

REVIEW

Clinical, virological and immunological aspects of adoptive cell therapy against EBV-related diseases

Anna Merlo¹, Riccardo Turrini¹, Patrizia Comoli², Riccardo Dolcetti³, Antonio Rosato^{1,4}

¹Department of Oncology and Surgical Sciences, University of Padova, Padova,

²Laboratory of Transplant Immunology and Pediatric Hematology/Oncology,

Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, University of Pavia,

³CRO - IRCCS, National Cancer Institute, Aviano, PN,

⁴Istituto Oncologico Veneto, IOV - IRCCS, Padova

Key Words: adoptive cell therapy, CTL, EBV-related malignancies, PTLD, Hodgkin's disease, Nasopharyngeal carcinoma

Aspetti clinici, virologici e immunologici della terapia cellulare adottiva nelle neoplasie EBV-correlate

SUMMARY

From an immunological point of view, tumors with a viral etiology have an important advantage, as their associated antigens are not self and, thereby, are strongly immunogenic. This is well demonstrated in the case of EBV-associated tumors, which represent one of the main target of adoptive immunotherapy. Here, we describe the results of trials conducted thus far with EBV-specific cytotoxic T lymphocytes, in terms of clinical, virological and immunological responses, underlining the relevance of the continuous interplay between oncologists, clinical microbiologists and immunologists for an effective management of these disorders.

Received November 11, 2008

Accepted March 3, 2009

INTRODUZIONE

Il virus di Epstein-Barr è un γ -herpesvirus umano caratterizzato da un marcato tropismo per le cellule B, nelle quali instaura, in seguito ad una prima fase di infezione produttiva, una stretta forma di latenza. Scoperto nel 1964 analizzando al microscopio elettronico cellule di linfoma di Burkitt, il virus di Epstein-Barr è stato riscontrato anche in associazione ad altre malattie neoplastiche, quali i disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD), il linfoma di Hodgkin, il carcinoma nasofaringeo, il linfoma a cellule NK/T (ENK/T) (64). Questi tumori sono tutti caratterizzati dall'espressione di antigeni virali che costituiscono un ottimo bersaglio per approcci di immunoterapia adottiva. Oltre ad essere ben noti e fortemente immunogenici, questi antigeni sono altamente specifici, essendo espressi quasi esclusivamente nelle cellule maligne. Infatti, la maggior parte dei geni codificanti per le proteine virali è silenziata nelle cellule B normali della memoria, che rappresentano il reservoir virale nell'individuo infetto (1-50/10⁶ cellule B) (25); tale meccanismo permette al virus di sfuggire al

controllo del sistema immunitario.

Tra i tumori EBV-correlati, il migliore bersaglio per l'immunoterapia adottiva è costituito dai PTLD. Il razionale per questo tipo di approccio è fornito dall'eziopatogenesi stessa della malattia: infatti, mentre nell'individuo sano la proliferazione B cellulare indotta dal virus viene tenuta sotto controllo dall'immunità cellulo-mediata indotta al momento dell'infezione primaria, nell'individuo immunocompromesso la risposta immune EBV-specifica può essere ripristinata mediante l'infusione di linfociti T virus-specifici selezionati ed espansi *ex vivo*.

Inoltre, i PTLD sono indubbiamente le neoplasie EBV-correlate contraddistinte dalla maggiore immunogenicità. Infatti, le forme precoci di PTLD esprimono generalmente tutte le proteine di latenza virale, i sei antigeni nucleari di EBV, gli EBNA, le proteine latenti di membrana, LMP1 e LMP2, la cosiddetta latenza di tipo III (64), mentre le altre neoplasie, EBV-associate, esprimono un più ristretto profilo di antigeni. Lo stesso fenotipo di latenza III caratterizza anche le cellule linfoblastoidi (LCL), linfociti B immortalizzati dal

Corresponding author: Antonio Rosato

Department of Oncology and Surgical Sciences,

University of Padova and Istituto Oncologico Veneto, IOV - IRCCS, - Via Gattamelata 64, 35128 Padova, Italy.

Tel.: 049-8215858; Fax: 049-8072854 - E-mail: antonio.rosato@unipd.it

virus, che costituiscono un ben caratterizzato modello *in vitro* dei PTLD. Queste linee cellulari esprimono, oltre agli antigeni virali, anche molecole HLA di classe I e II e molecole costimolatorie e sono quindi utilizzate correntemente come cellule che presentano l'antigene (APC) nei protocolli ad uso clinico per la selezione ed espansione *in vitro* dei linfociti T citotossici (CTL) EBV-specifici (50) (Figura I). La riattivazione di questi ultimi avviene con successo per la quasi totalità dei donatori, dal momento che il 95% della popolazione adulta mondiale è sieropositiva per il virus e quindi possiede cellule memoria specifiche, indotte al momento dell'infezione primaria. Circa 0.05-1% dei linfociti T CD8⁺ memoria nei portatori sani senza storia di mononucleosi infettiva è specifico per gli antigeni di latenza di EBV (25). Dato che le LCL esprimono tutte le proteine di latenza, le linee CTL generate con questo protocollo riconoscono diversi antigeni virali, con una precisa gerarchia di immunodominanza: CTL specifici per le proteine nucleari della famiglia EBNA3 in genere prevalgono nelle colture ottenute *in vitro*, mentre CTL specifici per gli antigeni di membrana LMP-1 ed LMP-2 sono usualmente poco rappresentati. L'ampiezza delle specificità antigeniche riconosciute dai CTL EBV-specifici riduce notevolmente, anche se non lo elimina completamente, il rischio di selezionare *in vivo* dei cloni tumorali resistenti. Inoltre, pur essendo costituite in prevalenza da linfociti CD8⁺, queste linee contengono anche una percentuale variabile di cellule CD4⁺ le quali, esplicando una funzione helper, concorrono al mantenimento *in vivo* dei CTL.

