come *Interferon- α* e *β* e *Tumor Necrosis Factor- α*). Gli HLA di classe I costituiscono degli adattatori molecolari in grado di esporre peptidi antigenici (ad esempio derivati dall'infezione della cellula) sulla membrana, in modo che questi possano essere riconosciuti dai linfociti CD8⁺. Il riconoscimento dell'antigene ristretto all'HLA e non in fase solubile consente al linfocita T di svolgere il suo effetto citotossico solo sulla cellula "contrassegnata" dall'antigene anomalo [2, 12].

Gli antigeni di classe II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) sono formati da una catena α ed una catena β entrambe codificate sul cromosoma 6. Sono presenti solo su alcune cellule del sistema immunitario: sui linfociti B, sui monociti circolanti, sulle cellule di *Langerhans*, sui linfociti T attivati e su una piccola percentuale di questi ultimi a riposo, oltre che su alcune cellule tumorali. Alcuni fattori sierici come l'*Interferon- γ* (IFN- γ) e l'Interleuchina-4 (IL-4) possono aumentare l'espressione di questi antigeni. Gli antigeni di classe II sono coinvolti nella presentazione degli antigeni ai linfociti T CD4⁺ da parte di monociti, macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B. Sono perciò importanti nella fase di sensibilizzazione dell'immunità cellulo-mediata e nella cosiddetta risposta adattativa agli antigeni. Inoltre hanno una funzione centrale nell'induzione della

tolleranza durante la maturazione del sistema immunitario attraverso l'eliminazione (delezione) di cloni di linfociti T autoreattivi.

I geni dell'HLA sia di classe I che di classe II sono estremamente polimorfici, caratteristica che si è evoluta per permettere il riconoscimento di una grande varietà di antigeni microbici. Ogni molecola di HLA, infatti, differisce leggermente dalle altre nella sequenza amminoacidica e ciò permette piccole variazioni nella struttura tridimensionale della tasca di legame con i peptidi. Questo risulta essere fondamentale per la capacità di rispondere ai diversi stimoli antigenici e rappresenta la base biologica della capacità di ogni individuo di discriminare tra *self* e *non-self* [12].

Da quanto detto, sia la diversità dell'HLA di classe I che quella di classe II possono avere diverse ripercussioni sul trapianto. In particolare, i linfociti del donatore, che esprimono sia gli HLA di classe I che quelli di classe II, possono essere riconosciuti come estranei e rigettati da eventuali linfociti residui del ricevente. Viceversa, i linfociti del donatore possono riconoscere la diversità degli HLA di classe I su tutte le cellule del ricevente. Ci si potrebbe attendere, quindi, che l'incompatibilità di classe II non sia un problema in questo contesto, dato che le cellule emopoietiche del ricevente sono state eliminate durante il condizionamento e le altre cellule esprimono scarsi o nulli livelli di HLA di classe II. In realtà, il condizionamento non elimina le cellule dendritiche e queste persistono con il patrimonio di antigeni di classe II dell'ospite e possono costituire un centro organizzativo di un'estesa attivazione dei linfociti del donatore. Per i linfociti del donatore, infatti, incontrare un diverso HLA di classe II sarà come riconoscere un proprio HLA di classe II modificato da un peptide antigenico. Questo riconoscimento produrrà una risposta infiammatoria e un supporto all'attivazione di altri linfociti CD4⁺ e CD8⁺ reattivi contro l'ospite.

Nel momento in cui, per un paziente, viene scelta la strada terapeutica del trapianto allogenico, si avvia la ricerca del donatore che deve essere selezionato quindi sulla base della disponibilità e dell'istocompatibilità. L'allograpianto può essere effettuato da:

- gemello monozigote (evenienza che si verifica assai di rado), che equivale ad un autotrapianto, pertanto non gravato da rischio di GvHD. Tuttavia, nel caso che la procedura sia stata eseguita per una malattia neoplastica, viene meno l'effetto di GvT e aumenta il rischio di recidive e la procedura è ovviamente inutile nelle malattie genetiche.
- familiare HLA-identico (cioè fratello o sorella che hanno ricevuto dai genitori gli stessi antigeni HLA); dato che ciascun figlio ha il 50% di probabilità di ricevere una delle due copie dei geni HLA da ciascun genitore, solo il 25% ($50\% \times 50\% = 25\%$) dei pazienti dispone di un familiare identico [13];
- familiare non HLA-identico: ovvero un genitore o familiare che condivide solo uno dei due insiemi HLA (alplotipi) del paziente [13-15];
- *Matched Unrelated Donor* (MUD): quando non sono disponibili familiari compatibili si ricerca un individuo non consanguineo HLA-identico (che condivide cioè il genotipo su 10 loci dei principali antigeni HLA, Figura 2). In questo caso, però, il processo può richiedere diversi mesi tra l'inizio della ricerca e la donazione del midollo, il che non è sempre accettabile nel caso di pazienti affetti da malattia rapidamente progressiva che necessitano di trapianti urgenti; più spesso ci si deve accontentare di un donatore parzialmente compatibile (meno di 10/10 loci identici): con questo tipo di donatore il trapianto è correlato ad un'alta mortalità (30-40%) e con lunghi tempi di morbidità [13];
- sangue cordonale: è un'alternativa alle precedenti fonti, utilizzata soprattutto negli ultimi anni perché in grado di limitare il rischio di GvHD anche in presenza di piccole disparità dell'HLA. Purtroppo, la quantità di CSE ottenibili da campioni di sangue cordonale è di solito molto più

bassa di quella che si può avere con i donatori adulti, cosa che per ora ha giustificato un frequente ricorso a questa sorgente solo per i trapianti in età pediatrica, che richiedono minori quantità di CSE [13].

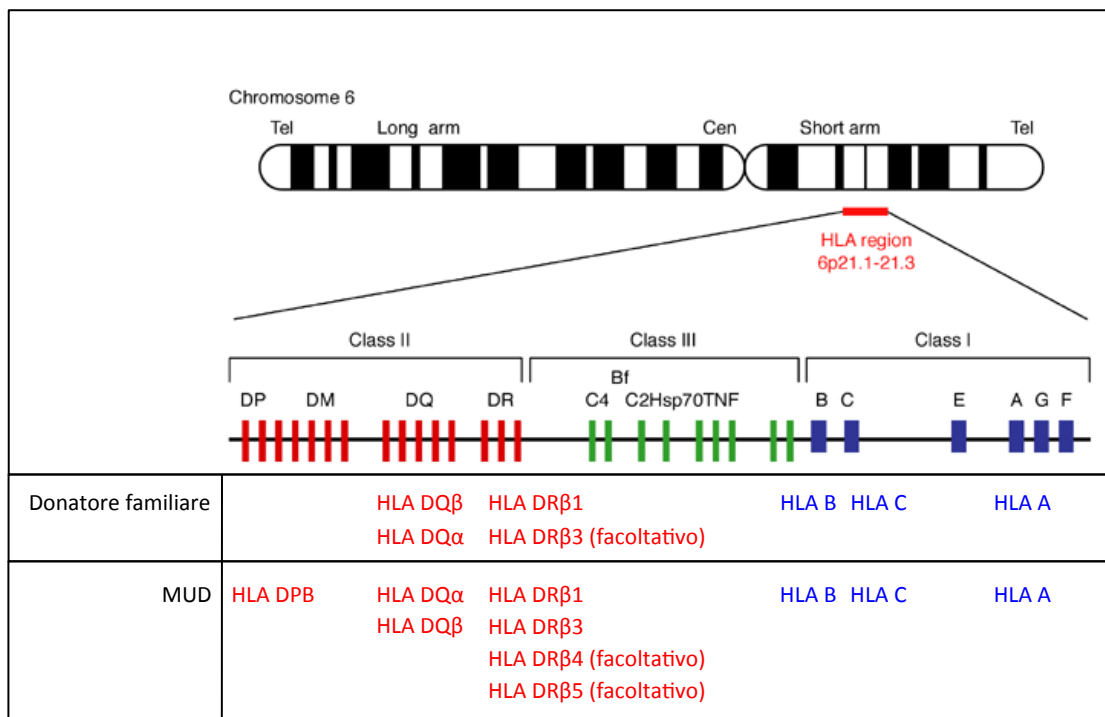


Figura 2. Loci HLA tipizzati per la ricerca del donatore. La figura rappresenta la mappa dei geni MHC sul cromosoma 6 che codificano per gli antigeni HLA. Sono evidenziati i loci che sono analizzati durante la selezione del donatore familiare (da 6 a 7) o MUD (da 8 a 10). I loci DQ α e DP α non sono generalmente tipizzati perché poco polimorfici.

Homing e attecchimento delle CSE

Una volta infuse per via endovenosa, le cellule staminali emopoietiche raggiungono e colonizzano le nicchie a livello del microambiente midollare (processo che viene definito fenomeno di *homing*) e qui, sotto l'azione regolatoria delle cellule stromali e dei fattori di crescita emopoietici prodotti da queste ultime, inizieranno i processi proliferativi e differenziativi necessari ad una completa ricostituzione emopoietica.

L'attecchimento in sé delle CSE infuse richiede un periodo di circa 2-3 settimane che serve principalmente per la ripresa funzionale del nuovo sistema emopoietico. Durante il periodo di aplasia, nel quale ancora non vi è stato un

vero e proprio attecchimento, bisogna tener conto di un'insufficiente rigenerazione di globuli rossi, piastrine e globuli bianchi e di conseguenza di un aumentato rischio di anemia, emorragie e infezioni. Vanno perciò messe in pratica una serie di misure preventive come la trasfusione di emocomponenti, l'isolamento del ricevente in ambiente a bassa carica batterica, l'identificazione molecolare delle infezioni prima della comparsa dei sintomi clinici e la terapia di queste con farmaci antibiotici a largo spettro, antivirali e antimicotici.

In alcuni casi, vengono inoltre utilizzate sostanze come *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF) e *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) in grado di stimolare la proliferazione e promuovere la differenziazione dei progenitori e precursori emopoietici [2].

Complicanze del trapianto: *Graft versus Host Disease*

Tutti i trapianti allogenici, con l'eccezione di quello effettuato da gemello monozigote, possono comportare il rischio di sviluppare la "malattia del trapianto contro l'ospite" o *Graft versus Host Disease* (GvHD), che contribuisce in modo significativo alla mortalità secondaria al trapianto e ai suoi effetti invalidanti a distanza.

Fra i 10 e i 100 giorni dal trapianto può insorgere la GvHD acuta (aGvHD) determinata dalla presenza di linfociti T maturi nell'inoculo midollare del donatore. Queste cellule possono essere in grado di riconoscere come *non-self* gli antigeni dell'HLA e altri antigeni polimorfici del ricevente e di mediare un'aggressione verso gli organi del paziente [2, 16]. Lo sviluppo della aGvHD è solitamente diviso in tre fasi: innanzitutto vi è un danno ai tessuti, dovuto a farmaci o infezioni, con produzione di citochine infiammatorie come TNF- α ed IL-1 [17-19]; quindi vi è un'attivazione delle cellule T del donatore in un contesto pro-infiammatorio, in cui l'importanza di piccole diversità negli HLA può essere notevolmente amplificata; come ultima fase vi è l'effettivo danno dell'organo che provoca una complessa interazione di citochine e cellule, linfociti T citotossici, CD4⁺ e CD8⁺, che sono i maggiori effettori cellulari della GvHD e causa di morte delle cellule.

Nei pazienti pediatrici l'incidenza e la gravità della aGvHD sono nettamente ridotte rispetto a quello che si riscontra nei soggetti adulti.

Nel 45% dei pazienti adulti, meno in quelli pediatrici, oltre i 100 giorni dal trapianto, può svilupparsi la GvHD cronica (cGvHD) che rimane ad oggi la maggior causa di morte dopo trapianto. A differenza della aGvHD, la forma cronica sembra dovuta all'azione di linfociti originati nel timo dell'ospite a partire dalle CSE infuse: in presenza di una normale maturazione timica, queste cellule dovrebbero naturalmente imparare a tollerare gli antigeni dell'ospite, presentati dall'epitelio timico, ma purtroppo ciò spesso non avviene, probabilmente a causa di condizioni svantaggiose come un'eventuale GvHD acuta e/o la tossicità di farmaci utilizzati nelle prime settimane dopo il trapianto.

La ciclosporina-A è un farmaco che riesce a prevenire la fase di innesco e amplificazione della risposta immunitaria alla base della GvHD, grazie ad un'azione inibitoria sulla produzione di IL-2 e sull'espressione del suo recettore. Quando viene associata a Metotrexate si riduce ulteriormente l'incidenza e la gravità della GvHD. Questo però nei pazienti leucemici determina un incremento del rischio di recidiva post-trapianto, oltre che una ritardata maturazione del nuovo sistema immune, con aumentato rischio di infezioni.

