



XLIX
CONGRESSO
NAZIONALE
AIEOP

**Infusione di linfociti T della
memoria (CD45RA-depleti)
combinata con l'infusione di
cellule NK allogeniche per
combattere con successo la
malattia linfoproliferativa
post-trapianto EBV-positiva:
Un caso clinico.**

Stefania Braidotti

IRCCS Materno Infantile Burlo Garofolo, Trieste

Bologna, 1 Ottobre 2024



La sottoscritta Stefania Braidotti

*ai sensi dell'art. 3.3 sul Conflitto di Interessi, pag. 17 del Reg. Applicativo dell'Accordo Stato-
Regione del 5 novembre 2009,*

dichiara

*che negli ultimi due anni NON ha avuto rapporti diretti di finanziamento con soggetti portatori di
interessi commerciali in campo sanitario*



IRCCS materno infantile Burlo Garofolo
Regione Friuli Venezia Giulia



Oncoematologia

Direttore di struttura complessa : Dott. Marco Rabusin

Trapianto di midollo e Terapie cellulari

Dirigente Responsabile : Dott.ssa Natalia Maximova

- **Programma Trapianti CSE all'interno della SC Oncoematologia**, a cui afferiscono l'Unità Clinica e l'Unità di Raccolta della CSE midollari;
- Centro unico regionale di riferimento clinico per **trapianti di cellule staminali emopoietiche (CSE) allogeniche e autologhe** e di **terapia cellulare in ambito pediatrico**;
- Centro nazionale riconosciuto da **AIEOP-Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica** (n. 501) e **centro regionale** secondo le DGR 929/2015 e 1446/2021;
- Accreditamento **GITMO-CNT** (*Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo-Centro Nazionale Trapianti*);
- Programma Trapianti CSE è certificato dall' *European Society for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) ai sensi degli **Standard JACIE**, con certificato n. 870 del 11/03/2020.



Febbraio 2023, rinnovate le procedure di:

- trapianto allogenico da donatore aploidentico
- terapia cellulare post trapianto



Miltenyi Biotec



Associazione
Genitori
Malati
Emopatici
Neoplastici



- **Sistema chiuso *all-in-one***
- **Automatizzato**
- **Manipolazione cellulare**
 - semplice (arricchimento, deplezione cellulare)
 - estensiva (attivazione, espansione, CAR...)
- ✓ **Produzione GMP-compliant**
- ✓ **Elevata standardizzazione del prodotto finale, pronto all'uso**
- ✓ **Riproducibilità**
- ✓ **Terapia personalizzata**

IRCCS materno infantile Burlo Garofolo
Regione Friuli Venezia Giulia



Oncoematologia

Direttore di struttura complessa : Dott. Marco Rabusin

Trapianto di midollo e Terapie cellulari

Dirigente Responsabile : Dott.ssa Natalia Maximova



Riattivazione virale di almeno un virus post-HSCT in circa 90% dei riceventi

FATTORI DI RISCHIO:

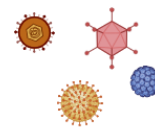
Grado di immunosoppressione

Durata dell'immunodeficienza

- ✓ Intensità del regime di condizionamento
- ✓ Età e immunità del donatore
- ✓ Fonte delle cellule staminali
- ✓ Profilassi o trattamento di graft-versus-host disease (GVHD)
- ✓ Allo-HSCT > auto-HSCT



CMV
EBV (EBV-PTLD)
BKV
ADV
HHV6
...



Strategie

1. Profilassi (aciclovir, valaciclovir, valganciclovir, letermovir)
2. Terapia (ganciclovir, foscarnet, cidofovir, brincidofovir, rituximab, letermovir, maribavir)
3. IG virus-specifiche
4. Riduzione di immunosoppressione

Migliore protezione immunologica da infezioni virali senza aumentare il rischio di GVHD!

