

## S.S. Immunoterapia Cellulare Personalizzata

### Analisi delle interazioni recettore/ligando che regolano l'attività anti-tumorale dei linfociti NK

*Linea di ricerca:* 2 – Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* b - Risposta immunitaria antitumorale: interazioni cellulari, fattori solubili e recettori

*Responsabile scientifico:* Daniela Pende

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* linfociti NK; recettori attivatori; ligandi; marcatori tumorali; leucemie

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Immunologia (M.C. Mingari, S. Martini); S.C. Oncologia Medica C (M. Ferrarini)

*Altri Enti coinvolti:* IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia (F. Locatelli); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Moretta, C. Cantoni, E. Lanino); Università degli Studi di Genova (A. Moretta, S. Marcenaro); Università di Catanzaro (E. Carbone)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute

#### *Background*

In seguito a trasformazione neoplastica, le cellule sovraesprimono molecole inducibili da stress, che possono rappresentare ligandi per recettori immunitari. Questo è stato dimostrato per le molecole MICA e ULBP, che sono ligandi di NKG2D, un recettore attivatorio espresso da linfociti NK e CTL. Nel nostro gruppo abbiamo dimostrato che CD155 e CD112 sono i ligandi di DNAM-1, un recettore attivatorio espresso da linfociti NK e T. Grazie a una serie di anticorpi monoclonali, prodotti anche dal mio gruppo di ricerca, abbiamo potuto studiare la regolazione della suscettibilità alla lisi NK di diverse cellule tumorali, sia linee tumorali di diverso istotipo sia cellule tumorali fresche, quali leucemie acute, neuroblastomi e mieloma multiplo. Abbiamo analizzato un pannello di leucemie acute mieloidi (AML) e linfoblastiche (ALL) per l'espressione di queste molecole descrivendo pattern diversi a seconda del tipo di leucemia. I blasti leucemici Nectina-2/PVR<sup>+</sup> erano chiaramente distinguibili fenotipicamente dalle cellule normali, dal momento che i linfociti sono sempre negativi per queste molecole. Rilevante è che abbiamo potuto correlare l'espressione in superficie di PVR e Nectina-2 sulle leucemie con un ruolo di DNAM-1 nell'indurre la loro lisi. Di conseguenza queste molecole rappresentano importanti marcatori funzionali. Recettori NK specifici che giocano un ruolo di primo piano nell'uccisione di cellule tumorali sono gli NCR (NKp46, NKp30 e NKp44). I ligandi tumorali di questi recettori sono ancora elusivi. Molto recentemente è stato descritto che un ligando di NKp30 è B7H6, che è espresso sulla membrana di diverse linee tumorali mentre è assente su cellule normali. L'espressione di B7H6, che correla con il binding di NKp30-Fc, è stata anche riscontrata su alcune neoplasie ematologiche alla diagnosi.

#### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Obiettivo generale del progetto consiste nell'applicare le nostre acquisizioni sulle interazioni recettore-ligando che regolano la citotossicità NK nei confronti di cellule tumorali per compiere una ricerca traslazionale, soprattutto nell'ambito delle neoplasie ematologiche. Le cellule tumorali verranno caratterizzate fenotipicamente valutando l'espressione di molecole che vengono up-regolate in seguito a trasformazione neoplastica e rappresentano ligandi dei recettori attivatori NK: MICA e ULBPs (i ligandi di NKG2D), e PVR e Nectina-2 (i ligandi di DNAM-1). Inoltre, tramite la produzione di anticorpi monoclonali, cercheremo di identificare nuovi marcatori di cellule tumorali, in particolare molecole funzionalmente rilevanti, quali nuovi ligandi di recettori attivatori dei linfociti NK. Di particolare interesse sono i ligandi degli NCR, che rappresentano recettori NK specifici cruciali nell'induzione della lisi della maggioranza delle cellule tumorali, tra cui anche le leucemie. Dal momento che è stato recentemente descritto che B7H6 è un ligando di NKp30 ed è espresso su diverse linee tumorali e anche su alcuni blasti leucemici, cercheremo di produrre anti-B7H6 mAb, immunizzando topi con appropriate linee tumorali descritte B7H6<sup>+</sup>. Come metodo di screening potrà essere utilizzato il trasfettante BW-B7H6, che sta cercando di ottenere la Dott.ssa C. Cantoni, con cui collaboriamo. In attesa di un mAb specifico, potremo valutare l'espressione di ligando di NKp30 tramite la molecola di fusione NKp30-Fc. Abbiamo lo scopo di studiare l'espressione di tutte queste molecole, ligandi di recettori attivatori NK, su un ampio pannello di leucemie, non solo ALL ma anche B-CLL, così come su linfomi a basso grado per meglio definire il loro valore diagnostico e prognostico. Confronteremo blasti leucemici all'esordio e alla ricaduta circa il pattern fenotipico e la suscettibilità alla lisi NK, per capire se avvengono dei processi di immunoselezione e meccanismi di escape immunologico, anche in seguito a trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore allogenico.

#### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

La ricaduta di queste ricerche in campo clinico-assistenziale è sicuramente di grande impatto, in quanto rientrano in una diagnostica avanzata e la nostra collaborazione con i clinici, specialmente nell'ambito dell'onco-ematologia, è intensa e costante. Abbiamo a disposizione anticorpi monoclonali, da noi prodotti, che possono avere una valenza diagnostica e prognostica nella classificazione di leucemie.

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

### *Risultati e prodotti 2009*

L'attività anti-tumorale dei linfociti NK è stata analizzata nel melanoma con due studi collaborativi, focalizzandosi sulle interazioni recettore/ligando rilevanti per questa funzione. In un primo studio (Lakshmikanth et al., J. Clin. Invest. 2009) è stato dimostrato che linee di melanoma derivate da metastasi linfonodali (LN) esprimono ligandi per i recettori attivatori NK quali NCR e DNAM-1, mentre mancano i ligandi di NKG2D. In confronto a linee di melanoma derivate da altri tipi di metastasi, quelle LN erano più suscettibili alla lisi NK e preferenzialmente "targettate" da linfociti NK trasferiti adottivamente in modello xenogenico di terapia cellulare. Quindi, DNAM-1 e NCR sono recettori critici per l'immunità naturale mediata dai linfociti NK nei confronti di cellule di melanoma e questi risultati forniscono un background per disegnare strategie immunoterapeutiche basate su cellule NK contro il melanoma e possibilmente altri tumori. Un secondo studio (Carrega et al. PLoS ONE 2009) ha dimostrato che linee di melanoma primarie erano efficacemente uccise da linfociti NK in un setting autologo ed è stato confermato che DNAM-1 e, tra gli NCR, NKp46 sono particolarmente coinvolti nell'indurre la lisi. Tramite test funzionali di degranolazione valutando singoli KIR, si è osservato che le molecole di HLA-classe I (che rappresentano KIR-ligandi) possono essere espresse sulle cellule di melanoma in quantità insufficiente per inibire la citotossicità NK. Inoltre, in seguito ad attivazione, anche linfociti NK che non esprimono recettori inibitori per le proprie molecole HLA-classe I e normalmente considerate anergiche possono invece anch'esse contribuire alla lisi delle cellule di melanoma.