Nell'allogene trapianto effettuato in caso di leucemia, un ruolo determinante per il successo della procedura trapiantologica è svolto dall'effetto *Graft versus Leukemia* (GvL). Alla base dell'effetto GvL ci sono fenomeni di citotossicità mediati da cellule immunocompetenti del donatore verso eventuali cellule maligne clonogeniche sopravvissute alla terapia di condizionamento. Nell'uomo l'effetto GvL non è facilmente separabile dalla reazione di GvHD e il trapianto di CSE viene spesso praticato accettando una piccola diversità HLA e una GvHD "pilotata", proprio per migliorare la cura della malattia di base [2].

Complicanze del trapianto: le infezioni

Altra complicazione di cui tener conto durante un trapianto sono le infezioni, che possono essere di tipo batterico, virale e fungino.

I pazienti sottoposti a trapianto, infatti, presentano per un certo periodo di tempo uno stato di marcata immunodeficienza, secondario sia alla distruzione del sistema linfo-emopoietico da parte della terapia citostatica di preparazione al trapianto (condizionamento), sia all'impiego di farmaci immunosoppressori per la profilassi e per la terapia della GvHD [2, 20].

Le infezioni batteriche, favorite principalmente dalla neutropenia, sono generalmente di natura endogena: nei pazienti aplastici, la profilassi con terapia antibiotica per la decontaminazione intestinale determina una modificazione della flora endogena, che può favorire la diffusione dell'infezione in profondità nei tessuti. Le sepsi da batteri gram-negativi sono tra le complicanze più temibili, con infezioni spesso mortali da enterobatteri come *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*. Per quanto riguarda i batteri gram-positivi, lo *Stafilococcus aureus* è causa comune di setticemia, mentre lo *Streptococcus pneumoniae* può manifestarsi più avanti con sinusiti, otiti, meningiti, polmoniti o sepsi spesso fatali [2].

Le infezioni virali sono da temersi anche nel periodo successivo alla neutropenia, fino a che persiste lo stato di depressione del sistema immunitario. La gravità delle infezioni virali è proporzionale al grado di compromissione dell'immunità cellulare che dipende, a sua volta, sia dalla procedura utilizzata per il trapianto che dal successivo utilizzo di farmaci, ad esempio per controllare la GvHD.

Le infezioni virali nell'immediato periodo dopo TCSE sono comunemente dovute ad *Herpesvirus*, spesso latenti nel ricevente prima del trapianto. In assenza di un sistema immune competente, possono assumere decorso grave e spesso mortale alcune infezioni virali dovute a virus generalmente innocui come il *Cytomegalovirus* (HCMV) e il *virus di Epstein Barr* (EBV). Questi patogeni possono rimanere a lungo latenti nell'organismo, controllati dal sistema immune, tuttavia, in seguito a una diminuzione delle difese immuni come quella che si verifica dopo il trapianto, possono riattivarsi e provocare un'infezione grave, spesso mortale. Le infezioni da HCMV sono una delle principali cause di

mortalità e morbilità dopo il trapianto allogenico, soprattutto a causa del rischio di sviluppare un quadro di polmonite interstiziale correlata all'infezione virale [21]. I principali fattori di rischio identificati nello sviluppo di un'infezione primaria o di una riattivazione da HCMV dopo trapianto allogenico sono lo sviluppo di GvHD, la sieropositività per HCMV, l'impiego della deplezione di linfociti T come profilassi della GvHD e l'uso di corticosteroidi post-trapianto. La risposta dei linfociti T citotossici (CTLs) è di cruciale importanza per il controllo delle infezioni da HCMV, ed è stato stimato che dall'1% al 5% dei CTLs in individui CMV-sieropositivi sani siano specifici per HCMV [22, 23].

L'infezione da *Varicella-Zoster* (VZV) si verifica nel 40-50% dei trapiantati che sopravvivono per almeno 6 mesi dopo il trapianto. La forma più comune di infezione è rappresentata da un *Herpes-Zoster* localizzato, ma alcuni soggetti possono sviluppare un interessamento cutaneo diffuso o addirittura una forma viscerale di infezione. La mortalità dell'infezione non trattata si aggira intorno al 5-10%. L'incidenza è maggiore nei riceventi di allotrapianto che hanno sviluppato una GvHD cronica.

Per quanto riguarda i pazienti che ricevono CSE da donatore familiare aploidentico, è particolarmente temibile l'infezione da *Adenovirus* che può associarsi allo sviluppo di una polmonite interstiziale, quasi sempre fatale, o più raramente a epatite o nefrite.

Le infezioni fungine colpiscono circa il 30% dei soggetti sottoposti a trapianto [24] e sono causate soprattutto da *Aspergillus spp.* e da *Candida spp.* [2, 25], germi opportunisti a larga diffusione ambientale. Il prolungato periodo di leucopenia e il *deficit* severo a carico dell'immunità cellulo-mediata costituiscono i principali fattori di rischio per lo sviluppo di micosi invasive nei primi mesi post-trapianto. Il rischio di sviluppare micosi sistemiche è piuttosto alto, dal momento che è molto difficile formulare una diagnosi precoce di queste infezioni e, in ogni caso, il più delle volte non esistono trattamenti adeguati ed atti a controllarne le forme disseminate. L'elevato rischio di disseminazione della micosi nel corso del periodo di neutropenia post-trapianto rende necessarie, in queste condizioni,

una profilassi e una terapia anti-fungina personalizzate particolarmente invasive e prolungate nel tempo. Le strategie di profilassi nelle infezioni fungine sono tese a contenere il rischio di colonizzazione micotica del paziente ed a potenziare la risposta immune del soggetto nei confronti dell'infezione opportunistica con la somministrazione di fattori di crescita ematopoietici, principalmente G-CSF o GM-CSF in grado di ridurre il periodo di neutropenia e quindi il rischio di colonizzazione da parte di infezioni fungine.

L'infusione di linfociti maturi nel trapianto: due facce della stessa medaglia

Come ampiamente descritto, il trapianto di cellule staminali rappresenta, in molti casi, l'unica opzione per pazienti con malattie ematologiche od immuni, spesso di origine genetica. Questi pazienti, fino a qualche decennio fa, potevano essere sottoposti a trapianto solo se possedevano un familiare disponibile per l'espanto del midollo osseo. Il ricorso all'allogtrapianto e a fonti diverse dal midollo osseo (ad esempio cellule staminali periferiche, PBSC) ha permesso di ampliare le possibilità per molti pazienti, che possono così usufruire di questa terapia; ma l'utilizzo di questa fonte di CSE comporta complicanze importanti, quali un maggior rischio di sviluppare la GvHD (con il trapianto di PBSC si infonde un numero 10 volte maggiore di linfociti T rispetto a quanto avviene nel trapianto da midollo osseo) [9] e l'aumentato rischio di infezioni (dovuto al periodo di immunodeficienza indotto dal trattamento mieloablativo e dalla ritardata ricostruzione immune post-trapianto).

Non di minore importanza, è il cosiddetto effetto *Graft versus Tumor*, condizione mediata dai linfociti CD4⁺ e CD8⁺ del donatore ed importante per limitare la proliferazione di eventuali cloni tumorali non eradicati dopo i trattamenti chemio-radioterapici.

Diverse sono le strategie farmacologiche o le metodiche di manipolazione cellulare che sono state messe a punto, o sono allo studio tuttora, con lo scopo di cercare un adeguato bilanciamento tra la risposta residua del ricevente (che

può essere contenuta aumentando l'intensità del condizionamento) e l'aggiustamento della dose di linfociti infusi (attraverso la selezione o deplezione di alcune popolazioni cellulari).

Oltre ad ottimizzare la terapia farmacologica per aumentare la velocità di ripopolamento (somministrazione di G-CSF o GM-CSF) e per prevenire le infezioni e la GvHD (inibitori della calcineurina, rapamicina, ciclofosfamide, corticosteroidi, anticorpi monoclonali anti-CD25, anti-TNF), si stanno ricercando metodiche che permettano di infondere nel ricevente solo cellule selezionate che possano, da una parte, limitare l'attivazione dei linfociti del donatore eventualmente alloreattivi contro i tessuti del ricevente e, dall'altra, assicurare al paziente una protezione contro le infezioni mantenendo intatto il *pool* di linfociti patogeno- e tumore-specifici.

Manipolazioni per migliorare il trapianto

Per migliorare l'esito del trapianto, si può pensare di agire a diversi livelli, controllando gli effetti delle cellule che intervengono nelle varie fasi di questo processo.

Inattivazione delle cellule dendritiche autologhe:

diminuire la persistenza di cellule dendritiche dell'ospite per prevenire la GvHD acuta.

Come accennato in precedenza, la presenza di cellule dendritiche dell'ospite contribuisce fortemente allo sviluppo della GvHD acuta in particolare in presenza di diversità a carico dell'HLA di classe II [26, 27]. L'inattivazione delle cellule dendritiche dell'ospite è stata quindi proposta come approccio di prevenzione della GvHD [28].

Maturazione timica dei linfociti

migliorare la maturazione timica dei nuovi linfociti, per prevenire lo sviluppo di GvHD cronica.

Nel ricevente, la ricostituzione di cellule T richiede innanzitutto l'espansione di cloni di linfociti T maturi del donatore infusi nel paziente tramite il trapianto, ed in secondo luogo la generazione *de novo* e la maturazione timica di linfociti T del donatore (neotimopoiesi).

Qualora il trapianto avvenga senza deplezione di linfociti T maturi, il maggior rischio cui va incontro il paziente è sicuramente l'insorgenza della cGvHD. La miglior prevenzione della GvHD cronica si ha permettendo una normale maturazione timica del nuovo sistema T linfocitario.

I trattamenti chemio-radioterapici inducono un'alterata proliferazione e differenziazione dei timociti, che termina in una modificata morfologia timica (displasia) e, quindi, in un'alterata funzionalità. Dopo il trapianto, il contributo del timo dipende innanzitutto dall'età del ricevente, dall'attecchimento delle CSE infuse, dall'insorgenza della GvHD e dall'estensione dei danni al timo causati dalla terapia mieloablattiva. Nei 6-12 mesi successivi al trapianto, il danno timico induce innanzitutto una significativa diminuzione nella produzione di cellule T *naive* (o recenti emigranti timici, identificati dalla presenza del DNA episomale o *T cell Receptor Excision Circles*, TREC) ed in secondo luogo provoca persistenti perdite nella diversificazione di cellule T che non sempre sono correlate all'entità clinica della GvHD acuta. Inoltre, la compromissione della timopoiesi può condurre alla selezione di cloni linfocitari anomali, che possono causare infiammazione e apoptosi nel timo, o autoimmunità e infiammazione in periferia. Al fine quindi di permettere una normale ricostituzione dell'immunità è necessario permettere al timo di recuperare la funzionalità normale.

Alcune strategie con cui si sta cercando di raggiungere questo obiettivo sono rappresentate dalla somministrazione di fattori timo-trofici come il fattore 7 di crescita dei fibroblasti (FGF-7), un potente mitogeno delle cellule epiteliali capace di proteggere dai danni provocati da radioterapia e chemioterapia o citochine quali IL-7 e IL-15 che accelerano il processo di ricostruzione immunitaria [29].

Deplezione dei linfociti maturi del donatore:

eliminare i linfociti maturi del donatore, potenzialmente responsabili di GvHD. Opzione che produce una grave immunosoppressione, a meno che non venga associata alla preparazione e infusione di linfociti patogeno-specifici.

Una delle tecniche utilizzate per l'eliminazione indiretta dei linfociti è la selezione positiva delle cellule emopoietiche sulla base dell'espressione dell'antigene CD34 (separazione immunomagnetica) [9]. Con questo tipo di selezione si possono ridurre fino a centomila volte i linfociti T e si può quindi infondere un alto numero di cellule CD34⁺, senza bisogno di una profilassi addizionale e senza l'insorgenza significativa di GvHD sia acuta che cronica. Tuttavia in questo caso, il mancato attecchimento, la riattivazione virale e il rischio di infezioni sono le complicanze principali dovute alla massiccia T-deplezione [30].

Allo stesso modo per ridurre il rischio di GvHD e di riattivazione virale (EBV) sono stati utilizzati trapianti di cellule deplete rispettivamente di CD3⁺ e CD19⁺ [30]. Se da una parte la deplezione di cellule T riduce l'incidenza di gravi GvHD dopo trapianto, essa comporta anche la rimozione dei linfociti T patogeno-specifici e porta ad un ritardo nella ricostituzione dell'immunità sia in termini qualitativi che quantitativi [31]. Inoltre, mentre in un TCSE non T-depleto le cellule T mature si individuano nel sangue dei pazienti nell'arco di 10-15 giorni, in caso di trapianto T-depleto le cellule TREC⁺ appaiono nel sangue solo dopo 3-4 mesi ed è richiesto un intervallo di 6-12 mesi per ottenere il numero di cellule T CD4⁺ utili a fornire un'immunità. Questa immunodeficienza di lunga durata è il più grande ostacolo clinico poiché è causa di infezioni virali opportunistiche che provocano circa il 30% della mortalità in pazienti che ricevono un allotrapianto da un donatore HLA non identico.