I primi risultati a livello clinico con CTL EBV-specifici sono stati ottenuti proprio nella profilassi e nel trattamento delle PTLD insorte in seguito a trapianto di organo solido (SOT) e cellule staminali ematopoietiche (HSCT). Sulla scia di questi risultati incoraggianti, tale approccio è stato esteso anche ad altre neoplasie EBV-correlate, caratterizzate dall'espressione di un più ristretto pattern di antigeni virali (Figura II).

Scopo della presente review è la presentazione dei risultati, in termini di risposta clinica, virologica e immunologica, degli studi clinici finora condotti con CTL EBV-specifici nel trattamento e nella profilassi delle varie neoplasie associate al virus e pubblicati in articoli in lingua inglese in PubMed. L'intento è puramente descrittivo: infatti, la variabilità riscontrata nei lavori in termini di trattamento, caratteristiche dei pazienti e valutazione dell'outcome e soprattutto il numero relativamente ristretto dei casi riportati non hanno permesso di effettuare una valutazione statistica di tipo meta-analitico dei dati raccolti. Nonostante questo limite, quanto esposto permette di sottolineare l'importanza a livello clinico di un approccio immunoterapeutico, promettente e flessibile, in un campo in cui aspetti oncologici, virologici e più strettamente immunologici si fondono intimamente. In particolare, l'esperienza fin qui maturata indica che l'attuale e futura espansione di tali schemi di terapia cellulare richiederanno un sempre maggiore coinvolgimento di competenze microbiologiche ed immunologiche integrate per un'ottimale diagnostica e monitoraggio clinico dei pazienti trattati.

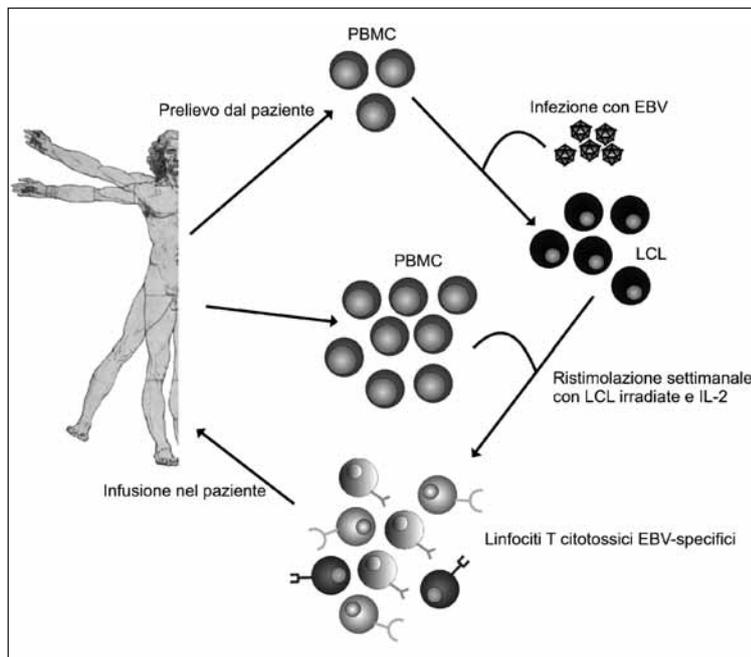


Figura I. Protocollo di generazione dei CTL EBV-specifici per immunoterapia adottiva

PTLD

I PTLD comprendono un ampio spettro di disordini linfoproliferativi, favoriti dall'immunosoppressione iatrogena nel contesto del trapianto; essi derivano principalmente da cellule B e, nella maggior parte dei casi (80-90%), sono correlate all'infezione da EBV (58). Pur essendo relativamente poco frequenti, l'incidenza è inferiore al 2% sul totale dei trapiantati (60), i PTLD sono caratterizzati da un tasso di mortalità complessivo di circa il 50% (45). Noti fattori di rischio sono il grado di immunosoppressione, correlato al carico globale di farmaci immunosoppressivi erogato nei vari tipi di trapianto d'organo, l'età al momento del trapianto e lo stato sierologico del donatore e del ricevente per la presenza di anticorpi contro EBV.

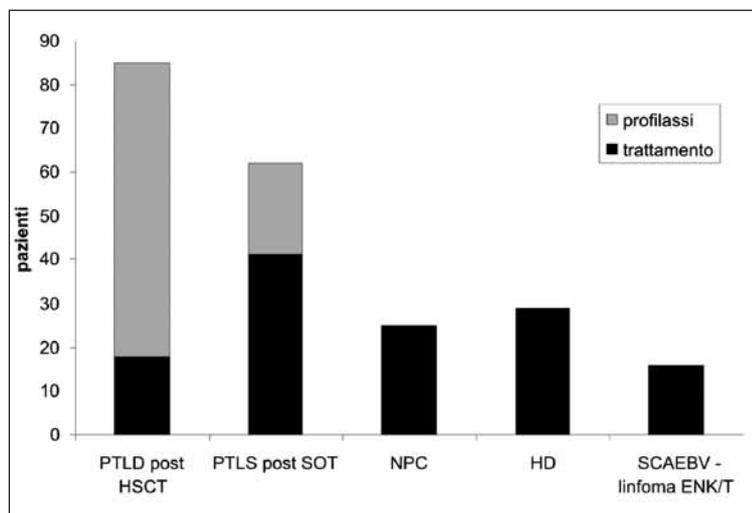


Figura II. Pazienti con diverse patologie EBV-associate trattati con CTL virus-specifici a scopo terapeutico o profilattico

