

## S.S. Infettivologia

### Studio di fattori predittivi la risposta a terapia antivirale HCV associati alla funzione immunitaria innata

*Linea di ricerca:* 1 – Prevenzione e Cancerogenesi

*Programma:* e- Prevenzione primaria e chemioprevenzione

*Responsabile scientifico:* Andrea de Maria

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* HCV; interferone alfa; genotipo Ia-Ib; cellule NK; natural cytotoxicity receptors; killer inhibitory receptors

*Altri Enti coinvolti:* Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, DIMI, Università di Genova (A. Picciotto)

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse:* prevenzione primaria/secondaria

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR

#### *Background*

In seguito ad infezione acuta con HCV, il 70-80% dei soggetti sviluppa infezione cronica persistente, mentre il 20% dei soggetti sviluppa risposta immune efficace ed elimina l'infezione. I pazienti infettati cronicamente con HCV hanno un rischio significativamente superiore alla popolazione non infetta di sviluppare neoplasia epatica e di andare incontro a cirrosi epatica. Il trattamento per HCV è attualmente rappresentato da associazione di PEG-IFN+RBV da somministrarsi per 12 mesi. Il trattamento permette di rimuovere la replicazione virale cronica normalizzando il rischio di evoluzione ad epatocarcinoma. Effetti avversi in corso di trattamento sono frequenti e contribuiscono a ridurre la qualità della vita dei pazienti, per tutto il periodo in cui questa deve essere somministrata. La percentuale di pazienti con risposta virologica sostenuta tuttavia è soltanto di circa il 30% con HCV genotipo I e del 15-18% se coesistono fattori che contribuiscono a determinare difetto immunologico (es. HIV-1). La valutazione di efficacia terapeutica viene attualmente eseguita nel corso delle prime 12 settimane di trattamento. Sono possibili (circa il 50%) risposte transitorie virologiche, non sostenute dopo la sospensione del trattamento. Esiste attualmente una notevole carenza di indicatori clinici, biologici o molecolari che permettano di identificare a priori quei pazienti eleggibili per il trattamento (da considerarsi profilassi di cirrosi epatica ed epatocarcinoma), che non avranno risposte sostenute alla terapia antivirale. L'identificazione di possibili strumenti diagnostici per identificare tali pazienti prima dell'inizio di terapie costose da un punto di vista biologico, emotivo ed economico rappresenta un primo passo verso una successiva identificazione di strategie terapeutiche individualizzate.

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

Primario: identificare parametri predittivi immunologici di risposta a terapia anti HCV.

Secondario: caratterizzare parametri potenzialmente predittivi di progressione neoplastica ad epatocarcinoma.

#### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Impatto assistenziale trasferibile mediante indagini immunologiche routinarie.

#### *Risultati e prodotti 2009*

In collaborazione con il centro di epatologia del DIMI, Università di Genova, è in corso l'analisi di fenotipo e funzione delle cellule NK periferiche in pazienti HCV viremici prima dell'inizio di terapia antivirale (interferone alfa+ribavirina). I pazienti arruolati e seguiti presso tale centro e presso la S.S. Infettivologia nell'ambito di programmi terapeutici regionali finalizzati al trattamento dell'infezione HCV e delle sue complicanze, sono finora 40. Di questi, 20 sono di genotipo 1, ed hanno completato l'arruolamento e la terapia specifica.

L'analisi citofluorimetrica del fenotipo e funzione NK ha mostrato differenze basali rilevanti a carico dei recettori attivatori delle cellule NK, una differente capacità di modulazione dei recettori in vivo in corso di terapia con IFNalfa, ed una parallela modulazione in vitro su cellule NK purificate e coltivate in vitro.

Sono in fase di ultimazione le analisi per la produzione di IL-12 da parte di cellule dendritiche circolanti in corso di terapia ed in condizioni basali.

La valutazione preliminare depone per una presenza di differente assetto regolatorio innato in pazienti con infezione HCV cronica, a seconda della risposta virologica alla terapia standard con peg-IFNa+RBV.

Tali elementi potrebbero far pensare alla possibilità di prevedere la risposta a terapia sulla base della modalità di regolazione delle cellule NK circolanti nel singolo paziente.