Infusione di linfociti del donatore attivi contro i patogeni:

infondere nel paziente linfociti del donatore maturi e attivi contro i patogeni, per contenere le infezioni virali.

La possibilità di curare infezioni virali gravi come quelle sostenute dall'EBV con l'infusione di linfociti di un donatore sano (*Donor Lymphocyte Infusion*, DLI) è nota da tempo. L'utilizzo di questa metodica è tuttavia limitato a casi selezionati, perché la quantità di linfociti alloreattivi infusi è di norma ben superiore alla frequenza di linfociti virus-specifici e linfociti tumore-specifici.

Più recentemente sono state sviluppate diverse metodiche per selezionare solo le cellule reattive contro specifici virus (EBV, HCMV, *Adenovirus*). In particolare, è possibile ottenere linee di linfociti espansi per diverse settimane con lo stimolo di specifici antigeni e quindi fortemente arricchite nella popolazione d'interesse. Un'alternativa recentemente proposta è quella di identificare nel sangue i rari precursori reattivi contro determinati antigeni virali e infonderle nel paziente prima che l'infezione diventi clinicamente evidente (in regime *pre-emptive*) in modo tale da permetterne l'espansione direttamente all'interno del ricevente [32].

Infusione di cellule regolatorie:

infondere linfociti regolatori che possano contribuire a mantenere la tolleranza verso gli antigeni dell'ospite, in caso di trapianti non compatibili.

I linfociti T regolatori (Tregs) sono una sottopopolazione di cellule T CD4⁺ che si sviluppano nel timo; una volta formate svolgono un ruolo fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi immunitaria. Inoltre è grazie ad una sovra-espressione del fattore di trascrizione Foxp3 che le cellule Tregs iniziano il loro effetto soppressivo, che include la secrezione di citochine, come IL-10 e TGF- β , in grado di indurre un arresto del ciclo cellulare o l'apoptosi nelle cellule T effettrici, nonché di bloccare la maturazione e la co-stimolazione delle cellule dendritiche.

Il potenziale immunosoppressivo di queste cellule può essere utilizzato in terapia per il trattamento di malattie autoimmuni e facilitare la tolleranza nel trapianto. L'infusione di cellule regolatorie può contribuire ad un miglior risultato nel trapianto non compatibile.

Deplezione specifica delle cellule alloreattive:

eliminare in modo specifico le cellule reattive contro gli alloantigeni, preservando i linfociti reattivi contro i patogeni o contro antigeni tumorali.

L'idea di base è quella di somministrare al ricevente cellule T mature prive di cellule reattive verso gli alloantigeni del ricevente, pur conservando i linfociti patogeno-specifici.

La cosiddetta allodeplezione specifica consiste nella deplezione selettiva *ex vivo* o *in vitro* dei linfociti T diretti verso gli antigeni dell'ospite, conservando invece la maggior parte delle cellule T del donatore, immunocompetenti contro agenti infettivi o tumore-associati. Ottimizzare questa strategia però incontra difficoltà tecniche per permetterne applicazioni cliniche su larga scala e gli strumenti immunologici disponibili non sono abbastanza sensibili per rimuovere tutte le cellule T alloreattive presenti nel sangue [29].

Per questo, diversi gruppi hanno studiato metodi di deplezione selettiva delle cellule T reattive verso gli alloantigeni del ricevente dimostrando che queste possono essere eliminate riducendo effettivamente l'alloreattività. Il metodo si basa sul concetto che cellule *responder* vive (da un *pool* di cellule di donatore) possono venir attivate dagli alloantigeni presenti su cellule stimolatrici del ricevente (trattate perché non reagiscano a loro volta) in una Reazione Linfocitaria Mista (MLR) unidirezionale. Le cellule *responder* così attivate possono essere identificate e conseguentemente rimosse sfruttando l'espressione sulla loro superficie di marcatori di attivazione, come il CD69 e/o il CD25 [31, 33]. In alternativa, le cellule attivate possono essere distrutte per apoptosi FAS-FAS

ligando-mediata o per “*purging*” fotodinamico o per mezzo di tossine coniugate a specifici anticorpi monoclonali.

Tuttavia, l’antigene CD25 non è solo un marcatore di attivazione, ma anche un recettore altamente espresso sulle cellule T regolatorie CD4⁺ e CD25⁺, fondamentali nel mantenimento della tolleranza immune [31].

Il gruppo di Davies ha sperimentato una tecnica di deplezione basata sull’espressione del CD69, che teoricamente permette di mantenere le cellule T regolatorie. In un MLR unidirezionale, infatti, la massima espressione di CD69 si ha dopo 72-96 ore, prima cioè che le cellule attivate iper-esprimano il CD25 [31, 34] rendendo così il CD69 un antigene adatto a depletare selettivamente linfociti alloattivati, mantenendo una buona vitalità cellulare. *In vitro*, dopo la deplezione delle cellule alloreattive, le cellule non deplete mostrano una significativa riduzione della risposta proliferativa se incubate nuovamente con le cellule stimolatrici (in un MLR secondaria), mentre è conservata la risposta verso cellule stimolatrici di terza parte [31, 35]. Una volta deplete *in vitro* le cellule possono essere infuse nel ricevente. I risultati di Davies, mostrano che questa procedura, a distanza di 10 settimane dalla trasfusione, porta ad un aumento significativo della sopravvivenza (71,4%) con assenza di tracce cliniche od istologiche di GvHD nonostante vi sia la presenza di linfociti circolanti del donatore, dimostrata tramite la citometria a flusso [31, 36].

Altre strategie prevedono la deplezione selettiva focalizzata su specifiche sottopopolazioni di cellule T (CD4⁺, CD6⁺ e CD8⁺), ma queste hanno portato ad un limitato successo. Una via alternativa suggerisce anche di indurre l’anergia nelle cellule del donatore verso gli alloantigeni del ricevente (*trial* con CTLA-4); altri studi hanno combinato la deplezione di cellule T, con successive infusioni di linfociti del donatore (DLI) programmate post-trapianto, per migliorare l’esito del trapianto stesso, ridurre il rischio di ricaduta [17] e per prevenire i rischi di infezione dovuti al periodo di immunodeficienza post-trapianto.

Tutte queste metodiche di deplezione proposte in realtà non assicurano il mantenimento dei linfociti anti-microbici, dal momento che la riduzione della

reattività residua viene valutata solamente sulla base della reazione verso linfociti di terze parti e non viene controllata la reattività residua verso gli antigeni virali.

Per fare questo il gruppo di Amrolia ha messo a punto un sistema basato sull'utilizzo di una immunotossina che lega specificatamente le cellule di donatore attivate (che quindi iper-esprimono il CD25) per la presenza in co-coltura (MLR) delle cellule irradiate del ricevente. In questo modo viene mantenuta la risposta antivirale verso i più comuni agenti patogeni come HCMV, *Candida* ed EBV ma viene sensibilmente ridotta la frequenza di precursori linfocitari che rispondono agli alloantigeni [37].

Il gruppo di Xupeng, invece, ha studiato un metodo di deplezione basato sull'espressione dell'antigene CD134 indotto sui linfociti *responder* CD4⁺ e CD8⁺ dopo stimolazione in MLR con cellule dendritiche allogeniche. *In vivo*, questo antigene sembra essere fortemente correlato con l'insorgenza della GvHD sia acuta che cronica e, inoltre, cellule CD134⁺ e CD8⁺ sono state identificate in pazienti con cGvHD. *In vitro*, la possibilità di selezionare le cellule alloattivate sulla base del CD134 permette di depletare anche quella popolazione di cellule negative al CD69, al CD25 e all'HLA DR che sono importanti mediatori della cGvHD [38].

Farmaci e piccole molecole per l'allodeplezione

Un'alternativa alle procedure di deplezione finora menzionate è rappresentata dall'utilizzo di farmaci o piccole molecole che intervengono nel metabolismo cellulare di attivazione e proliferazione linfocitario.

Questa strategia è già ben nota nella pratica clinica, soprattutto oncologica, in cui si sfrutta l'alto tasso proliferativo delle cellule tumorali come target farmacologico. L'idea è quella di utilizzare molecole che interferiscono con le *pathway* di attivazione linfocitaria, inducendo così l'arresto della proliferazione o l'apoptosi.

Per fare ciò, come descritto per la deplezione basata su marcatori cellulari, è possibile, *in vitro*, indurre l'attivazione dei linfociti con cellule allogene (MLR unidirezionale) e quindi provocare l'arresto della proliferazione o l'apoptosi delle cellule alloreattive somministrando determinate molecole.

Recentemente, diversi gruppi di studio hanno proposto farmaci già noti in clinica o nuove molecole che risultano essere interessanti per gli scopi di allodeplezione:

- Metotrexate: è un farmaco ben noto nella clinica oncologica e delle malattie croniche come il morbo di Crohn e l'artrite reumatoide, in cui si sfrutta la sua tossicità sulle cellule ad alto tasso proliferativo. Il Metotrexate, infatti, interferisce con la sintesi delle basi puriniche (Figura 3) inibendo gli enzimi chiave del metabolismo dei folati, la diidrofolato reduttasi e la timidilato sintasi, bloccando perciò le cellule nella fase S [39, 40].

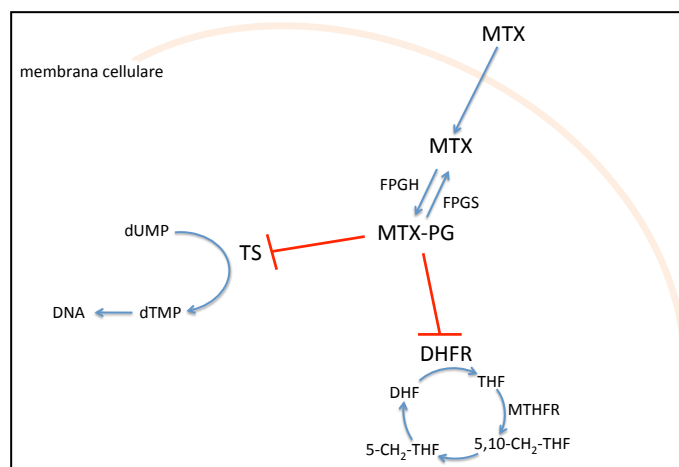


Figura 3. Meccanismo d'azione del Metotrexate (MTX) sugli enzimi diidrofolato reduttasi (DHFR) e timidilato sintasi (TS).

- Phenoxodiololo: un differente approccio sfrutta la capacità di questo farmaco di interferire con il trasporto di membrana (Figura 4). Questa molecola induce l'apoptosi, sia per la via estrinseca che intrinseca e, bloccando il trasporto di elettroni sulla membrana cellulare interferisce

con i meccanismi di ossidoriduzione e compromette la sopravvivenza e proliferazione cellulare [41].

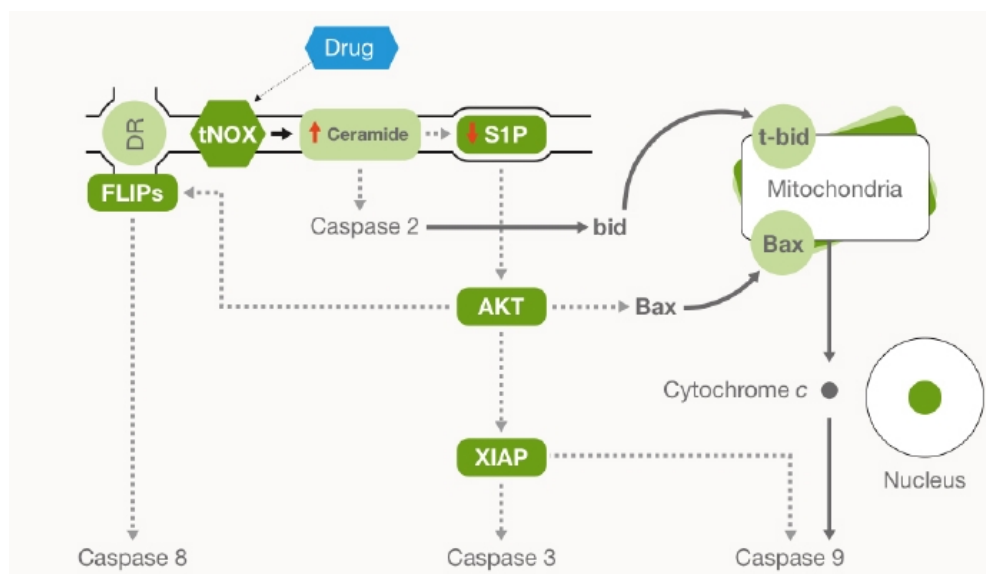


Figura 4. Meccanismo di azione del Phenoxodolo, che agisce sui meccanismi di trasporto degli elettroni di membrana, inducendo l'apoptosi caspasi-mediata.