Gli approcci terapeutici in uso sono molteplici e mirano da un lato a ripristinare l'immunità cellulare T (riduzione dell'immunosoppressione, somministrazione di IFN α), dall'altro a colpire le cellule B, radioterapia, resezione chirurgica, chemioterapia, anticorpi anti-CD20 - Rituximab - o anti IL-6, o il virus stesso, agenti antivirali, agenti che inducono il ciclo litico o l'eradicazione dell'episoma (17). La risposta ai diversi tipi di trattamento è molto variabile e i dati clinici riportati sono contrastanti, frequentemente non supportati da un numero adeguato di casi, soprattutto per le più recenti terapie con citochine e con farmaci antivirali, Acyclovir, Valacyclovir, Ganciclovir, Valganciclovir. Questi ultimi, in particolare, sono efficaci solo nei confronti del virus in fase litica, ma non in fase latente, risultando quindi utili solo nelle fasi iniziali di riattivazione per limitare lo spreading virale (17). Tutti questi approcci terapeutici sono gravati dalla potenziale insorgenza di effetti collaterali anche pesanti, e, in caso di fallimento, la prognosi si rivela infausta, fino al 50-90% di mortalità in caso di mancata risposta alla riduzione dell'immunosoppressione (58). Questo ha spinto numerosi gruppi a percorrere nuove e più sicure strade, tra cui l'immunoterapia adottiva con CTL EBV-specifici sembra fra le più promettenti per i PTLD sia nel contesto del trapianto di organo solido che di cellule staminali ematopoietiche.

PTLD in seguito a trapianto di cellule staminali ematopoietiche

La risoluzione delle lesioni linfomatose, ottenuta in seguito all'infusione di leucociti non manipolati del donatore in riceventi di trapianto di cellule staminali ematopoietiche con diagnosi di PTLD, ha fornito un importante "proof-of-principle"

della validità dell'approccio immunoterapeutico (47). Tuttavia, la comparsa di graft-versus-host disease (GvHD), dovuta alla presenza di linfociti alloreattivi nell'infusato, ha spinto Rooney e colleghi (50) a generare CTL EBV-specifici a partire da cellule mononucleate circolanti (PBMK) del donatore. Nella maggior parte dei casi riportati, CTL virus-specifici sono stati infusi a scopo profilattico in pazienti giudicati a rischio di sviluppare PTLD, 67 pazienti in totale (10, 20, 38). Ad eccezione di un paziente (20), in nessuno di questi casi al follow up è stata diagnosticata un PTLD, rispetto ad un'incidenza cumulativa di $1.0 \pm 0.3\%$ (15). Nell'unico studio

caso-controllo (51), riguardante gruppi ad alto rischio di PTLD in quanto trapiantati con midollo osseo depleto di cellule T (RR 12.7) (15), nessuno dei 39 pazienti infusi a scopo profilattico ha sviluppato la malattia rispetto all'11.5% dei controlli. Questa protezione a lungo termine (follow up di 15-54 mesi) è stata garantita dalla persistenza nell'ospite dei CTL infusi, riscontrata *ex vivo* fino a 18 settimane e nelle colture EBV-specifiche riattivate *in vitro* fino a 38 mesi dopo l'infusione tramite la tecnica di gene marking. Oltre che da un "ambiente" favorevole, il sistema immunitario in attiva ricostituzione, la permanenza dei CTL e la loro espansione, stimata fino a 2-3 log, sono state favorite dalla presenza nelle colture di una percentuale molto variabile di cellule T CD4⁺ (dal 2 al 98%), fatto che sottolinea il loro ruolo fondamentale in approcci di immunoterapia adottiva.

Anche se il trattamento con CTL EBV-specifici si è dimostrato privo di effetti collaterali ed efficace nella prevenzione del PTLD, i costi stimati in circa \$4000 per linea cellulare nel 1998 (63), ma soprattutto le strutture richieste per la complessa generazione degli effettori da infondere, rendono necessaria una precisa ed omogenea definizione dei fattori predittivi di sviluppo di PTLD. Nella maggior parte dei casi riportati, viene indicato come fattore di rischio il riscontro di un'elevata carica virale (superiore a 1 genoma di EBV/10³ cellule) che quasi sempre precede il manifestarsi della malattia. A questo proposito, manca ancora una precisa standardizzazione relativamente al campione da analizzare, al metodo di purificazione del DNA, al frammento di DNA da amplificare ed alla determinazione di un valore soglia clinicamente rilevante. In particolare, la selezione del materiale biologico di partenza, siero/plasma, PBMK o sangue intero, rappresenta un punto cri-

tico, a causa delle diverse informazioni che si possono ottenere monitorando la carica virale libera o associata a cellule. Infatti, il DNA cell-free può risultare dall'attiva replicazione virale o, come nel caso del NPC (7), dal rilascio di DNA virale da cellule tumorali apoptotiche. Invece, il riscontro di DNA associato a cellule B generalmente riflette una più elevata massa tumorale, anche se la distinzione tra cellule B infette normali o neoplastiche può essere difficoltosa (16). La rilevanza della definizione di valori soglia clinicamente utili risiede nella necessità di disporre di parametri laboratoristici che, complementando il quadro clinico, aiutino il medico a stabilire quando è il caso di ridurre il carico di farmaci immunosoppressori o quando è opportuno iniziare terapie tese a prevenire lo sviluppo del PTLD, compresi gli schemi di immunoterapia adottiva. Un accurato monitoraggio del carico di EBV si è comunque rivelato utile per valutare la risposta alle terapie effettuate, consentendone un'opportuna modulazione a livello del singolo paziente. Tuttavia, elevati carichi di EBV non sempre sono indicativi dello sviluppo di PTLD, mentre tali linfoproliferazioni possono insorgere anche in assenza di un concomitante incremento della quantità del DNA di EBV circolante (62). Alcuni autori consigliano quindi di affiancare all'indispensabile monitoraggio delle variazioni della carica virale, anche la determinazione della frequenza dei precursori dei CTL EBV-specifici. Dati recenti, infatti, suggeriscono come la determinazione del numero dei linfociti T EBV-specifici circolanti, effettuata mediante le tecniche ELISPOT o l'uso dei complessi tetramerici HLA-peptide in citofluorimetria, possa incrementare significativamente il potere predittivo del solo carico di EBV (56). In particolare, è stato dimostrato che, nell'ambito di pazienti trapiantati di fegato che sono andati incontro ad infezione primaria da EBV, il PTLD è insorto soltanto in quelli che mostravano sia carichi elevati di EBV che un basso numero di linfociti T EBV-specifici circolanti ($< 2/\text{mm}^3$) (56).