I linfociti NK e le cellule dendritiche (DC) danno luogo a reciproche interazioni funzionali rilevanti per una corretta risposta immunitaria. Questa funzione è difettiva in pazienti con LDGL (malattia linfoproliferativa delle NK), nonostante che, come nei sani, DNAM-1 cooperi con NKp30 nell'indurre le NK a uccidere DC, rilasciare TNFalfa e promuovere maturazione DC (Balsamo et al. Exp. Hematol. 2009). È stato inoltre dimostrato che linfociti NK KIR+ co-coltivate con DC mature acquisiscono de novo l'espressione di CCR7, un recettore di chemochine che ha un ruolo di primo piano nell'indurre la migrazione delle NK nel linfonodo. Con lo studio dei cloni NK, si è visto che questo fenomeno avviene solo con NK alloreattive, con importanti implicazioni nel trapianto di cellule staminali emopoietiche, situazione in cui questi linfociti, se raggiungono organi linfoidi secondari, possono uccidere APC e T del ricevente, prevenendo così reazioni di trapianto verso l'ospite.

### *Pubblicazioni*

Balsamo M.- Zambello R.- Teramo A.- Pedrazzi M.- Sparatore B.- Scordamaglia F.- Pende D.- Mingari MC.- Moretta L.- Moretta A.- Semenzato G.- Vitale M.

Analysis of NK cell/DC interaction in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL): role of DNAM-1 and NKp30.

Exp Hematol. 37:1167/75, 2009

Carrega P.- Pezzino G.- Queirolo P.- Bonaccorsi I.- Falco M.- Vita G.- Pende D.- Misefari A.- Moretta A.- Mingari MC.- Moretta L.- Ferlazzo G.

Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells.

PLoS One. Dec 4;4(12):e8132, 2009

Lakshmikanth T.- Burke S.- Ali TH.- Kimpfler S.- Ursini F.- Ruggeri L.- Capanni M.- Umansky V.- Paschen A.- Sucker A.- Pende D.- Groh V.- Biassoni R.- Höglund P.- Kato M.- Shibuya K.- Schadendorf D.- Anichini A.- Ferrone S.- Velardi A.- Kärre K.- Shibuya A.- Carbone E.- Colucci F.

NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo.

J Clin Invest. 119:1251/63, 2009

Marcenaro E.- Cantoni C.- Pesce S.- Prato C.- Pende D.- Agaugué S.- Moretta L.- Moretta A.

Uptake of CCR7 and acquisition of migratory properties by human KIR+ NK cells interacting with monocyte-derived DC or EBV cell lines: regulation by KIR/HLA-class I interaction.

Blood.114:4108/16, 2009

### *Attività previste e risultati attesi nel 2010*

L'analisi di espressione dei diversi ligandi per i vari recettori attivatori NK come anche delle molecole di HLA-classe I verrà continuata nell'ambito sia di neoplasie ematologiche sia di tumori di diverso istotipo ampliando così le casistiche. Queste analisi fenotipiche verranno correlate con le analisi funzionali valutando la suscettibilità alla lisi NK. Si cercherà di definire anche il valore diagnostico e prognostico di alcune molecole che possano essere espresse in modo diverso dalle cellule normali. Di particolare interesse sarà lo studio comparato di blasti leucemici alla diagnosi e alla recidiva, eventualmente pre- o post-trapianto di cellule staminali emopoietiche. Nel caso si osservino delle modificazioni del pattern di espressione molecolare, verrà valutato se si possa ipotizzare l'intervento di un'immuno-selezione NK-mediata e meccanismi di escape. Cloni NK con definiti pattern di espressione di KIR verranno testati contro blasti leucemici sia AML che ALL, derivati da pazienti con aplotipo HLA- classe I noto, per valutare se esiste un differente coinvolgimento recettoriale a seconda del tipo di cellula target.