Tratto da <http://seekingalpha.com/article/296607-marshall-edwards-taking-big-pharma-clinical-path> (2011).

- Tasocitinib: questo piccolo inibitore blocca la *pathway* di JAK3 [42], un recettore di segnale per le citochine coinvolto nello sviluppo e nell'omeostasi dei linfociti. Agisce principalmente inibendo il *signaling* dell'IL-2, la principale citochina pro-proliferativa dei linfociti T, ma il blocco della via di JAK3 coinvolge anche il *signaling* di altre citochine importanti per la proliferazione linfocitaria come l'IL-4 e IL-9 [43] (Figura 5).

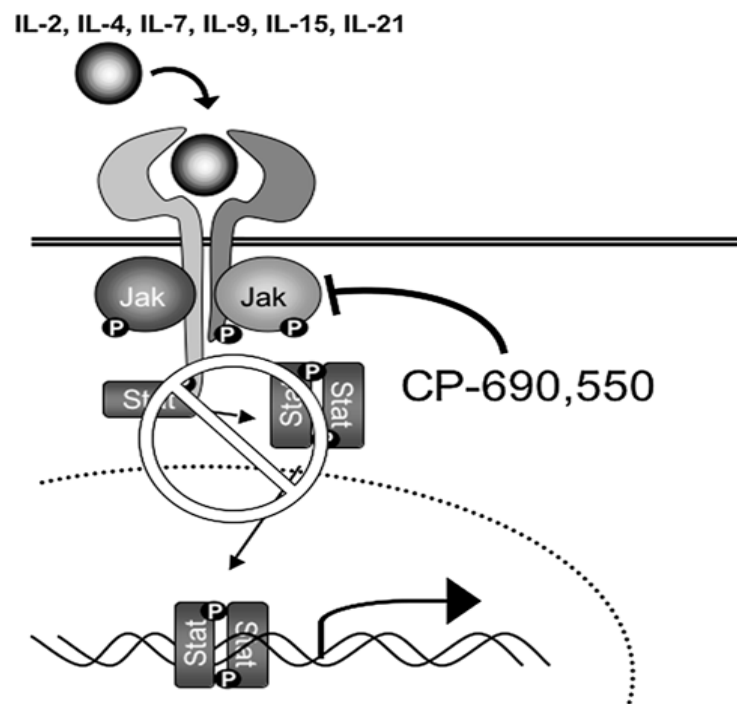


Figura 5. Le citochine si legano sul recettore linfocitario e attivano il signaling, via JAK-STAT, che termina con la trascrizione di geni per la proliferazione cellulare. Il Tasocitinib impedisce la fosforilazione di JAK e quindi la successiva trasduzione del segnale.

Immagine tratta da O'Shea JJ, *Curr Opin Rheumatol*, 2005.

- Bortezomib: è un potente inibitore reversibile del proteosoma, compromette la via di signaling di NF- κ B provocando la morte nelle cellule attivate [44, 45] (Figura 6). Questa piccola molecola è formata da una subunità con un'alta affinità e specificità per l'unità catalitica del proteosoma. L'inibizione della degradazione di I κ B da parte del proteosoma mantiene NF- κ B nel citoplasma preservando il suo effetto sulla trascrizione di geni per la proliferazione e la sopravvivenza [46].

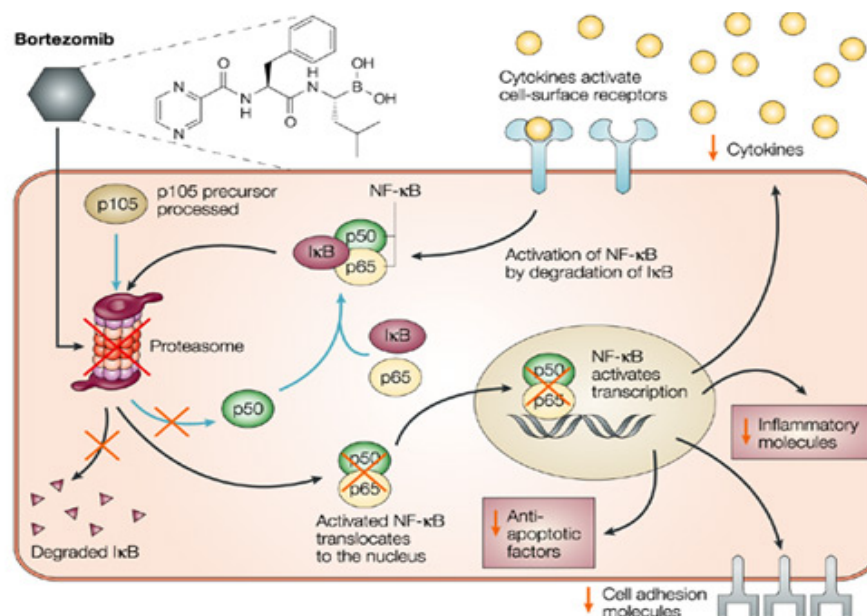


Figura 6. Meccanismo di azione del Bortezomib sul proteosoma.

Tratto da Paramore A and Frantz S, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003.

- acido 3-idrossiantranilico (3-HAA): questa piccola molecola è un metabolita del triptofano ed è coinvolto nel meccanismo antiproliferativo dell'enzima indoleammina 2,3-diossigenasi (IDO) [47]. Come altri metaboliti del triptofano è coinvolto nell'attività immunosoppressiva delle cellule dendritiche [48-50] e mesenchimali [51, 52] (Figura 7). Agisce consumando il GSH intracellulare ed espone la cellula a *burst* ossidativo e apoptosi in seguito all'attivazione del meccanismo proliferativo. Questo effetto può essere aumentato in presenza di ioni di manganese che aumentano ulteriormente i processi ossidativi [53, 54].

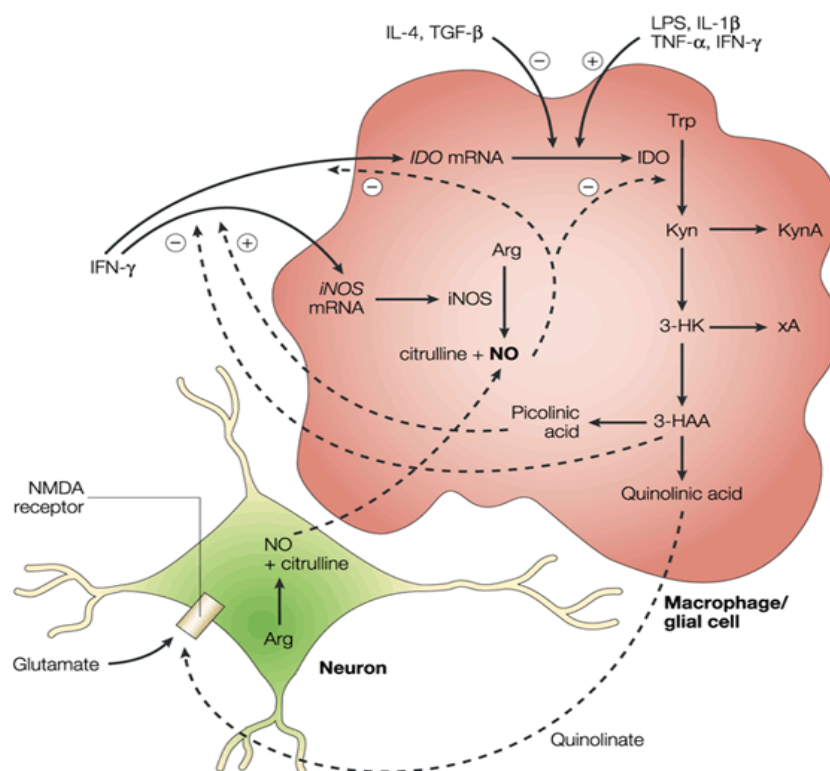


Figura 7. Metabolismo del triptofano e azione del 3-HAA.

Tratto da Stone TW and Darlington LG, *Nat Rev Drug Discov*, 2002.

Obiettivi

Obiettivo generale

Sviluppare nuovi strumenti per permettere l'allodeplezione specifica allo scopo di migliorare il successo del trapianto non identico di CSE.

Obiettivi specifici

Con questo lavoro si è voluto mettere a punto un sistema *in vitro* per:

- attivare selettivamente linfociti capaci di reagire contro gli alloantigeni presentati da cellule allogeniche;
- depletare le cellule così attivate, inducendone l'apoptosi o inibendone la proliferazione mediante la somministrazione di farmaci o piccole molecole.

Materiali e metodi

Disegno sperimentale

Sono stati valutati i farmaci potenzialmente utilizzabili allo scopo di allodeplezione, valutandone la tossicità selettiva sulle cellule attivate. Per questo le cellule sono state attivate con uno stimolo generico come la fitoemoagglutinina e sono state trattate con dosi scalari dei diversi farmaci.

Dopo questa fase preliminare si è proceduto utilizzando cellule allogeneiche per la stimolazione. In un primo momento, sono stati utilizzati linfociti B trasformati con virus *Epstein Barr* ottenendo una linea cellulare che permettesse di avere sempre a disposizione un sufficiente numero di cellule stimolatrici ma che allo stesso tempo limitasse la variabilità dovuta all'utilizzo di diversi donatori. I linfociti B sono infatti ottime cellule per l'allostimolazione in quanto esprimono sia l'HLA di classe I che di classe II e molecole co-stimolatorie.

In un secondo momento è stato messo a punto un sistema di MLR che permettesse di utilizzare le cellule dendritiche come fonte di alloantigeni, pensando ad un futuro utilizzo in clinica di queste procedure.

Una volta messo a punto la metodica, sono stati testati i farmaci selezionati in precedenza e sono stati effettuati i test di restimolazione per valutare la reattività residua dopo la deplezione.

Colture cellulari

Coltura di linee linfoblastoidi trasformate con EBV (LCL-EBV)

Da sangue periferico eparinizzato di donatore sono stati ottenuti i linfomonociti (PBMC) mediante separazione su gradiente di Ficoll (1.077 g/mL). 2×10^6 PBMC sono state quindi incubate con 1 mL di surnatante contenente EBV, ottenuto dalla coltura di cellule B95-8 (ATCC CRL 1612) e filtrato con filtro 0.45 μm . Dopo 6 ore di incubazione a 37°C (5% CO₂), le cellule sono state lavate e risospese in 1 mL RPMI 1640 con FBS 10%, penicillina/streptomicina 100U/mL e L-glutammina 200 mM (tutti i reagenti Euroclone). Alla coltura è stata aggiunta fitoemoagglutinina 5 $\mu\text{g/mL}$ (PHA, Biochrom AG). Le cellule sono state piastrate in piastra da 24 pozzetti (1×10^6 cell/pozzetto) e sono state lasciate in coltura a 37°C (5% CO₂) per 2-4 settimane, rinnovando il terreno solo se necessario, fino a che i linfociti B trasformati hanno cominciato a proliferare. Da questo momento in poi, sono stati mantenuti in coltura in terreno completo ad una concentrazione di 1×10^6 cell/mL.

Maturazione *in vitro* di cellule dendritiche (DC)

I PBMC sono stati ottenuti da *buffy coat* di donatore, mediante gradiente di centrifugazione su Ficoll. Dopo la conta, 10^8 cellule sono state incubate con biglie magnetiche anti-CD14 (Miltenyi Biotec), in grado di legare i monociti. Il passaggio attraverso una colonna magnetica ha quindi permesso di separare i monociti dalle altre cellule (Figura 8).