Oltre che a scopo profilattico, CTL EBV-specifici sono stati somministrati a scopo terapeutico in seguito a diagnosi di PTLD e sono state registrate almeno 10 remissioni complete su un totale di 18 pazienti (10, 19, 24, 28, 38, 46, 62). In particolare, nel caso di risposta completa riportato da Pakakasama e colleghi (46), ai CTL EBV-specifici è stato affiancato con successo il trattamento indirizzato contro il virus con Idrossicarbamide (HU). Questo farmaco, in grado di eradicare l'epidemia virale in linee cellulari EBV-positivo e precedentemente utilizzato con successo in tumori EBV-correlati, è stato somministrato per coprire il lasso di tempo richiesto per la generazione dei

CTL. Rispetto all'utilizzo dei CTL a scopo profilattico, è però da considerare con particolare attenzione il trattamento di pazienti con masse tumorali rilevanti, in quanto l'infiltrato massivo di cellule T può determinare una risposta infiammatoria importante non priva di conseguenze cliniche (51).

Nelle serie riportate, solo due pazienti non hanno risposto alla terapia (19, 28). Di particolare interesse il caso esaminato da Gottschalk e colleghi (19), in cui la mancata risposta è stata determinata dalla selezione, operata dai CTL, di un mutante del virus con importanti delezioni nella regione codificante alcuni epitopi della proteina EBNA3, immunodominanti nella risposta CD8^+ verso EBV. Anche se resa improbabile dall'infusione di colture dirette verso molteplici antigeni, è quindi possibile la comparsa di forme tumorali resistenti, a testimonianza del continuo e dinamico dialogo tra il virus e il sistema immunitario.

PTLD in seguito a trapianto di organo solido

Diversamente da quanto accade per i trapianti di cellule staminali ematopoietiche, più del 90% delle PTLD che insorgono in seguito al trapianto di organo solido originano dalle cellule B del ricevente. La terapia con CTL EBV-specifici richiede quindi la generazione di linfociti autologhi, possibile anche a partire da pazienti immunodepressi per causa virale o iatrogena (22, 53). Tuttavia, anche se descritti in letteratura (31), i protocolli standard per la generazione di CTL a partire da donatori EBV-seronegativi, categoria ad alto rischio di sviluppare PTLD, non sono così efficienti e riproducibili come per donatori sieropositivi. A dispetto, comunque, delle considerazioni fatte, sono stati trattati con successo 29 pazienti con CTL autologhi, sia a scopo profilattico che terapeutico (21 e 8 rispettivamente (12, 13, 23, 31, 53, 55)).

Un trial clinico di fase II, l'unico intent-to-treat in questo ambito (24), ha invece previsto l'impiego di CTL EBV-specifici allogenici, provenienti da una banca di CTL criopreservati da donatore, creata ad Edimburgo allo scopo di fornire cellule effettrici "pronte all'uso". Oltre al successo clinico del trattamento (48% di risposte tra parziali e complete a sei mesi dall'infusione), lo studio ha anche permesso, grazie al numero relativamente elevato di pazienti (31), di estrapolare alcune robuste considerazioni prognostiche. Tra i vari fattori considerati, infatti, non sembrano essere influenti nel determinare la risposta ai CTL lo stato sierologico nei confronti di EBV, il momento di insorgenza e la morfologia della PTLD e, sorprendentemente, neppure la diminuzione della carica virale. Tuttavia, a questo proposito è da sot-

tolinare il fatto che la carica virale è stata valutata su PBMC e non su plasma, maggiormente predittivo della risposta secondo alcuni autori (59). Sembrano invece correlare con un migliore esito clinico il grado di HLA matching fra donatore e ricevente ed una maggiore percentuale relativa di linfociti CD4⁺ nell'infusato. Il contributo dei CD4⁺, come precedentemente accennato, viene generalmente definito di tipo helper; tuttavia, le numerose evidenze, sia *in vitro* che *in vivo*, di linfociti CD4⁺ EBV-specifici dotati di attività citotossica diretta suggerisce che essi possano avere *in vivo* anche un rilevante effetto anti-tumorale. Questo possibile ruolo è stato recentemente dimostrato in un altro modello di tumorigenesi ad eziologia virale (linfoma B indotto dal γ -herpesvirus murino 68) (48).