E' stata valutata una coorte di pazienti con tubercolosi polmonare all'esordio per verificare se meccanismi simili possano sottendere alla cronicizzazione/riattivazione di patogeni intracellulari. Nei casi di mycobacterium tuberculosis hominis si è potuto notare che alterazioni delle cellule NK con riduzione della produzione di IFNgamma specifica e riduzione di recettori della citotossicità naturale (NCR) sono presenti all'esordio sulle cellule NK circolanti. Tali dati suggeriscono che l'esordio/riattivazione di TB polmonare sia associata ad un precedente, o concomitante, difetto NK.

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Tale deficit è solo in parte recuperato nel corso dei sei mesi di terapia antitubercolare che seguono la diagnosi di riattivazione tubercolare.

E' stata avviata la ricerca di pazienti per poter studiare l'assetto NK cellulare in corso di epatocarcinoma, nell'ambito di una collaborazione con l'Oncologia Medica A dell'IST. I pazienti finora arruolati sono 4, e si prevede di proseguire l'arruolamento attingendo a coorti eventualmente di altri istituti, al fine di poter confrontare l'assetto immune innato fra HCC-HCV, pazienti con HCV cronico non HCC, e pazienti con alti fattori di rischio per HCC (es.HBV, EtOH).

### *Pubblicazioni*

Biassoni R.-Ugolotti E.-De Maria A.  
NK cell receptors and their interactions with MHC.  
Curr. Pharm. Des. 15(28):3301-3310, 2009

Bozzano F.-Costa P.-Passalacqua G.-Dodi F.-Ravera S.-Pagano G.-Canonica G.W.-Moretta L.-De Maria A.  
Functionally relevant decreases in activatory receptor expression on NK cells are associated with pulmonary tuberculosis in vivo and persist after successful treatment.  
Int. Immunol. 21(7):779-791, 2009

Costa P.-Bozzano F.-Fenoglio D.-Beltrame A.-Cenderello G.-Di Biagio A.-Ferrea G.-Pagano G.-De Maria A.  
Conserved T cell and natural killer cell function in treatment-experienced adults receiving tenofovir plus didanosine as nucleoside reverse transcription inhibitor backbone.  
Clin. Exp. Immunol. 158(1):55-63, 2009

Costa P.-Sivori S.-Bozzano F.-Martini I.-Moretta A.-Moretta L.-De Maria A.  
IFN-alpha-mediated increase in cytolytic activity of maturing NK cell upon exposure to HSV-infected myelomonocytes.  
Eur. J. Immunol. 39(1):147-158, 2009 - Erratum in: Eur. J. Immunol. 39(3):912, 2009

De Maria A.-Ugolotti E.-Rutjens E.-Mazza S.-Radic L.-Faravelli A.-Koopman G.-Di Marco E.-Costa P.-Ensoli B.-Cafaro A.-Mingari M.C.-Moretta L.-Heeney J.-Biassoni R.  
NKp44 expression, phylogenesis and function in non-human primate NK cells.  
Int. Immunol. 21(3):245-255, 2009

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

Le attività proseguiranno nel corso del 2010, completando la valutazione sulla prima coorte di 20 pazienti HCV cronici. Verranno poi analizzati 20 pazienti con genotipi non-1, falliti a terapia standard, al fine di chiarire se gli elementi suggestivi per non risposta ad HCV-1 siano condivisi da pazienti con infezione non HCV-1 e falliti a terapia. Si proseguirà ultimando lo studio sulla regolazione di NCR e di NK in schimpanze, che serve come modello di inducibilità di NCR. Tali risultati serviranno per confrontare i risultati sulla regolazione NCR in pazienti con HCV cronica. Saranno infine proseguiti gli arruolamenti sulla coorte di pazienti con HCC-HCV, al fine di identificare parametri che possano permettere un confronto con HCV cronico prima dello sviluppo di HCC.