10^7 monociti sono stati piastrati in flask T75 in 10 mL di terreno CellGro® DC (CellGenix) addizionato di penicillina/streptomicina 100U/mL e L-glutammina

200 mM. Per la maturazione delle cellule dendritiche, al terreno sono state aggiunte le seguenti citochine:

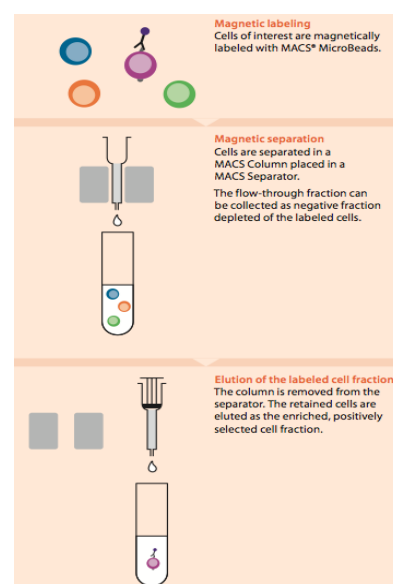
- giorno 0: 800 U/mL GM-CSF (Sargramostim, Genzyme), 1000 U/mL IL-4 (Euroclone);
- giorno 3: 800 U/mL GM-CSF, 1000 U/mL IL-4;
- giorno 5: 800 U/mL GM-CSF, 1000 U/mL IL-4, 10 ng/mL TNF- α (Sigma Aldrich), 1 μ g/mL prostaglandina E₂ (PGE₂, Sigma Aldrich).

Al giorno 7 di coltura le dendritiche sono state staccate dalla *flask* con una soluzione di distacco non enzimatica (Cell Dissociation Solution, Sigma Aldrich), lavate, contate e trattate con mitomicina C (Sigma Aldrich) per prevenire la proliferazione di linfociti residui. In breve, adattando il protocollo (tratto da *Methods in Molecular Medicine, Allergy Methods and Protocols*, Humana Press), le cellule sono state risospese in 1 mL di terreno X-VIVO 15 (Lonza) aggiungendo mitomicina C alla concentrazione finale di 50 μ g/mL. Le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37°C (5% CO₂) e quindi lavate 2 volte con terreno. Le cellule sono state quindi congelate a -80°C in albumina + 10% dimetilsulfossido (DMSO, Sigma Aldrich) + 10% soluzione anticoagulante (acido citrico-citrato-destrosio, formulazione A, ACD-A, Baxter) alla concentrazione di 1x10⁶ cellule/mL fino al momento dell'utilizzo in MLR.

Figura 8.

Selezione positiva delle cellule CD14⁺.

Il protocollo Miltenyi prevede la marcatura delle cellule con anticorpi anti-CD14 coniugati a biglie magnetiche. Passando la sospensione cellulare marcata attraverso un magnete le cellule selezionate vengono trattenute e separate dalle altre cellule. Una volta tolta la colonna di separazione dal magnete, le cellule CD14⁺ possono essere raccolte.

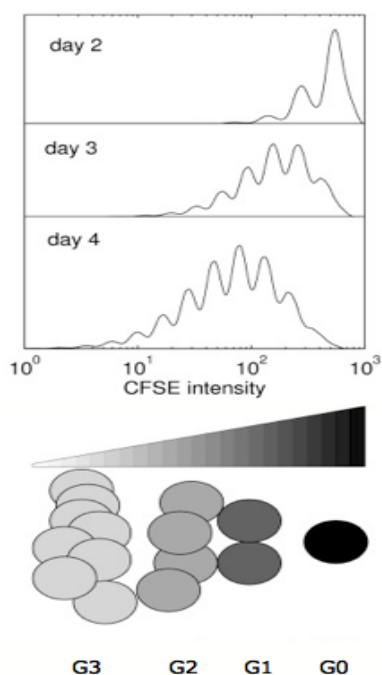


Test di Reazione Linfocitaria Mista (MLR)

I linfociti *responder* sono stati separati da sangue periferico eparinizzato di donatore, mediante centrifuga su gradiente di Ficoll.

Le cellule ottenute sono state quindi contaminate e risospese alla concentrazione di 2×10^6 cellule/mL in terreno X-VIVO 15 + di 10% siero umano AB (HS-AB, Sigma Aldrich) + penicillina/streptomina 100 U/mL e L-glutamina 200 mM. Per ogni esperimento 200.000 cellule *responder* sono state seminate in piastra da 96 pozzetti con i seguenti stimoli a seconda dell'esperimento:

- controllo negativo: le cellule *responder* sono state incubate in assenza di stimolo proliferativo (generico o allogenico)
- controllo positivo di attivazione/proliferazione: le cellule sono state stimulate con PHA 1 $\mu\text{g/mL}$ oppure con uno stimolo più fisiologico del T Cell Receptor (TCR) utilizzando biglie su cui sono adsorbiti gli anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 (Dynabeads® Dynal®, Invitrogen);
- MLR con LCL-EBV: i linfociti B precedentemente trasformati con virus *Epstein Barr* (EBV) sono stati prelevati dalla coltura, lavati con soluzione fisiologica e contati. Risospesi in terreno X-VIVO 15 completo, sono stati irradiati per prevenirne la proliferazione. Sono stati quindi trasferiti in piastra da 96 pozzetti in rapporto 1:2 rispetto ai linfociti *responder*;
- MLR con DC: negli esperimenti di MLR con cellule dendritiche, queste sono state scongelate, lavate e contaminate. Sono state seminate in piastra da 96 pozzetti in rapporto 1:10 rispetto ai linfociti *responder*, lasciando circa un'ora la piastra in incubatore (37°C, 5% CO₂) per permettere l'adesione delle cellule prima dell'aggiunta dei linfociti *responder*.



Dove necessario, le cellule *responder* sono state marcate con carboxy-DFFDA, SE (carboxylic acid diacetate, succinimidyl ester, CFSE, Invitrogen) prima di essere stimulate. Con questo colorante è possibile tracciare la proliferazione delle cellule, dal momento che la molecola fluorescente viene distribuita equamente nelle cellule figlie ad ogni divisione e l'intensità media di fluorescenza risulta quindi dimezzata in ogni generazione successiva (Figura 9).

Figura 9. Diluizione del colorante carboxy-DFFDA, SE (CFSE) nelle cellule proliferate (G1, G2, G3).

Deplezione delle cellule attivate con farmaci

Selezione dei farmaci

In un primo tempo sono stati saggiati diversi composti dotati di attività tossica selettiva su cellule attivate e quindi utilizzabili in procedure di allodeplezione.

Per questo sono stati eseguiti test di attivazione linfocitaria *in vitro*, in cui 200.000 PBMC, sono stati sospesi in 200 μ L di terreno X-VIVO 15 + 10% HS-AB + penicillina/streptomina e L-glutammina. Alla coltura è stata aggiunta PHA 1 μ g/mL, per attivare in maniera massiva la maggior parte dei linfociti. Le cellule sono state trattate con diversi farmaci selezionati sulla base della letteratura:

- Metotrexate (WyethLederle) 0.25 – 4 mM
- Phenoxiodiolo (A160 dehydroequol, Synchem OHG) 0.0625 – 1 mM
- Tasocitinib (CP- 690550, Selleck Chemical LLC) 4 – 64 μ M

- Bortezomib (Selleck Chemicals LLC) 0.125 – 2 μM
- Acido 3-idrossiantranilico (3-HAA, Sigma Aldrich) 0.3 – 0.7 mM
- Manganese Cloruro (MnCl_2 , Sigma Aldrich) 1 – 30 μM

La soluzione di Metotrexate è stata preparata diluendo in terreno di coltura la formulazione per iniezione (25 mg/mL in soluzione fisiologica contenente NaOH). Phenoxodiolo, Tasocitinib e Bortezomib sono stati sciolti in dimetilsolfossido in modo che la concentrazione finale di DMSO in pozzetto non superi l'1%. Il 3-HAA è stato dissolto in acqua. Il pH del terreno dopo l'aggiunta dei farmaci alla massima concentrazione è stato misurato e non sono state riscontrate variazioni.

Dopo 60 ore di incubazione (37°C, 5% CO_2) le cellule sono state recuperate dai pozzetti, lavate con soluzione fisiologica e quindi marcate con il colorante 7-aminoactinomicina D (7AAD, eBioscience) seguendo le indicazioni del produttore. Le cellule sono state quindi analizzate in citometria a flusso ed è stata valutata la percentuale di cellule positive alla colorazione con 7AAD, che corrispondono alle cellule morte.

Deplezione dopo stimolo allogeneico

In un secondo momento, i farmaci selezionati sono stati testati sulle cellule attivate in risposta a linee linfoblastoidi EBV allogeneiche (LCL-EBV).

A tale scopo, linfociti stimolatori e linfociti *responder* sono stati messi in co-coltura in rapporto 1:2, in 200 μL di terreno X-VIVO 15 completo in piastra da 96 pozzetti. Per depletare le cellule attivate alla coltura sono stati aggiunti, da soli o in associazione:

- 3-HAA 0.5 mM
- manganese cloruro (MnCl_2 , Sigma Aldrich) 1 – 30 μM
- Bortezomib 0.5 μM

Per il test di vitalità con 7AAD si è preceduto come in precedenza, e dopo 60 ore di co-coltura le cellule sono state recuperate dai pozzetti, lavate, colorate con 7AAD e valutate in citometria a flusso.

Per il test di proliferazione l'effetto dei composti è stato valutato marcando le cellule metabolicamente attive con timidina triziata (3H-Thy, Perkin Elmer). Alle cellule piastrate in co-coltura, come sopra descritto, è stata aggiunta 3H-Thy (2.5 μ Ci/mL/well) per le ultime 22 ore di coltura. Le cellule sono quindi state trasferite su una piastra filtrante (Millipore) e lavate. Alle cellule sono stati aggiunti 25 μ L di soluzione di scintillazione (Optiphase SuperMix Filter Count, PerkinElmer Life Science) e la radioattività incorporata è stata misurata come cpm dallo scintillatore (Wallac 1450 Microbeta, Liquid Scintillation Counter).

Valutazione delle reattività residua dopo deplezione

In questa fase i linfociti *responder* sono stati attivati da cellule dendritiche maturate *in vitro* (DC), depletati con i farmaci selezionati e quindi posti nuovamente in coltura per valutarne l'attivazione residua e l'attivazione in risposta a nuovi stimoli.

I linfociti sono stati messi in co-coltura con DC in rapporto 10:1 in piastra da 6 pozzetti in terreno X-VIVO 15 completo per 60 ore, in presenza o meno dei farmaci (3-HAA 0.5 mM + MnCl₂ 1 μ M). Trascorso il tempo di incubazione le cellule sono state recuperate dai pozzetti, lavate, contate e colorate con il tracciante CFSE. Sono state quindi poste nuovamente in coltura, in piastra 96 pozzetti:

- senza nuovo stimolo

oppure con i seguenti stimoli:

- biglie anti-CD3/anti-CD28
- DC dallo stesso donatore dell'MLR primaria
- DC di donatore diverso rispetto alla prima MLR (donatore di terza parte)

Dopo 60 ore di incubazione le cellule sono state recuperate dai pozzetti, lavate, colorate con 7AAD, come già descritto. Mediante citometria a flusso sono state quindi valutate contemporaneamente proliferazione e vitalità residue dopo deplezione e restimolazione.