Neoplasie EBV-correlate caratterizzate da un fenotipo di latenza II

Al pari dei PTLD, anche per il carcinoma nasofaringeo, le forme virus-relate di linfoma di Hodgkin, l'infezione cronica attiva e il linfoma a cellule NK/T, l'EBV può divenire bersaglio di approcci immunoterapeutici estremamente specifici e mirati, sia di tipo attivo che passivo. Diversamente però dai PTLD, queste neoplasie insorgono in pazienti immunocompetenti e, come tali, per sfuggire al controllo immunitario dell'ospite, esse attivano diverse strategie, prima fra tutte l'espressione di un ristretto profilo di antigeni virali (EBNA1, LMP1 e LMP2; fenotipo detto di latenza II) che usualmente non generano epitopi immunodominanti nella risposta CD8⁺ (42). Questa, infatti, è diretta principalmente verso epitopi derivati dalle proteine della famiglia EBNA3, come si riscontra anche nelle colture EBV-specifiche generate tramite ristimolazione con LCL, in cui solo una percentuale minoritaria di cellule T riconosce LMP1 e 2. Inoltre, in particolare il linfoma di Hodgkin e il carcinoma nasofaringeo sono caratterizzati da un microambiente tumorale fortemente immunosoppressivo e nel sangue periferico dei pazienti è stata riscontrata una cospicua attività ad opera di linfociti T CD4⁺ immunosoppressori, denominati cellule T regolatorie (33, 40). Nonostante queste considerazioni, sono state ottenute con l'immunoterapia adottiva importanti anche se non numerose risposte cliniche, che hanno spinto alla progettazione di nuovi trial, attualmente, nel caso del carcinoma nasofaringeo, almeno 2 trial clinici stanno reclutando pazienti (26). Un netto miglioramento dei risultati ottenuti potrebbe derivare dalla generazione di linee CTL arricchite nelle componenti cellulari specifiche per i diversi antigeni subdominanti espressi dalle cellule tumorali (3, 18,) e, nel caso del linfoma di

Hodgkin, dalla generazione di linee modificate geneticamente in modo da risentire meno degli effetti soppressivi del microambiente tumorale (4).

Carcinoma nasofaringeo

Anche se poco comune a livello mondiale, incidenza annua inferiore a 1/100000 abitanti (41), il carcinoma nasofaringeo indifferenziato è tuttavia endemico in alcune zone, quali la Cina del Sud e Hong Kong, incidenza da 15 a 50/100000 casi, e, tra i tumori EBV-correlati, è quello che mostra la maggiore associazione con il virus. Nonostante una minore responsività in test non-specifici per l'immunità cellulo-mediata (34) e una minore percentuale di precursori T specifici per gli antigeni tumorali rispetto ai controlli sani (36), è possibile riattivare *in vitro* linee T cellulari EBV-specifiche mediante ristimolazione con LCL anche da pazienti con carcinoma nasofaringeo. Diversamente dai linfociti infiltranti, il tumore (TIL) (36), queste linee sono dotate di una vigorosa attività citotossica verso le LCL autologhe, ottenute infettando i PBMC con il prototipo virale B95.8, comunemente utilizzato nei laboratori. La scelta di questo prototipo virale, di derivazione caucasica, potrebbe però non essere l'ottimale per il trattamento di pazienti cinesi, a causa della non completa identità amminoacidica di LMP2 e LMP1 tra le sequenze codificate dal ceppo virale B95.8, e i ceppi virali comuni nella popolazione asiatica (34). Tali discrepanze potrebbero, in linea di principio, condizionare la generazione degli epitopi immunogenici. Linee CTL EBV-specifiche sono state infuse finora in un totale di 24 pazienti, la maggior parte dei quali con malattia avanzata e refrattaria alle precedenti terapie (9, 11, 14, 57). Le infusioni sono state generalmente ben tollerate, solo 3 casi di reazioni infiammatorie al sito tumorale, anche a dispetto della presenza di importanti masse tumorali ed hanno indotto risposte cliniche sia complete sia, per la maggior parte dei pazienti, transienti o la stabilizzazione della malattia per un periodo compreso tra i 3 e i 15 mesi.

Dato il riscontro di un incremento, anche se variabile e temporaneo, dei precursori CTL specifici nel sangue periferico in 19 su 23 pazienti studiati, l'ostilità del microambiente tumorale, espressione di FasL o di IL-10 da parte delle cellule tumorali (34) e l'espressione eterogenea degli antigeni tumorali (5), potrebbero rendere ragione dei casi di mancata attività terapeutica dei CTL. Parametro più importante nel decorso clinico del NPC è l'andamento della carica virale di EBV, che ha una correlazione positiva con lo stadio della malattia ed è di importanza prognostica (37). La risposta virologica è stata misurata in 15

pazienti: è stata osservata una diminuzione nella carica virale nella maggioranza dei casi (10 pazienti, in 2 dei quali non è stato più possibile dimostrare la presenza del virus), nessuna variazione in 2 pazienti e un incremento in 3. Di questi ultimi, in un caso l'aumento di EBV DNA è stato verificato nelle 24 ore successive all'infusione ed è ascrivibile alla lisi delle cellule tumorali (14).

Linfoma di Hodgkin

Nonostante la maggior parte dei pazienti con linfoma di Hodgkin tragga beneficio dalla polichemioterapia (75% con lo schema ABVD) (6), l'alta percentuale di ricadute, fino al 40% dei pazienti, e la tossicità intrinseca della chemioterapia di seconda linea, rendono auspicabili nuovi approcci, tra i quali l'immunoterapia sembra essere promettente nei casi EBV-associati (40-50%) (27).