### **Valutazione dell'effetto della vaccinazione anti-influenzale nei pazienti con Linfoma Non Hodgkin in risposta completa precedentemente trattati con Rituximab**

*Linea di ricerca:* 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* d - Assistenza ai pazienti neoplastici: aspetti clinici e gestionali

*Responsabile scientifico:* Andrea de Maria

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* NHL; influenza virus; vaccinazione; risposta anticorpale; rituximab; sieroprotezione

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Oncologia Medica C (M. Ferrarini); S.C. Oncologia Medica B (M.R.. Sertoli, F. Boccardo, D. Bedognetti); S.S. Malattie Linfoproliferative (S. Zupo)

*Altri Enti coinvolti:* DISSAL, Sezione di Igiene e Medicina Preventiva, Università di Genova (G. Icardi, F. Ansaldi)

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica sperimentale

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

### *Background*

Attualmente è noto che i pazienti con Linfoma hanno un difetto nel generare una adeguata risposta anticorpale contro patogeni.

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Piccoli studi hanno dimostrato che i pazienti con Linfoma precedentemente trattati con chemioterapia riescono a montare, in seguito alla vaccinazione influenzale, una risposta umorale adeguata contro tale virus. Per tale motivi a questi pazienti è consigliata la vaccinazione contro i patogeni stagionali, come, ad esempio, il virus influenzale.

Il Rituximab, anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene CD 20 delle cellule neoplastiche dei Linfomi a cellule B, agendo pure sui Linfociti B normali, causa uno stato di immunodepressione, teoricamente transitorio. Non vi sono tuttavia dati in letteratura in merito alla capacità dei pazienti precedentemente trattati con Rituximab (o Rituximab e chemioterapia) di montare una adeguata risposta umorale in seguito a vaccinazione influenzale.

Ci si propone pertanto, in collaborazione con il Centro di epatologia del DIMI, Università di Genova, di analizzare la tipologia di fenotipo e funzione delle cellule NK periferiche in pazienti HCV viremici prima dell'inizio di terapia antivirale (interferone alfa+ribavirina). I pazienti sono arruolati e seguiti presso tale centro nell'ambito di programmi terapeutici regionali finalizzati al trattamento dell'infezione HIV e delle sue complicanze.

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

Lo scopo dello studio è quello di valutare l'attività della vaccinazione influenzale nei pazienti con Linfoma Non Hodgkin a cellule B in risposta completa, precedentemente trattati con Rituximab. In particolare l'evidenza di una adeguata risposta umorale confermerebbe la pratica clinica consigliata attualmente di vaccinare questi pazienti con il vaccino antiinfluenzale.

Viceversa il riscontro di una anergia, relativa od assoluta, porrebbe le basi per indicare la necessità di effettuare profilassi antiinfluenzale alternativa, ad esempio con antivirali commercialmente disponibili.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Impatto assistenziale trasferibile mediante indagini immunologiche routinarie, ed applicazione ai pazienti stessi in studio in annate successive. Trasferimento del modello di follow-up sul territorio.

### *Risultati e prodotti 2009*

Nel corso del 2009 sono stati analizzati i campioni di plasma aliquotati in occasione della vaccinazione.

Sono stati determinati mediante HAI i titoli sierici pre- e post vaccinazione nel gruppo di controllo e nel gruppo di pazienti con LNH in RC dopo trattamento comprendente CT+ rituximab da almeno 6 mesi.

Sono state assunte le seguenti definizioni: sieroprotezione: % di soggetti che raggiungono titolo anti-emoagglutinina  $\geq 40$ IU. Sieroconversione: % di soggetti che mostrano aumento di titolo di almeno 4x se erano sieropositivi al basale, e di almeno 40IU se il titolo basale era  $< 10$ IU.

Sono stati valutati 31 pazienti dei 37 arruolati, in seguito alla verifica di assenza di RC in 3 casi e di trattamento con rituximab  $< 3$  mesi in 3 casi. Sono stati valutati 34 controlli sani vaccinati come gruppo di controllo. I due gruppi erano equilibrati per sesso ed età media e per recenti vaccinazioni antiinfluenzali nelle stagioni precedenti.