Risultati e discussione

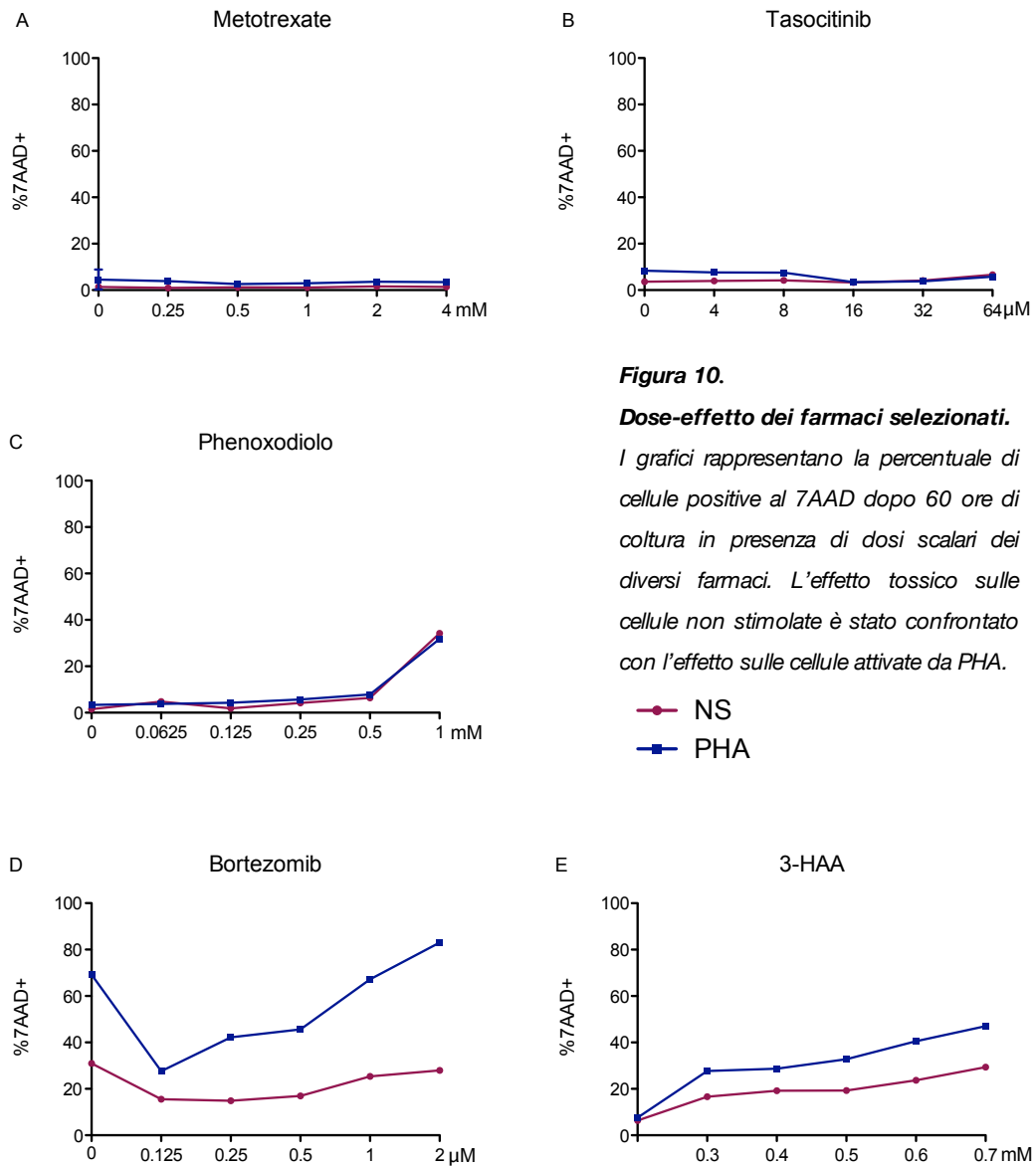
Selezione dei farmaci

Sulla base dei dati in letteratura sono stati scelti 5 farmaci potenzialmente utilizzabili per scopi di allodeplezione. Metotrexate, Phenoxodiololo, Tasocitinib, Bortezomib, acido 3-idrossiantranilico, sono stati aggiunti alle cellule non stimulate o stimulate con PHA per 60 ore.

Al termine dell'incubazione, l'azione tossica del farmaco è stata misurata come cellule positive al colorante 7AAD (cellule morte). Particolare attenzione è stata posta all'effetto differenziale dei farmaci sulle cellule non stimulate rispetto a quelle attivate con PHA. Metotrexate (Figura 10A) e Tasocitinib (Figura 10B) non hanno dato risultati valutabili in termini di vitalità, dal momento che, nelle condizioni usate, non sembrano avere effetti pro-apoptotici sulle cellule attivate. Per quanto riguarda il Metotrexate, il problema può essere dato dal fatto che il sistema sperimentale non sia adatto a valutarne gli effetti. Per quanto riguarda il Tasocitinib, invece, pur non avendo effetti di tossicità sulle cellule stimulate, si osserva una riduzione dell'attivazione delle cellule, che sembra essere dose-dipendente (dati non riportati). Al momento non si può dire se l'arresto dell'attivazione e proliferazione, dovuto al blocco della *pathway* di JAK3, indotto

dal Tasocitinib sia irreversibile. In successivi test di restimolazione sarà opportuno valutare questo aspetto per proporre il farmaco, eventualmente in associazione con altre molecole.

Il Phenoxodiolo (Figura 10C) ha dato risultati insufficienti per gli scopi del lavoro proposto, dal momento che un effetto tossico si ottiene solo con una dose elevata (1 mM) del farmaco, sia sulle cellule attivate con PHA che sulle cellule non stimolate. A causa della scarsa solubilità del farmaco è difficile pensare di utilizzare il farmaco in questo sistema sperimentale in dosi diverse o con diverse somministrazioni. Aggiungendo Bortezomib (Figura 10D) e 3-HAA (Figura 10E) invece si osserva un aumento della mortalità in modo dose-dipendente in entrambi i casi. Inoltre per tutti e due i farmaci si osserva un effetto amplificato nelle cellule attivate con PHA, mentre le cellule non stimolate risentono meno dell'effetto tossico dei farmaci. Per gli esperimenti successivi quindi si è scelto di utilizzare queste due molecole, alla concentrazione in cui si osserva la maggiore differenza tra cellule stimulate e non (3-HAA 0.5 mM; Bortezomib 0.5 μ M). Sebbene la differenza tra le due condizioni aumenti con l'aumentare delle concentrazioni, in entrambi i casi, superando questa dose si osserva un'aumentata mortalità anche nelle cellule non stimolate in modo dose-dipendente.

**Figura 10.****Dose-effetto dei farmaci selezionati.**

I grafici rappresentano la percentuale di cellule positive al 7AAD dopo 60 ore di coltura in presenza di dosi scalari dei diversi farmaci. L'effetto tossico sulle cellule non stimolate è stato confrontato con l'effetto sulle cellule attivate da PHA.

—●— NS
—■— PHA

MLR con LCL-EBV

In un secondo momento, i farmaci di interesse, 3-HAA e Bortezomib, sono stati testati in saggi MLR utilizzando LCL-EBV come stimolo allogenico. In questo modo si è limitata la variabilità dovuta all'utilizzo di diversi donatori ed è stato possibile testare i farmaci, da soli o in combinazione.

Acido 3-idrossiantranilico e ioni di manganese

Il 3-HAA è stato utilizzato anche in combinazione con ioni di manganese, per potenziarne l'effetto. Per questo, inizialmente, il MnCl_2 è stato titolato per valutarne la tossicità. Le cellule non stimolate, stimolate con PHA o con LCL-EBV, sono state trattate con 3-HAA 0.5 mM a cui è stato aggiunto MnCl_2 in concentrazione scalare (1 – 30 μM). Dopo 60 ore di coltura, oltre alla vitalità con 7AAD è stata valutata, con timidina triziata, la proliferazione delle cellule *responder*. I risultati di vitalità e proliferazione sono complementari. L'effetto differenziale tra le cellule non stimolate (NS+3-HAA) e le cellule attivate, sia dallo stimolo generico (PHA+3-HAA) che dalle LCL-EBV allogene (LCL-EBV+3-HAA) si osserva per le concentrazioni di MnCl_2 di 1 e 3 μM (Figura 11). Il solo MnCl_2 non ha effetti tossici sulle cellule non trattate con 3-HAA e si osserva una riduzione della capacità proliferativa per concentrazioni superiori a 10 μM .

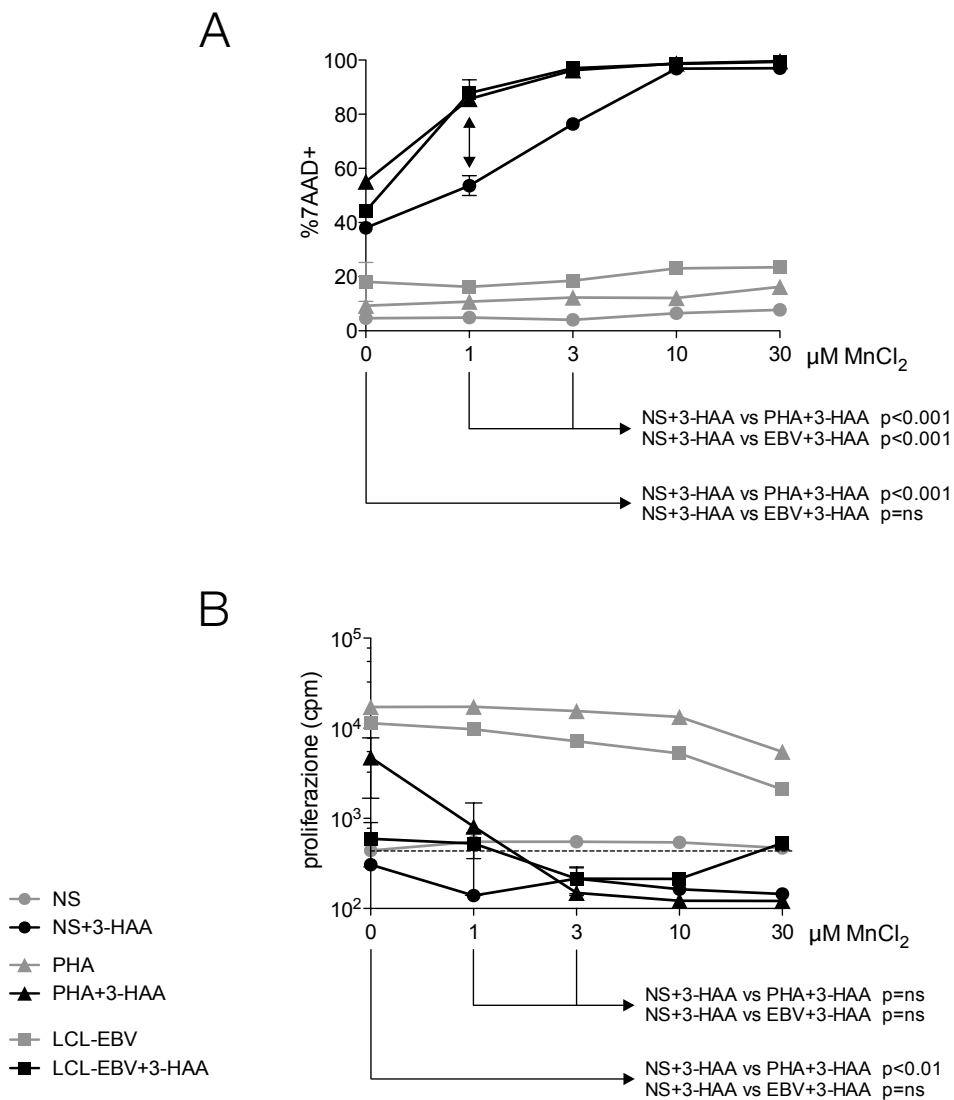


Figura 11. Gli ioni di manganese potenziano l'effetto del 3-HAA. Il $MnCl_2$ è stato aggiunto in concentrazione scalare (1-3-10-30 μM) alle cellule non stimulate (NS), stimulate con PHA o con LCL-EBV. Le cellule sono state trattate con 3-HAA 0.5 mM (linee nere) e confrontate con cellule non trattate con il farmaco (linee grigie). **A.** Vitalità: il grafico rappresenta la percentuale di cellule positive al 7AAD. **B.** Proliferazione: i dati sono espressi come cpm (da notare che i risultati sono rappresentati su una scala logaritmica). Entrambi i dati sono espressi come media \pm SEM di due esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata calcolata con il test ANOVA a due fattori e con il test di Bonferroni. La doppia freccia nel grafico A rappresenta la concentrazione di manganese cloruro per cui si osserva la maggior azione differenziale tra cellule non stimulate e attivate [55].

Acido 3-idrossiantranilico e Bortezomib

In un secondo momento, nello stesso sistema di MLR con LCL-EBV, è stata testata la combinazione di 3-HAA, MnCl_2 e Bortezomib.

Per questo, cellule non stimolate e stimolate con PHA o con LCL-EBV sono state trattate con 3-HAA 0.5 mM e/o MnCl_2 1 o 3 μM e/o Bortezomib 0.5 μM per 60 ore. Al termine dell'incubazione sono state valutate la vitalità residua e la proliferazione dei linfociti *responder*.

Anche in questo caso si sono confermati i dati ottenuti dai primi esperimenti per quanto riguarda il 3-HAA in associazione con gli ioni di manganese, mentre per quanto riguarda l'associazione con il Bortezomib, quest'ultimo ha dimostrato dei risultati meno riproducibili e, in ogni caso, non sembra aumentare ulteriormente l'effetto selettivo sui linfociti attivati dato dal 3-HAA, sia per quanto riguarda la vitalità che la proliferazione (Figura 12).