In particolare, la positività per EBV è associata significativamente con una prognosi peggiore nel caso di pazienti più anziani (29). Nonostante uno stato di relativa alterazione dell'immunità cellulo-mediata, CTL EBV-specifici sono stati riattivati con successo a partire da pazienti con linfoma di Hodgkin, sia in remissione che in ricaduta; queste linee CTL, al pari di quelle ottenute da donatori sani, contengono fino ad un 5% di linfociti LMP2-specifici (49) e sono dotate di una spiccata attività litica, diretta non solo verso le LCL ma anche verso bersagli cellulari esprimenti solo gli antigeni tumorali. È stato quindi possibile trattare con CTL autologhi EBV-specifici 31 pazienti, con stadi avanzati di malattia (1, 2, 49, 52). Come già descritto nel trattamento dei PTLD, grazie alla tecnica del gene-marking è stato possibile dimostrare non solo l'espansione, ma anche la permanenza dei linfociti infusi fino a 12 mesi e la localizzazione al sito tumorale (1). In generale, è stato riscontrato nella maggior parte dei pazienti un incremento dei precursori CTL specifici per il virus, sia per LMP2 che, meno frequentemente, per LMP1 (2). Inoltre, questi linfociti si sono dimostrati funzionali sia *ex vivo*, in test di citotossicità e in test di rilascio di citochine, sia *in vivo*, nel determinare una riduzione della carica virale nella quasi totalità dei casi studiati. Oltre a risposte virologiche e immunologiche, sono stati riportati anche quattro casi di remissione completa e risposte transienti nella maggioranza dei pazienti. La breve durata delle risposte indotte, ascrivibile, nel caso di CTL allogenei (39), alla rapida eliminazione da parte di risposte anti-donatore, nel caso di linfociti autologhi può in parte essere spiegata dal microambiente tumorale che ostacola, nonostante la presenza degli antigeni, l'espansione e la permanenza dei linfociti specifici.

Infatti le cellule maligne di Reed-Sternberg, pro-

ducendo fattori quali IL-10, TGF β e TARC, e l'infiltrato infiammatorio che le circonda, costituente il 99% della massa tumorale (30), creano un ambiente altamente sfavorevole per le risposte di tipo Th1, classicamente implicate nell'immunità anti-tumorale.

Infezione cronica attiva e linfoma a cellule NK/T

L'infezione cronica attiva (CAEBV) e il linfoma a cellule NK/T, più comuni in Giappone e in Asia Orientale che nel resto del mondo, sono accomunate dall'infezione di cellule NK e T da parte del virus e da un fenotipo di latenza II. La ridotta espressione antigenica e la scarsa immunogenicità delle cellule T ed NK permettono a queste di sfuggire al controllo immunitario in individui immunocompetenti e possono quindi rendere conto della scarsa risposta clinica all'immunoterapia.

L'infezione cronica attiva da EBV è un'eterogenea malattia EBV-correlata caratterizzata da sintomi cronici o ricorrenti simile a quelli della mononucleosi infettiva che possono comprendere linfadenopatie, febbre, epatosplenomegalia e pancitopenia. Tale sintomatologia deve persistere per più di 6 mesi e può essere gravata da gravi disfunzioni epatiche, cardiache o polmonari. Questi pazienti presentano elevati carichi di DNA di EBV circolante e titoli abnormemente elevati nei confronti di antigeni litici quali VCA ed EA. Nei casi relativi all'infezione cronica attiva severa (SCAEBV) (21, 32), in due dei tre pazienti trattati con CTL EBV-specifici, pur in assenza di un miglioramento dei sintomi, sono state comunque registrate delle risposte virologiche e immunologiche, anche se transienti e, in un caso, anche una diminuzione nel livello plasmatico di alcune citochine, quali TNF α , IL-1 β , IL-6. È da notare che nelle colture è stata descritta attività citotossica contro linee linfoblastoidi autologhe, ma non contro cellule NK o T EBV-infette, il target della terapia per SCAEBV. È quindi possibile che i risultati ottenuti nei test *in vitro* non siano predittivi di una reale attività *in vivo*, anche alla luce del fatto che in alcuni pazienti non sono stati riscontrati precursori CTL specifici per cellule NK infette, diversamente dai controlli sani (61). Esito diverso è stato invece riportato per pazienti con una forma meno aggressiva della malattia, più frequentemente riscontrata negli USA (54). In questo studio, 4 su 5 pazienti hanno sperimentato un miglioramento dei sintomi e la stabilizzazione della malattia fino a 3 anni dal termine del trattamento, a dispetto del progressivo deterioramento della qualità della vita comunemente descritto nel decorso di questa malattia. Inoltre, in quasi tutti i

casi, il pattern ed il titolo degli anticorpi anti-EBV (caratterizzato in corso di malattia da titoli elevati di anticorpi diretti contro gli antigeni capsidici e di fase precoce e dalla quasi totale assenza di anticorpi contro gli antigeni nucleari) si sono normalizzati, in concomitanza con un aumento, anche se inferiore rispetto ai controlli sani, dei precursori CTL EBV-specifici.

Nello studio relativo al linfoma extranodale a cellule NK/T (8), l'unico finora pubblicato, l'infusione si è dimostrata priva di effetti collaterali e, in due casi su tre, è stata registrata una risposta clinica, indicando che l'immunoterapia adottiva può costituire una possibile terapia alternativa nei casi di ricaduta, caratterizzati da una prognosi particolarmente sfavorevole. Nel caso di questo linfoma, è da sottolineare il recente riscontro di polimorfismi nelle sequenze codificanti LMP1 e LMP2 (44, 45) i quali, oltre ad avere un possibile ruolo nella tumorigenesi, potrebbero determinare la generazione di epitopi diversi da quelli generati a partire dal ceppo di laboratorio B95.8.