### **Modelli diagnostici e terapeutici basati sulle cellule NK per il trattamento di neoplasie ematologiche**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

*Responsabile scientifico:* Daniela Pende

# Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* linfociti NK; KIR; recettori attivatori; ligandi; leucemie; linfomi

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Immunologia (M.C. Mingari, S. Martini)

*Altri Enti coinvolti:* IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia (F. Locatelli); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Moretta, M. Falco, E. Lanino); Università degli Studi di Genova (A. Moretta, S. Marcenaro); Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, Firenze (M. Aricò); Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge, UK (G.M. Griffiths)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute

## *Background*

I linfociti NK sono importanti effettori dell'immunità innata e funzionalmente sono caratterizzati dalla produzione di citochine infiammatorie (IFN-gamma e TNF-alfa) e da una citotossicità soprattutto di tipo perforino-dipendente. Queste cellule sono regolate nella loro funzione effettrice da recettori inibitori, quali i KIR, specifici per gruppi di alleli HLA classe I (ligandi KIR), e da CD94/NKG2A che riconosce HLA-E. La funzione delle cellule NK è poi regolata positivamente da diversi recettori attivatori (NCR, NKG2D, 2B4, DNAM-1) che, stimolati da opportuni ligandi, promuovono la citolisi delle cellule che li esprimono. Grazie a una serie di anticorpi monoclonali, prodotti anche dal mio gruppo di ricerca, abbiamo potuto studiare la regolazione della suscettibilità alla lisi NK di cellule tumorali di diverso istotipo e, più recentemente, di leucemie. Dall'analisi di numerose leucemie si è dimostrata la rilevanza dell'espressione di PVR e Nectina-2 (ligandi di DNAM-1) per la suscettibilità alla lisi NK. Numerose evidenze cliniche e sperimentali hanno dimostrato che il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-TCSE) deve larga parte della sua efficacia ad un'azione immunologica svolta dai linfociti NK del donatore verso la leucemia (attività GvL). Questo si spiega con il fatto che, se i linfociti NK interagiscono con cellule allogeniche, è possibile che uno o più KIR non riconoscano il loro ligando (incompatibilità KIR/HLA) e quindi risultino alloreattivi. La sottopopolazione alloreattiva di cellule NK del donatore, capace di uccidere la leucemia, può essere predetta analizzando gli aplotipi HLA classe I sia nel donatore che nel ricevente ed è possibile identificarla sulle NK tramite analisi citofluorimetrica combinando opportunamente diversi anticorpi monoclonali.

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Obiettivo generale del progetto consiste nell'applicare le nostre acquisizioni sulle interazioni recettore-ligando che regolano la citotossicità NK nei confronti di cellule tumorali per compiere una ricerca traslazionale di diagnostica e immunoterapia basata su cellule NK, soprattutto nell'ambito delle neoplasie ematologiche. Queste ricerche verranno applicate in due diversi contesti clinici.

- Valutazione di casi di pazienti leucemici dell'età pediatrica che ricevono allo-TCSE in particolare da donatore aploidentico (aplo-TCSE). Nei casi con incompatibilità KIR/HLA verrà identificata la sottopopolazione NK alloreattiva presente nel donatore e, qualora possibile, un confronto di più donatori verrà effettuato al fine di scegliere quello con maggiore potenzialità di attuare una GvL in seguito al trapianto. Verranno analizzati i pazienti dopo ricostituzione immunologica dal trapianto valutando il repertorio NK e in particolare se la sottopopolazione alloreattiva viene mantenuta nel tempo. Parallelamente sarà possibile analizzare la capacità litica delle cellule NK nei confronti sia dei blasti leucemici che di linee cellulari B-EBV esprimenti lo stesso aplotipo HLA del paziente. I blasti leucemici saranno anche studiati fenotipicamente per l'espressione dei ligandi noti dei recettori attivatori, che correla con la suscettibilità alla lisi NK-mediata. Queste analisi saranno correlate con il decorso clinico dei pazienti per valutare l'impatto della presenza di cellule NK alloreattive originate dalle cellule staminali del donatore nel prevenire la ricaduta leucemica. Inoltre, qualora i linfociti NK del donatore risultino favorevoli come alloreattività e attività anti-leucemica, sarà possibile utilizzare queste cellule attivate in vitro con IL-2 per approcci immunoterapici finalizzati a contrastare eventuali recidive leucemiche. Verranno anche valutati casi di aplo-TCSE senza incompatibilità KIR/HLA per capire se un particolare repertorio KIR, in particolare considerando la presenza di KIR attivatori, correla con il decorso clinico in quanto a ricaduta leucemica e presenza di infezioni. È stato descritto che i trapianti in cui la madre è il donatore hanno un decorso più favorevole rispetto agli altri aplo-TCSE con diversi donatori. Verrà valutata la presenza di cellule NK con attività anti-leucemica possibilmente per identificare marcatori rilevanti e capire se i linfociti NK oppure i T materni sono coinvolti nell'attività GvL.