→ TERAPIA CELLULARE (CliniMACS® Plus/CliniMACS® Prodigy) per profilassi, controllo delle infezioni in corso, controllo della riattivazione virale

- Assenza di terapia farmacologica efficace per la maggior parte dei virus
- Inefficacia dovuta alla posologia in pediatria (PK/PD → TDM)
- Inefficacia dovuta alla resistenza acquisita (mutazione di genoma virale, “*cryptic resistance*” – resistenza in assenza di alcuna mutazione dovuta a sincronizzazione del ciclo di vita virale come meccanismo di tolleranza dei virus al farmaco)
- Ceppi virali da paesi in sviluppo (mancano dati di genotipizzazione virale, assenza dati di mutazioni genomiche)
- **incapacità di fornire protezione a lungo termine e memoria immunologica.**



CASO CLINICO:

M, 18 mesi, immunodeficienza severa combinata (SCID) –ARTEMIS (T-B-NK+)



Oncoematologia

Direttore di struttura complessa : Dott. Marco Rabusin

Trapianto di midollo e Terapie cellulari

Dirigente Responsabile : Dott.ssa Natalia Maximova

TIPIZZAZIONE LINFOCITARIA

linfociti T: 0,4%,
linfociti B 0,1 %,
linfociti NK 95%, 105 cell/uL

- Autosomica recessiva
- deficit *DCLRE1C* → ricombinazione V(D)J → recettori antigeni → Alterata maturazione linfociti B e T

2023

GEN

FEB

MAR

APR

MAG

GIU

LUG

AGO

SET

OTT

NOV

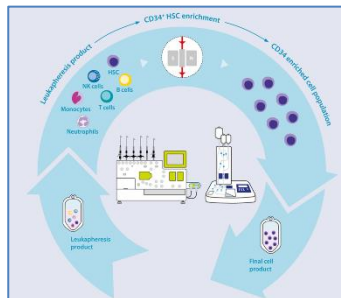
DIC

Marzo 2023

Novembre 2023

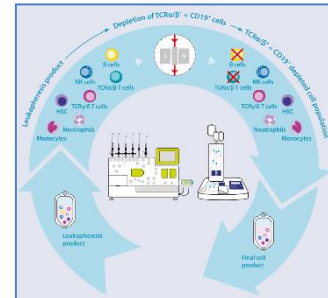
1° Trapianto allogenico **CD34-selezionato** (PADRE)

- ✓ 19,8 x 10⁶ **CD34/kg** chimera instabile e GVHD acuta cortisone-resistente



2° Trapianto allogenico **TCR alfa/beta depleto** (PADRE)

- ✓ 23,4 x 10⁶ **CD34/kg** (novembre 2023)
- ✓ Negatività EBV su sangue, attecchimento con tempistiche standard
- ✓ Donatore EBV immunocompetente





CASO CLINICO:

M, 18 mesi, immunodeficienza severa combinata (SCID) –ARTEMIS (T-B-NK+)

Giorno +12

3923 cp/ml EBV su sangue

Completa linfodeplezione

Giorno +16

23137 cp/ml EBV su sangue

linfociti totali 1100 cell/ml

CD4+ 0,3% (3 cell/ml)

CD8+ 0,7% (7 cell/ml)

CD19+ 2% (22 cell/ml, non segni di clonalità)

NK 95% (1045 cell/ml)

comparsa di linfociti B con restrizione clonale kappa (0,2%) e lambda (1%)

Giorno +17

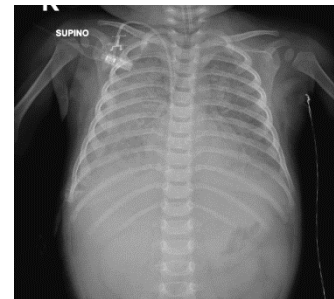
Comparsa di segni clinici di **malattia linfoproliferativa post-trapianto (PTLD)-EBV positiva**, con progressivo aumento della carica virale (**32221 cp/ml EBV su sangue**).

→ Comparsa di tumefazioni linfonodali diffuse bilaterali a livello laterocervicale e sottomandibolare, epatomegalia, stato infiammatorio con rialzo febbrile.