CONCLUSIONI

Il trattamento con CTL virus-specifici nel caso di malattie EBV-correlate è diventato, assieme ai CTL anti-melanoma, paradigmatico nel campo dell'immunoterapia adottiva, non solo per i risultati clinici ottenuti anche in pazienti refrattari alle terapie convenzionali, ma anche come proof-of-principle della validità dell'approccio stesso. Tuttavia, i successi più eclatanti sono stati riportati nel contesto di una malattia relativamente poco diffusa, il PTLD, e sono paragonabili a quelle ottenibili con farmaci pronti all'uso, quali il Rituximab (58). Questo, unitamente al fatto che sono richieste strutture dedicate e personale altamente specializzato, limita fortemente il diffondersi di questo tipo di trattamento, che pure si è dimostrato virtualmente privo di effetti collaterali. Si rende quindi necessaria una razionalizzazione dell'utilizzo dei CTL EBV-specifici, quale ad esempio la chiara determinazione della carica virale come elemento predittivo dello sviluppo della PTLD e della risposta alla terapia. Nell'ottica di una maggior diffusione di tale approccio, è stata creata ad Edimburgo una banca di CTL EBV-specifici allogenicici da donatore, che permette non solo di ridurre i tempi di accesso al trattamento, ma anche di superare il limite costituito dalla 'personalizzazione della terapia', ovvero una linea di CTL per ogni singolo paziente. Inoltre, il bersaglio dei CTL EBV-specifici è stato ampliato anche ad altre patologie correlate al virus oltre ai PTLD e sono attualmente in corso studi per superare le difficoltà intrinseche al trattamento di neoplasie, quali il carcinoma nasofa-

ringeo e il linfoma di Hodgkin, caratterizzate da una più ristretta espressione antigenica. L'ampliamento della specificità di riconoscimento antigenico può essere ottenuto tramite trasferimento genetico di appropriati T cell receptors negli effettori CTL o modificando geneticamente le LCL, in modo da far loro esprimere gli antigeni desiderati. Esempio di quest'ultimo approccio è il protocollo validato da Rooney e colleghi che ha portato con successo alla generazione e all'utilizzo *in vivo* di CTL specifici non solo per EBV, ma anche per l'adenovirus e il citomegalovirus, importanti cause di morbilità e mortalità negli individui immunocompromessi (35).

In definitiva, il successo che gli approcci di immunoterapia adottiva hanno avuto nell'ambito delle neoplasie EBV-correlate e, più recentemente, anche contro altre patologie neoplastiche, ne lascia intravedere un più ampio impiego in combinazione con altri trattamenti oppure, in un futuro, come valida alternativa alle terapie correntemente in uso. Va comunque sottolineato che il successo di tale nuovo approccio di immunoterapia non può prescindere dal contributo integrato di competenze tutte egualmente rilevanti, quali quelle dell'oncologo, dell'infettivologo, del microbiologo clinico e dell'immunologo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J.Exp.Med.* 2004; 200: 1623-33
2. Bollard CM, Gottschalk S, Huls MH, *et al.* In vivo expansion of LMP 1- and 2-specific T-cells in a patient who received donor-derived EBV-specific T-cells after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk.Lymphoma* 2006; 47: 837-42
3. Bollard CM, Gottschalk S, Leen AM, *et al.* Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumor-antigen presenting cells and T-lymphocyte transfer. *Blood* 2007; 110: 2838-45
4. Bollard CM, Rossig C, Calonge MJ, *et al.* Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood* 2002; 99: 3179-87
5. Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, *et al.* Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J.Virol.* 1992; 66: 2689-97
6. Cashen AF, Bartlett NL. Therapy of relapsed Hodgkin lymphoma. *Blood Rev.* 2007; 21: 233-43
7. Chan KC, Zhang J, Chan AT, *et al.* Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients. *Cancer Res.* 2003; 63: 2028-32
8. Cho HI, Hong YS, Lee MA, *et al.* Adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes for the treatment of angiocentric lymphomas. *Int.J.Hematol.* 2006; 83: 66-73
9. Chua D, Huang J, Zheng B, *et al.* Adoptive transfer of autologous Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for nasopharyngeal carcinoma. *Int.J.Cancer* 2001; 94: 73-80