- Un altro obiettivo di questo progetto è lo studio di pazienti affetti da linfocitopenia emofagocitica familiare (FHL) in cui è costantemente riportato un difetto dell'attività citotossica. Per una parte dei casi questo difetto è stato dimostrato dipendere da deficit di perforina (mutazioni del gene PRF1), definendo il sottogruppo FHL2, oppure da anomala esocitosi dei granuli citotossici (mutazioni del gene Munc13-4), definendo il sottogruppo FHL3. Il contributo del nostro gruppo consiste nella messa a punto di test diagnostici che possano prontamente indirizzare verso l'identificazione del tipo di anomalia e quindi del gene da studiare per le mutazioni. Inoltre studieremo linfociti NK derivati dai casi con difetti ancora non noti, nel tentativo di rivelare anomalie nelle loro funzioni alla scoperta di nuovi geni-malattia. Alcuni pazienti che hanno sviluppato linfomi e leucemie sono stati descritti avere mutazioni mono- e bi-alleliche del gene della perforina suggerendo che la perforina gioca un ruolo fondamentale nei meccanismi di immuno-sorveglianza che previene la crescita e/o lo sviluppo tumorale. La terapia dei pazienti con FHL è rappresentata da allo-TCSE per poter ripristinare una corretta risposta citotossica. In attesa del trapianto è possibile prospettare una immunoterapia basata su cellule NK di supporto a questa immunodeficienza.

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

La ricaduta di queste ricerche in campo clinico-assistenziale è sicuramente di grande impatto, in quanto rientrano in una diagnostica avanzata e la nostra collaborazione con i clinici, specialmente nell'ambito dell'onco-ematologia, è intensa e costante. Nello specifico:

- E' già in atto una collaborazione con l'Oncoematologia Pediatrica dell'IRCCS S. Matteo di Pavia, per cui forniamo una consulenza sul repertorio NK di donatori di cellule staminali emopoietiche per selezionare quello con maggiore potenzialità di attuare una GvL in seguito al trapianto.
- Tramite opportuni test immunologici, siamo coinvolti nella diagnostica della FHL orientando verso specifici test genetici, che sono svolti e coordinati dall'Oncoematologia Pediatrica del Meyer di Firenze.
- Si sta cercando di mettere a punto le procedure per una immunoterapia basata sulle cellule NK di supporto al trapianto per i pazienti leucemici e per i pazienti FHL.