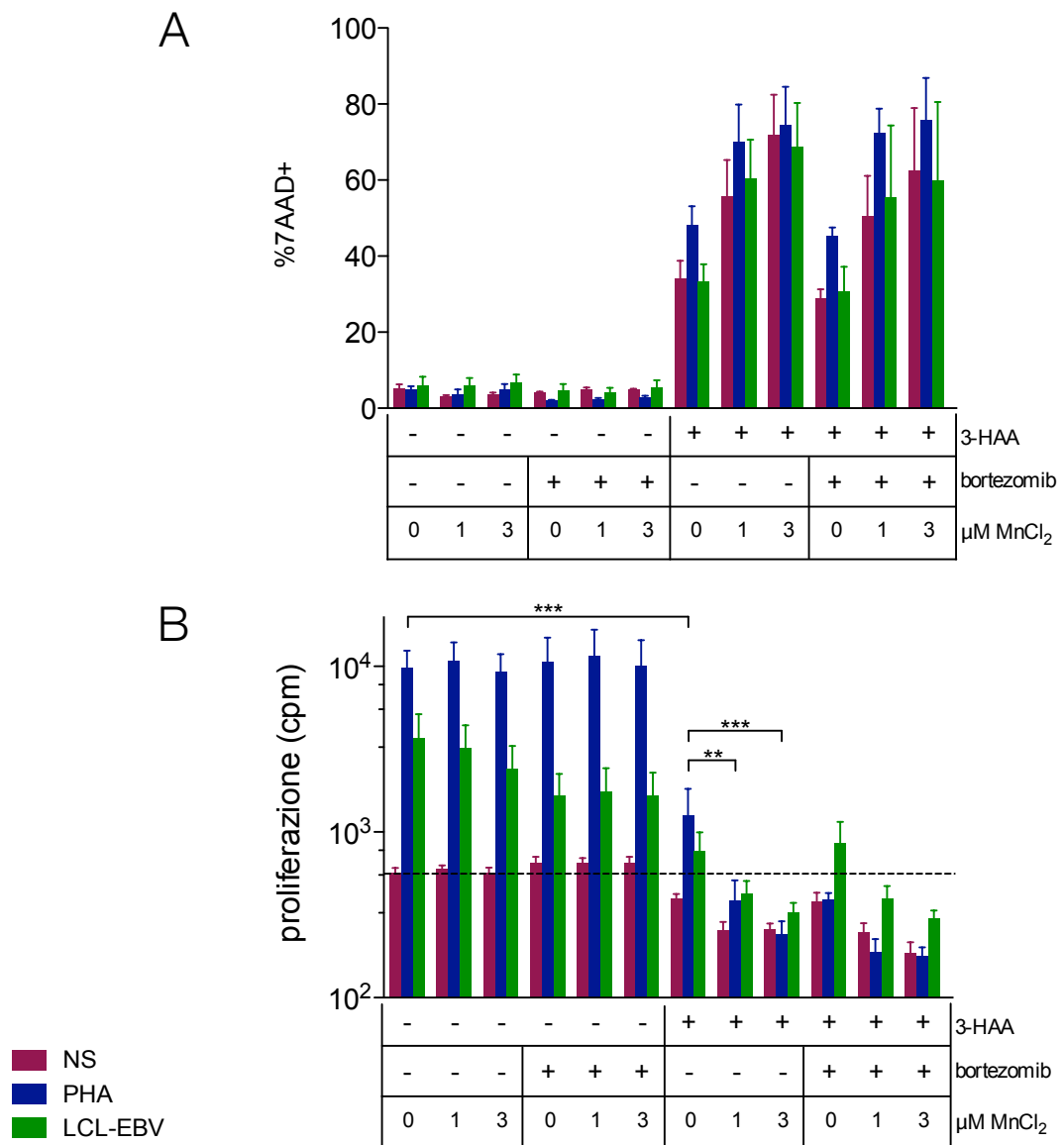


Figura 12. Il Bortezomib non induce aumento significativo sull'effetto del 3-HAA. Alle cellule non stimolate (NS, rosso), stimolate con PHA (blu) o con LCL-EBV (verde) sono stati aggiunti da soli o in combinazione il 3-HAA 0.5 mM, il MnCl₂ 1 o 3 μM, il Bortezomib 0.5 μM. **A.** Vitalità: le barre rappresentano la percentuale di cellule positive al 7AAD. **B.** Proliferazione: i dati sono espressi come cpm (da notare che i risultati sono rappresentati su una scala logaritmica). Entrambi i dati sono espressi come media±SEM di due esperimenti indipendenti. Analisi statistica: ***p<0.001, *p<0.0058 (Mann Whitney Test) [55].

MLR con DC e test di restimolazione

Lo scopo di questo lavoro è proporre un metodo di deplezione *in vitro* basato sull'uso di piccole molecole in grado di indurre un arresto della proliferazione o l'apoptosi in cellule attivate in seguito a stimolo antigenico rappresentato da cellule allogeniche. La messa a punto di questo metodo ha il fine ultimo di proporre questo metodo in un contesto "*clinical grade*", attuabile in caso di trapianto aploidentico di cellule staminali emopoietiche.

L'uso di linfociti trasformati con virus di *Epstein Barr* perciò esula da questo contesto dal momento che, l'utilizzo di cellule trasfettate con un virus potenzialmente oncogenico, non sarebbe attuabile.

La possibilità di stimolare i linfociti *responder* con cellule dendritiche offre quindi una soluzione "*clinical grade*" e facilmente attuabile.

In questa fase di lavoro sono state utilizzate cellule dendritiche (DC) maturate *in vitro* a partire da monociti separati da sangue periferico. Le DC così ottenute si possono congelare ed utilizzare al bisogno dando risultati comparabili con quelli ottenuti da DC fresche (dati non riportati).

I linfociti *responder* sono stati posti in co-coltura con DC allogeniche per 60 ore in presenza o meno del 3-HAA 0.5 mM con MnCl₂ 1 µM. Al termine dell'incubazione le cellule sono state colorate con il tracciante CFSE e poste nuovamente in coltura per ulteriori 60 ore:

- senza nessun nuovo stimolo
- oppure con i seguenti stimoli:
- biglie anti-CD3/anti-CD28
 - cellule dendritiche dallo stesso donatore dell'MLR primaria
 - cellule dendritiche di un diverso donatore (donatore di terza parte)

Al termine del tempo di coltura, le cellule sono state analizzate in citometria a flusso per valutare contemporaneamente la proliferazione (Figura 13) e la vitalità residua.

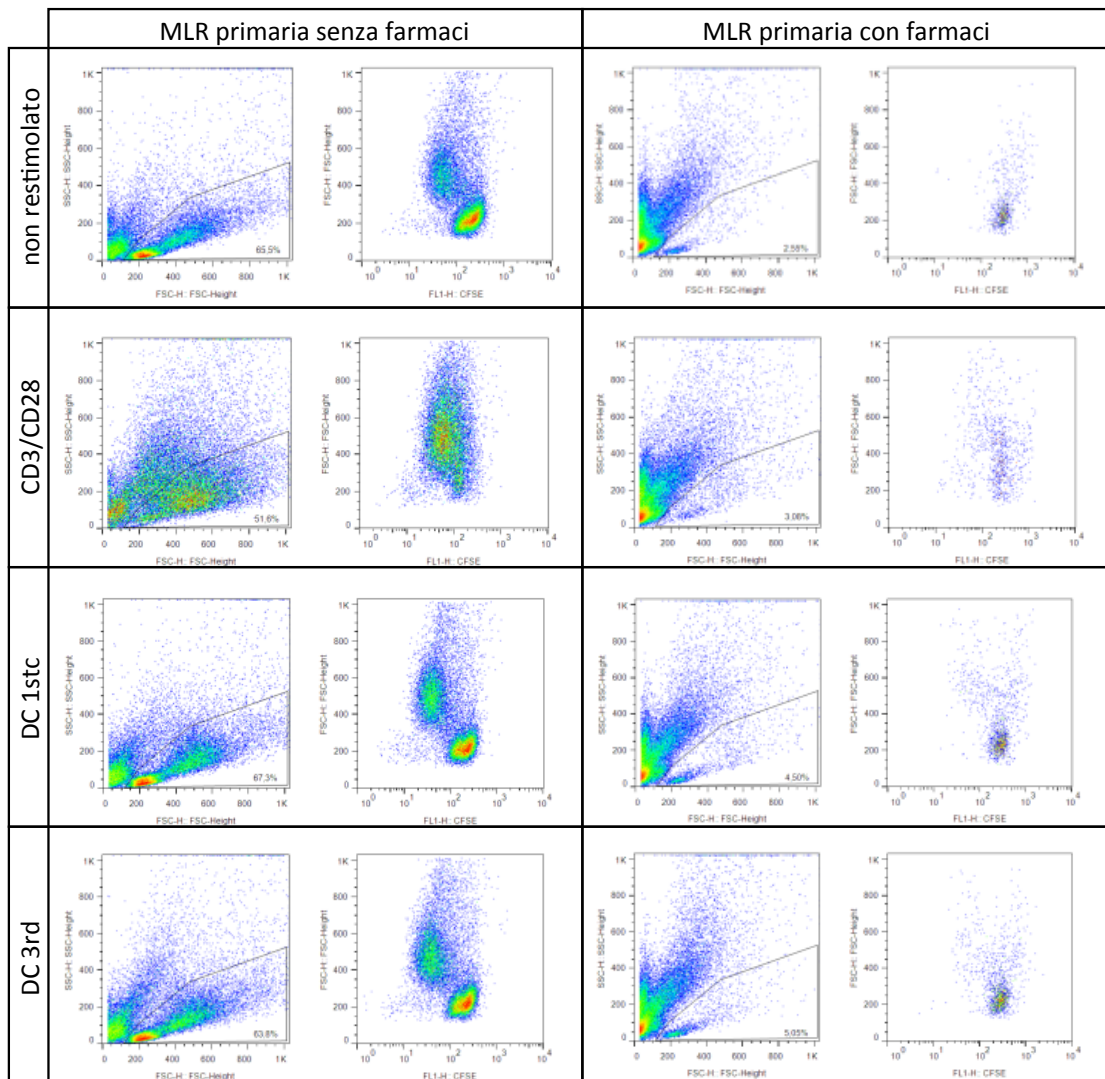


Figura 13. Proliferazione dopo MLR secondaria. Nei citogrammi a sinistra è rappresentato il gate morfologico sui linfociti su cui è stata poi valutata la proliferazione (CFSE). I linfociti sono stati stimolati con DC allojeniche (MLR primaria) e trattati con o senza 3-HAA e $MnCl_2$ per 60 ore. In seguito, sono stati marcati con il tracciante CFSE e tenuti in coltura per ulteriori 60 ore (MLR secondaria) senza farmaci e con i diversi stimoli e quindi analizzati in citometria a flusso.

non restimolate: nessun nuovo stimolo è stato aggiunto nell'MLR secondaria

CD3/CD28: linfociti restimolati con biglie anti-CD3/anti-CD28

DC 1st: linfociti restimolati con DC dello stesso donatore dell'MLR primaria

DC 3rd: linfociti stimolati con DC da donatore di terza parte

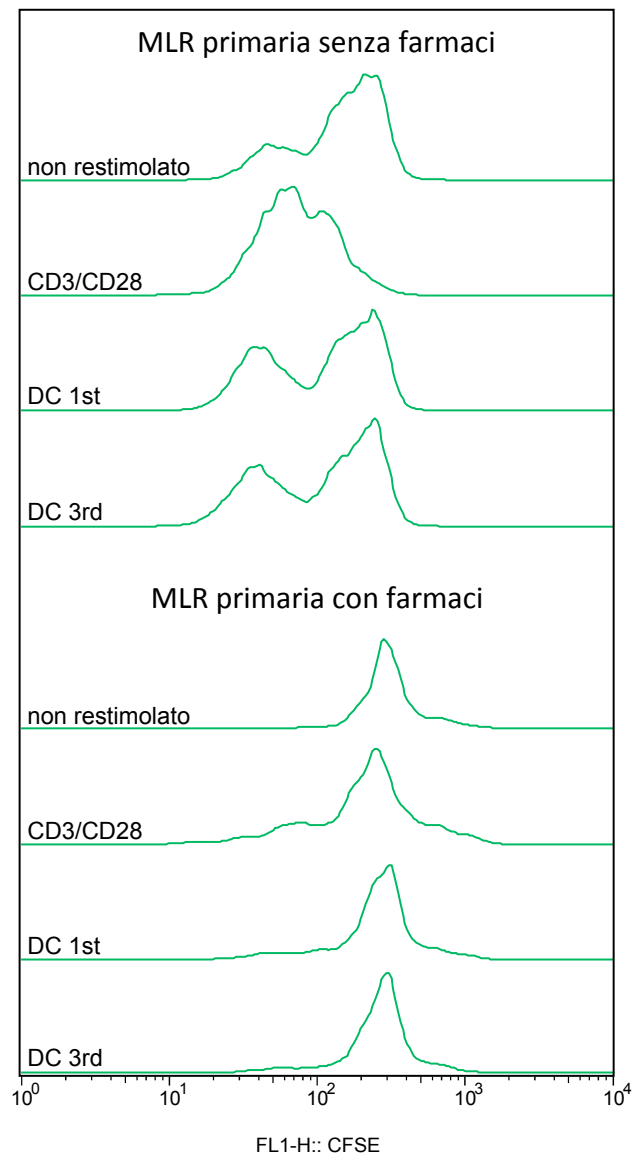


Figura 14. Proliferazione dopo MLR secondaria. Gli istogrammi rappresentano la proliferazione (CFSE) delle cellule dopo la restimolazione (MLR secondaria).