10. Comoli P, Basso S, Labirio M, et al. T cell therapy of Epstein-Barr virus and adenovirus infections after hemopoietic stem cell transplant. *Blood Cells Mol.Dis.* 2008; 40: 68-70
11. Comoli P, De Palma R, Siena S, et al. Adoptive transfer of allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells with in vitro antitumor activity boosts LMP2-specific immune response in a patient with EBV-related nasopharyngeal carcinoma. *Ann.Oncol.* 2004; 15: 113-7
12. Comoli P, Labirio M, Basso S, et al. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood* 2002; 99: 2592-8
13. Comoli P, Maccario R, Locatelli F, et al. Treatment of EBV-related post-renal transplant lymphoproliferative disease with a tailored regimen including EBV-specific T cells. *Am.J.Transplant.* 2005; 5: 1415-22
14. Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R, et al. Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 8942-9
15. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 1999; 94: 2208-16
16. Dolcetti R. B lymphocytes and Epstein-Barr virus: the lesson of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Autoimmun.Rev.* 2007; 7: 96-101
17. Everly MJ, Bloom RD, Tsai DE, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder. *Ann.Pharmacother.* 2007; 41: 1850-8
18. Gottschalk S, Edwards OL, Sili U, et al. Generating CTLs against the subdominant Epstein-Barr virus LMP1 antigen for the adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies. *Blood* 2003; 101: 1905-12
19. Gottschalk S, Ng CY, Perez M, et al. An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs. *Blood* 2001; 97: 835-43
20. Gustafsson A, Levitsky V, Zou JZ, et al. Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cells. *Blood* 2000; 95: 807-14
21. Hagihara M, Tsuchiya T, Hyodo O, et al. Clinical effects of infusing anti-Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-lymphocytes into patients with severe chronic active EBV infection. *Int.J.Hematol.* 2003; 78: 62-8
22. Hansasuta P, Incomserb P, Buranapraditkun S, et al. Establishment of cytotoxic T lymphocytes specific for autologous Epstein-Barr virus in HIV-infected patients: the feasibility study of EBV-specific immunotherapy for patients with EBV-associated lymphoma. *J.Med.Assoc.Thai.* 2004; 87 Suppl 2: S146-51
23. Haque T, Amlot PL, Helling N, et al. Reconstitution of EBV-specific T cell immunity in solid organ transplant recipients. *J.Immunol.* 1998; 160: 6204-9
24. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 2007; 110: 1123-31
25. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, et al. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu.Rev.Immunol.* 2007; 25: 587-617
26. Huls MH, Rooney CM, Heslop HE. Adoptive T-cell therapy for Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's disease. *Acta Haematol.* 2003; 110: 149-53
27. Imashuku S, Goto T, Matsumura T, et al. Unsuccessful CTL transfusion in a case of post-BMT Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder (EBV-LPD). *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20: 337-40
28. Keegan TH, Glaser SL, Clarke CA, et al. Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 7604-13
29. Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: a cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? *Exp.Hematol.* 2006; 34: 399-406
30. Khanna R, Bell S, Sherritt M, et al. Activation and adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1999; 96: 10391-6
31. Kuzushima K, Yamamoto M, Kimura H, et al. Establishment of anti-Epstein-Barr virus (EBV) cellular immunity by adoptive transfer of virus-specific cytotoxic T lymphocytes from an HLA-matched sibling to a patient with severe chronic active EBV infection. *Clin.Exp.Immunol.* 1996; 103: 192-8
32. Lau KM, Cheng SH, Lo KW, et al. Increase in circulating Foxp3+CD4+CD25(high) regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients. *Br.J.Cancer* 2007; 96: 617-22
33. Lee SP. Nasopharyngeal carcinoma and the EBV-specific T cell response: prospects for immunotherapy. *Semin.Cancer Biol.* 2002; 12: 463-71
34. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat.Med.* 2006; 12: 1160-6
35. Li J, Zeng XH, Mo HY et al. Functional Inactivation of EBV-Specific T-Lymphocytes in Nasopharyngeal Carcinoma: Implications for Tumor Immunotherapy. *PLoS ONE* 2007; 2: e1122
36. Lin JC, Wang WY, Chen KY, et al. Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 2004; 350: 2461-70
37. Liu Z, Savoldo B, Huls H, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the prevention and treatment of EBV-associated post-transplant lymphomas. *Recent Results Cancer Res.* 2002; 159: 123-33
38. Lucas KG, Salzman D, Garcia A, et al. Adoptive immunotherapy with allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-lymphocytes for recurrent, EBV-positive Hodgkin disease. *Cancer* 2004; 100: 1892-901
39. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; 103: 1755-62
40. Masmoudi A, Toumi N, Khanfir A, et al. Epstein-Barr virus-targeted immunotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Treat.Rev.* 2007; 33: 499-505
41. Murray RJ, Kurilla MG, Brooks JM, et al. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J.Exp.Med.* 1992; 176: 157-68
42. Nagamine M, Kishibe K, Takahara M, et al. Selected

- amino acid change encoding Epstein-Barr virus-specific T cell epitope of the LMP2A gene in Japanese nasal NK/T cell lymphoma patients. *Intervirology* 2007; 50: 319-22
43. Nagamine M, Takahara M, Kishibe K, *et al.* Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Virus Genes* 2007; 34: 47-54
 44. Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am.J.Transplant.* 2004; 4: 222-30
 45. Pakakasama S, Eames GM, Morriss MC, *et al.* Treatment of Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease after hematopoietic stem-cell transplantation with hydroxyurea and cytotoxic T-cell lymphocytes. *Transplantation* 2004; 78: 755-7
 46. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, *et al.* Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.* 1994; 330: 1185-91
 47. Robertson KA, Usherwood EJ, Nash AA. Regression of a murine gammaherpesvirus 68-positive b-cell lymphoma mediated by CD4 T lymphocytes. *J.Virol.* 2001; 75: 3480-2
 48. Rooney CM, Bollard C, Huls MH *et al.* Immunotherapy for Hodgkin's disease. *Ann.Hematol.* 2002; 81 Suppl 2: S39-42
 49. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, *et al.* Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345: 9-13
 50. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, *et al.* Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 1998; 92: 1549-55
 51. Roskrow MA, Suzuki N, Gan Y, *et al.* Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease. *Blood* 1998; 91: 2925-34
 52. Savoldo B, Goss JA, Hammer MM, *et al.* Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Blood* 2006; 108: 2942-9
 53. Savoldo B, Huls MH, Liu Z, *et al.* Autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for the treatment of persistent active EBV infection. *Blood* 2002; 100: 4059-66
 54. Sherritt MA, Bharadwaj M, Burrows JM, *et al.* Reconstitution of the latent T-lymphocyte response to Epstein-Barr virus is coincident with long-term recovery from posttransplant lymphoma after adoptive immunotherapy. *Transplantation* 2003; 75: 1556-60
 55. Smets F, Latinne B, Bazin H, *et al.* Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T.cell response as a predictive marker of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 2002; 73: 1603-10
 56. Straathof KC, Bollard CM, Popat U, *et al.* Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes. *Blood* 2005; 105: 1898-904
 57. Taylor AL, Marcus R, Bradley JA. Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* 2005; 56: 155-67
 58. Tsai DE, Douglas L, Andreadis C, *et al.* EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: results of a two-arm prospective trial. *Am.J.Transplant.* 2008; 8: 1016-24
 59. Tsao L, Hsi ED. The clinicopathologic spectrum of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 2007; 131: 1209-18
 60. Tsuge I, Morishima T, Kimura H, *et al.* Impaired cytotoxic T lymphocyte response to Epstein-Barr virus-infected NK cells in patients with severe chronic active EBV infection. *J.Med.Virol.* 2001; 64: 141-8
 61. Wagner HJ, Cheng YC, Huls MH, *et al.* Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood* 2004; 103: 3979-81
 62. Weinstock DM, Ambrossi GG, Brennan C, *et al.* Preemptive diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37: 539-46
 63. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat.Rev.Cancer.* 2004; 4: 757-68