### *Risultati e prodotti 2009*

- In collaborazione con l'Oncoematologia Pediatrica dell'IRCCS S. Matteo di Pavia, sono stati studiati trapianti di cellule staminali emopoietiche da donatori aploidentici (aplo-TCSE) NK alloreattivi in pazienti pediatriche affetti da leucemia. La sopravvivenza libera da malattia nei riceventi di aplo-TCSE da donatore NK-alloreattivo è risultata pari al 65%, a differenza del 33% nei pazienti trapiantati con un donatore NK-non alloreattivo. Abbiamo fatto notevoli progressi nella rapida caratterizzazione genetica del repertorio KIR (anche a livello allelico) e nella capacità di discriminare fenotipicamente KIR attivatori da KIR inibitori che ci hanno portato ad una sempre più precisa analisi della sottopopolazione NK alloreattiva funzionalmente rilevante. E' stato dimostrato che linfociti NK alloreattivi emergono precocemente (2 mesi) e persistono anche dopo anni dal trapianto. Si è anche evidenziato che il decorso favorevole del trapianto correla con la grandezza del subset alloreattivo NK e con la presenza di particolari KIR attivatori in un determinato assetto di alleli HLA-I, soprattutto nei casi di ALL piuttosto che AML. Questi risultati forniscono nuove informazioni sull'alloreattività NK in aplo-TCSE e possono essere di grande impatto sulla selezione di donatori ottimali per esercitare l'attività anti-leucemica (Pende D. et al., Blood 2009; Moretta A. et al., Clin. Exp. Immunol. 2009; Locatelli F. et al., Clin. Immunol. 2009; Moretta L. et al., Tissue Antigens in press).
- In collaborazione con il Meyer di Firenze e il Gaslini di Genova, sono stati studiati più di 40 pazienti con sospetta linfocitocitosi emofagocitica per valutare se si rivelassero difetti dell'attività citotossica. A tal fine viene seguito un algoritmo diagnostico, che si avvale di una serie di tests indicativi per evidenziare i diversi tipi di difetti, relativi a distinti geni che possono essere mutati nei pazienti con FHL e quindi indirizzare verso un'analisi genetica mirata. In questa serie di pazienti è stato identificato un caso con mutazione del gene Munc18-2, che è stato scoperto essere un nuovo gene-malattia da due gruppi di ricerca, solo molto recentemente nel 2009. Per questo algoritmo diagnostico noi siamo il gruppo di riferimento in Italia e stiamo collaborando con altri centri europei per standardizzare le procedure ed avere un protocollo unitario.

### *Pubblicazioni*

Locatelli F.-Pende D.-Maccario R.-Mingari M.C.-Moretta A.-Moretta L.

Haploidentical hemopoietic stem cell transplantation for the treatment of high-risk leukemias: how NK cells make the difference.

Clin. Immunol. 133:171/178, 2009

Moretta A.-Pende D.-Locatelli F.-Moretta L.

Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias.

Clin. Exp. Immunol. 157:325/331, 2009

Moretta L.-Locatelli F.-Pende D.-Mingari M.C.-Moretta A.

Natural killer alloeffector responses in haploidentical hemopoietic stem cell transplantation to treat high-risk leukemias.

Tissue Antigens Epub Dec 9, 2009

Pende D.-Marcenaro S.-Falco M.-Martini S.-Bernardo M.E.-Montagna D.-Romeo E.-Cognet C.-Martinetti M.-Maccario R.-Mingari M.C.-Vivier E.-Moretta L.-Locatelli F.-Moretta A.

Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity.

Blood 113:3119/3129, 2009

### *Attività previste e risultati attesi nel 2010*

- Ci si propone di meglio caratterizzare la popolazione NK alloreattiva al fine di riuscire a migliorare i criteri di selezione dei donatori di aplo-TCSE per la cura delle leucemie pediatriche. A questo scopo verranno valutati nuovi donatori sia a livello genotipico che a livello fenotipico e i dati ottenuti con questi due tipi di approccio saranno integrati e confrontati.
- Verrà aumentata la casistica e i tempi di follow-up di questi trapianti per raggiungere evidenze statisticamente più significative sull'impatto dei linfociti NK alloreattivi nella clinica.
- Inizierà inoltre uno studio retroattivo che si propone di analizzare coppie donatore/ricevente che non presentano da un punto di vista teorico popolazioni NK alloreattive. Lo scopo è valutare se la presenza di KIR attivatori possa influenzare favorevolmente l'andamento del trapianto misurato in termini d'attecchimento, incidenza d'infezioni virali post-trapianto e comparsa di recidiva.
- Verranno effettuati studi pre-clinici per purificare e attivare linfociti NK in condizioni GMP. In seguito, procedure per un'immunoterapia basata sulle cellule NK saranno preparate insieme ai clinici di riferimento.