Da un primo risultato preliminare si osserva che il problema principale è di tipo tecnico dal momento che le cellule sembrano essere poco o nulla responsive dopo la somministrazione dei farmaci. Questo probabilmente è il risultato di un'emivita prolungata del farmaco nelle cellule anche dopo i lavaggi e la restimolazione, anche se non persiste un effetto tossico dal momento che le cellule risultano essere quasi completamente 7AAD negative. In figura 14 infatti è possibile osservare che per le cellule trattate con il farmaco durante l'MLR

primaria e successivamente restimolate non si osserva proliferazione, né in presenza di nuovo stimolo allogenico né in presenza di uno stimolo più generico rappresentato dalle biglie anti-CD3/anti-CD28.

Un altro punto su cui porre l'attenzione è la proliferazione che si osserva anche nel campione non trattato con i farmaci nell'MLR primaria e non restimolato nell'MLR secondaria. Questo può essere dovuto sia alla persistenza in coltura di cellule dendritiche derivanti dalla MLR primaria che non vengono eliminate e possono quindi continuare a stimolare i linfociti *responder*, che al proseguimento di divisioni già avviate nella prima fase.

Questi risultati pongono le basi per i successivi esperimenti in cui ci si propone di rivalutare la tempistica di reattivazione (MLR secondaria), la possibilità di somministrazione del farmaco in tempistiche diverse o ripetute e la reattività residua contro antigeni virali (come EBV e HCMV).

Conclusioni

L'induzione dell'apoptosi o l'arresto della proliferazione nei linfociti attivati è una condizione fisiologica necessaria per l'omeostasi del sistema immune dal momento che permette di controllare la risposta immune evitando l'insorgenza di fenomeni di auto-mantenimento della risposta infiammatoria.

La suscettibilità dei linfociti all'immunosoppressione si instaura dopo alcune settimane dall'inizio della risposta immune e comporta cambiamenti a livello molecolare che portano alla down-regolazione di fattori anti-apoptotici e contemporaneamente all'aumento di espressione di recettori dell'apoptosi (come ad esempio FAS). Nei primi giorni di attivazione invece, i linfociti risultano essere particolarmente resistenti agli effetti immunosoppressivi, anche indotti da farmaci, che risultano, quindi, essere poco efficaci sulle cellule recentemente attivate e d'altra parte mostrano un'alta tossicità sulle cellule non proliferanti.

L'applicazione *in vitro* di metodi per l'attivazione allospecifica, d'altra parte richiede sistemi che permettano un'attivazione selettiva delle sole cellule capaci

di rispondere agli alloantigeni, l'identificazione, e quindi la deplezione, in tempi brevi (alcuni giorni) di queste cellule così attivate, per evitare il propagarsi di un'attivazione *by-stander* di cellule non specifiche, tra cui cellule patogeno- o tumore-specifiche che invece si vorrebbe preservare dopo la deplezione.

In letteratura sono stati proposti diversi metodi di deplezione *in vitro*, basati principalmente sull'utilizzo di anticorpi monoclonali, contro marcatori di attivazione, da utilizzare su cellule attivate per una settimana o più con cellule allogeniche.

Più recentemente alcuni lavori hanno proposto l'uso di molecole che, aggiunte alla co-coltura, interferiscono con il fisiologico meccanismo di attivazione e proliferazione dei linfociti *responder*.

Con questo lavoro di tesi si è voluto testare queste molecole proposte in un sistema di MLR che prevedesse tempi brevi di co-coltura (60 ore).

Mentre il Metotrexate e il Phenoxodiololo non sembrano offrire un buon metodo di allodeplezione, il Tasocitinib ha dato risultati da rivalutare, quando un sistema di valutazione della reattività residua (MLR secondaria) sarà messo a punto, eventualmente valutando la possibilità di utilizzare questo inibitore in associazione con altre molecole, come ad esempio l'acido 3-idrossiantranilico che ha dato finora i risultati più ripetibili.

Il 3-HAA è ben noto, come metabolita del triptofano, per essere implicato nell'attività immunosoppressiva delle cellule dendritiche e delle cellule staminali mesenchimali e anche nel sistema proposto sembra avere un'attività anti-proliferativa e pro-apoptica selettiva sulle cellule recentemente attivate, con un'accettabile tossicità sulle cellule non proliferanti. Gli ioni di manganese sono in grado di aumentare ulteriormente l'effetto selettivo del 3-HAA, mentre il Bortezomib, che inizialmente aveva dato buoni risultati in termini di azione differenziale sulle cellule attivate, ha dimostrato negli esperimenti successivi una più ampia variabilità e andrà quindi rivalutato.

La reattività residua delle cellule dopo il trattamento con i farmaci rimane ancora un punto da valutare a causa dei problemi tecnici da superare per quanto

riguarda principalmente i tempi di emivita delle molecole utilizzate per l'allodeplezione. Tuttavia la scelta dei metodi di deplezione in sé permette di modulare ampiamente le possibilità di somministrazione e valutazione dei farmaci.

In conclusione, quindi, i risultati presentati in questo lavoro indicano che l'allodeplezione con farmaci è una strada percorribile, anche se ancora molto va fatto per ottimizzare questa tecnica.

Bibliografia

1. Camba L, C.F., Morabito F, *trapianto di cellule staminali emopoietiche*.
2. Locatelli, F., *trapianto di cellule staminali emopoietiche in pediatria*1996.
3. Sanders, J., et al., *Long term effects and quality of life in children and adults after marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1989. **4 Suppl 4**: p. 27-9.
4. Dexter, M. and T. Allen, *Haematopoiesis. Multi-talented stem cells?* Nature, 1992. **360**(6406): p. 709-10.
5. Toksoz, D., et al., *The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferation*. Blood, 1980. **55**(6): p. 931-6.
6. Dexter, T.M., et al., *The role of cells and their products in the regulation of in vitro stem cell proliferation and granulocyte development*. J Supramol Struct, 1980. **13**(4): p. 513-24.
7. McCulloch, E.A. and J.E. Till, *Regulatory mechanisms acting on hemopoietic stem cells. Some clinical implications*. Am J Pathol, 1971. **65**(3): p. 601-19.
8. Harrison, D.E., et al., *Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations*. Exp Hematol, 1993. **21**(2): p. 206-19.
9. Arcese, W., et al., *Clinical use of allogeneic hematopoietic stem cells from sources other than bone marrow*. Haematologica, 1998. **83**(2): p. 159-82.
10. Schmit-Pokorny, K., *Expanding indications for stem cell transplantation*. Semin Oncol Nurs, 2009. **25**(2): p. 105-14.

11. Ljungman, P., et al., *Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe*. Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(5): p. 439-49.
12. Shankarkumar, *the human leukocyte antigen (HLA) system*. International Journal of Human Genetics, 2004.
13. Koh, L.P. and N. Chao, *Haploidentical hematopoietic cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2008. **42 Suppl 1**: p. S60-S63.
14. Beatty, P.G., M. Mori, and E. Milford, *Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor*. Transplantation, 1995. **60**(8): p. 778-83.
15. Hansen, J.A., et al., *Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors*. Immunol Rev, 1997. **157**: p. 141-51.
16. Chauvenet, A.R. and N.M. Smith, *Referral of pediatric oncology patients for marrow transplantation and the process of informed consent*. Med Pediatr Oncol, 1988. **16**(1): p. 40-4.
17. Koreth, J. and J.H. Antin, *Current and future approaches for control of graft-versus-host disease*. Expert Rev Hematol, 2008. **1**(1): p. 111.
18. Xun, C.Q., et al., *Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2360-7.
19. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
20. Atkinson, K., *Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1990. **5**(4): p. 209-26.
21. Enright, H., et al., *Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy*. Transplantation, 1993. **55**(6): p. 1339-46.
22. Gillespie, G.M., et al., *Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors*. J Virol, 2000. **74**(17): p. 8140-50.
23. Gamadia, L.E., et al., *Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2686-92.
24. Winston, D.J., et al., *Infectious complications of bone marrow transplantation*. Exp Hematol, 1984. **12**(3): p. 205-15.
25. Horn, R., et al., *Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy*. Rev Infect Dis, 1985. **7**(5): p. 646-55.
26. Teshima, T., et al., *Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium*. Nat Med, 2002. **8**(6): p. 575-81.

27. Duffner, U.A., et al., *Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7393-8.
28. Shlomchik, W.D., et al., *Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells*. Science, 1999. **285**(5426): p. 412-5.
29. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Immune reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation: obstacles and anticipated progress*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(5): p. 544-8.
30. Barfield, R.C., K.A. Kasow, and G.A. Hale, *Advances in pediatric hematopoietic stem cell transplantation*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(10): p. 1533-9.
31. Davies, J.K., M.B. Koh, and M.W. Lowdell, *Antiviral immunity and T-regulatory cell function are retained after selective alloreactive T-cell depletion in both the HLA-identical and HLA-mismatched settings*. Biol Blood Marrow Transplant, 2004. **10**(4): p. 259-68.
32. McKinnon, T.A., et al., *N-linked glycosylation of VWF modulates its interaction with ADAMTS13*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3042-9.
33. Fehse, B., et al., *Efficient depletion of alloreactive donor T lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69)*. Br J Haematol, 2000. **109**(3): p. 644-51.
34. Craston, R., et al., *Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells*. J Immunol Methods, 1997. **209**(1): p. 37-45.
35. Koh, M.B., H.G. Prentice, and M.W. Lowdell, *Selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts: graft engineering for GVHD prophylaxis*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(10): p. 1071-9.
36. Koh, M.B., et al., *Alloantigen-specific T-cell depletion in a major histocompatibility complex fully mismatched murine model provides effective graft-versus-host disease prophylaxis in the presence of lymphoid engraftment*. Br J Haematol, 2002. **118**(1): p. 108-16.
37. Amrolia, P.J., et al., *Selective depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2292-9.
38. Ge, X., et al., *CD134-allodepletion allows selective elimination of alloreactive human T cells without loss of virus-specific and leukemia-specific effectors*. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. **14**(5): p. 518-30.
39. Genestier, L., et al., *Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells*. J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 322-8.
40. Braun, J. and R. Rau, *An update on methotrexate*. Curr Opin Rheumatol, 2009. **21**(3): p. 216-23.
41. Herst, P.M., et al., *The anti-cancer drug, phenoxodiol, kills primary myeloid and lymphoid leukemic blasts and rapidly proliferating T cells*. Haematologica, 2009. **94**(7): p. 928-34.

42. Manshour, T., et al., *The JAK kinase inhibitor CP-690,550 suppresses the growth of human polycythemia vera cells carrying the JAK2V617F mutation*. *Cancer Sci*, 2008. **99**(6): p. 1265-73.
43. Kudlacz, E., et al., *The JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent anti-inflammatory agent in a murine model of pulmonary eosinophilia*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **582**(1-3): p. 154-61.
44. Blanco, B., et al., *Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines*. *Blood*, 2006. **107**(9): p. 3575-83.
45. Blanco, B., et al., *Depletion of alloreactive T-cells in vitro using the proteasome inhibitor Bortezomib preserves the immune response against pathogens*. *Leuk Res*, 2011.
46. Mitchell, B.S., *The proteasome--an emerging therapeutic target in cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(26): p. 2597-8.
47. Lopez, A.S., et al., *Effect of 3-hydroxyanthranilic acid in the immunosuppressive molecules indoleamine dioxygenase and HLA-G in macrophages*. *Immunol Lett*, 2008. **117**(1): p. 91-5.
48. Mellor, A.L., et al., *Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion*. *J Immunol*, 2003. **171**(4): p. 1652-5.
49. Grohmann, U., F. Fallarino, and P. Puccetti, *Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(5): p. 242-8.
50. Zaher, S.S., et al., *3-hydroxykynurenine suppresses CD4+ T-cell proliferation, induces T-regulatory-cell development, and prolongs corneal allograft survival*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(5): p. 2640-8.
51. DelaRosa, O., et al., *Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells*. *Tissue Eng Part A*, 2009. **15**(10): p. 2795-806.
52. Meisel, R., et al., *Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*. *Blood*, 2004. **103**(12): p. 4619-21.
53. Hiramatsu, R., et al., *Cinnabarinic acid generated from 3-hydroxyanthranilic acid strongly induces apoptosis in thymocytes through the generation of reactive oxygen species and the induction of caspase*. *J Cell Biochem*, 2008. **103**(1): p. 42-53.
54. Lee, S.M., et al., *Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion*. *Immunol Lett*, 2010. **132**(1-2): p. 53-60.
55. Piscianz, E., et al., *Differential action of 3-hydroxyanthranilic acid on viability and activation of stimulated lymphocytes*. *Int Immunopharmacol*, 2011. **11**(12): p. 2242-5.