Alla vaccinazione i pazienti con LNH ed istologia aggressiva erano 58%; nel 26% dei casi avevano ricevuto CT contenente fludarabina; una singola linea di CT nell'84% dei casi. Il 58% dei pazienti avevano ridotte concentrazioni di almeno una sottoclasse immunoglobulinica.

La sieroprotezione, sieroprotezione ed aumento medio di titolo ai 3 antigeni vaccinali influenzali risultavano significativamente ridotti nei pazienti per quanto concerne H3N2. Risultavano ridotti la sieroprotezione ed aumento medio di titolo all'antigene H1N1, ed era significativamente depressa la sieroprotezione ed aumento medio di titolo a B HBNB.

Si sono registrate 4 ILI (influenza-like-illness) nei pazienti, e nessun caso di ILI fra i controlli vaccinati nella stagione invernale ( $p < 0.05$ ). Analisi citofluorimetrica in tutti i pazienti ha potuto dimostrare che tale mancata risposta alla vaccinazione nel gruppo di pazienti era associata, e probabilmente dovuta, a riduzione di linfociti B memoria circolanti. In conclusione i pazienti con LNH in RC dopo CT contenente Rituximab hanno un difetto di risposta a vaccinazione antiinfluenzale. E' necessaria sorveglianza accurata dopo vaccinazione con monitoraggio dei titoli ed identificazione tempestiva di ILI.

### *Pubblicazioni*

Bedognetti D. et al. Ref.: Ms. No. IJHM-D-10-00016

Relevance of HBV/HBcAb screening in Lymphoma Patients treated in the Rituximab Era.

International Journal of Hematology, in press

### *Presentazioni a congressi*

Bedognetti D.-Zoppoli G.-Massucco C.-Zupo S.-Sertoli M.R.-Ferrarini M.-Zanardi E.-Provinciali N.-Siffredi G.-Caltabiano G.-Ghio R.-Nencioni A.-Messina M.-Racchi O.-Bruzzzone A.-Sabatino M.-Marincola F.-Ascierto M.L.-Uccellini L.-Pos Z.-Ansaldi F.-De Maria A.

Patients Treated with Rituximab-Containing Immunochemotherapy Have a Significant and Prolonged Lack of Humoral Response to Influenza Vaccine Associated with a Persistent Depletion of B Memory Cells.

51st ASH annual meeting of the American Society of Hematology (ASH), New Orleans LA, December 5th -8th, 2009. Oral Presentation. Proc.: Blood 2009; 114(22):386 (Abstract 936)

Bedognetti D.-Zoppoli G.- Massucco C.-Zupo S.-Sertoli M.R.-Zanardi E.-Messina M.-Siffredi G.-Bruzzzone A.-Balleari E.-Ferrarini M.-Nencioni A.-Caltabiano G.-Provinciali N.-Racchi O.-Ferraris A.M.-Blandini P.-Boccardo F.-Sticchi L.-Icardi G.-Marincola F.-Bacilieri S.-Ansaldi F.-De Maria A.

Impaired humoral response to influenza vaccine and prolonged B memory cell depletion as a consequence of Rituximab-based immuno-chemotherapy in non-Hodgkin lymphoma patients.

24th annual meeting of the International Society for the Biological Therapy of Cancer (ISBTc), Washington DC, October 28th-31st 2009. J Immunother - 32(9): 992, 2009.

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

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

Nel corso del 2010 sarà redatto e sottomesso il lavoro definitivo relativo alla stagione 2008-2009.

Saranno completate le analisi avviate nella stagione 2009-2010 concernenti lo stesso gruppo di pazienti, con analisi comparativa della risposta a vaccinazione antiinfluenzale stagionale e a vaccinazione antiinfluenzale pandemica (c.d."suina"), già avviate nell'autunno 2009.

Inoltre verranno prese in considerazione le analisi dei dati acquisiti per quanto riguarda l'immunità adattiva ed innata di questi pazienti in occasione della vaccinazione. Lo scopo di questa valutazione sarà di evidenziare eventuali associazioni di squilibri periferici di subset cellulari al difetto di linfociti B memory, e di poter eventualmente stabilire a priori quali pazienti siano a maggior rischio di sviluppare infezione influenzale malgrado vaccinazione.