→ **Trattamento con rituximab e cidofovir inefficace.**

Giorno +22

91614 cp/ml EBV su sangue



Giorno + 26

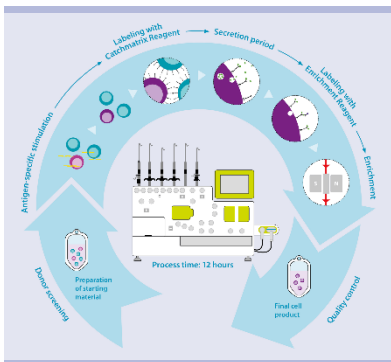
progressivo peggioramento con un quadro clinico di ARDS accompagnato da CRS non responsivo a tocilizumab e anakinra

→ ricovero in terapia intensiva, intubato, tocilizumab ogni 8 ore 10 mg/kg, anakinra infusione continua (10 mg/kg/day)

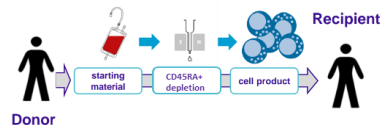
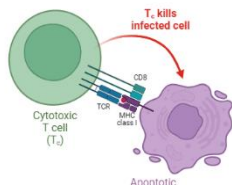
OPZIONI...?

Linfociti virus-specifici (VSTs)

- Requisiti normativi ATMP → altro centro, tempi lunghi per burocrazia, reagenti, produzione...
- Tempi di produzione 12-36 ore
- Infusioni allogeniche da donatore CD34+ o donatore terza parte
- Costo/procedura 7500-16000€



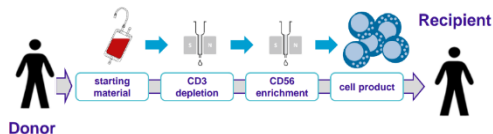
Courtesy of Miltenyi Biotec



CD45RA-/CD45RO+ Memory T cells

- **Manipolazione semplice** (deplezione cellulare)
- Tempo di produzione circa **4 ore**
- Solo infusioni allogeniche da donatore CD34+ (HLA)
- Costo/procedura 4600€

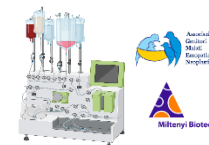
Vs



CD56+/CD3- Natural Killer cells

- **Manipolazione semplice** (deplezione cellulare + arricchimento)
- Tempo di produzione circa **8-10 ore**
- Infusioni allogeniche da donatore CD34+ (HLA) o donatore terza parte (cellule NK, no HLA-matching!)
- Costo/procedura 14000€

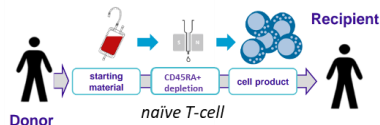
TERAPIA CELLULARE: Manipolazione semplice



Giorno +28:

Infusione T memoria allogenica (PADRE)

→ singola dose $36,2 \times 10^6$ CD45RO+/kg



Starting material:

WBC totali	Vitalità	% CD45RA+
5×10^9	99%	23%

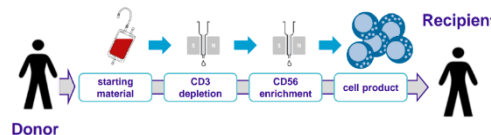
Target cell bag:

Vitalità	WBC totali vitali	RECOVERY WBC	%CD45RO+ vive	%CD45RA+ residue/vive
90%	$3,7 \times 10^8$	7,4%	98%	0,016%

Giorno +29:

Infusione NK allogenica (PADRE)

→ singola dose $85,7 \times 10^6$ CD56+/kg



Starting material:

WBC totali	Vitalità	% CD3-/56+
$12,5 \times 10^9$	99%	14,3%

Target cell bag:

Vitalità	WBC totali vitali	RECOVERY WBC	%CD3 residue/vive	%CD3-/56+/14- vive
98%	$8,7 \times 10^8$	6,9%	0,00000.....%	98%

- Nell'arco di pochi giorni scomparsa di tumefazioni linfonodali, riduzione dell'epatomegalia e negativizzazione del DNA EBV su sangue
- Giorno +40 → IgG anti-EBNA 236 U/ml.**



Post-transplan infusion CD45RA-/CD45RO+

- Dimostrata efficacia e assenza di effetti collaterali
 - Persistenza ed espansione dei cloni selezionati di T linfociti
 - Robusta ricostruzione di immunità innata e specifica
 - **NECESSARIA ATTIVAZIONE!**
 - Riduzione rischio GVHD
 - Migliora significativamente attecchimento dei neutrofili
 - Rapida conversione a full donor chimerism
- Donatore con immunità acquisita contro determinata infezione
 - Non è stato trovato un consenso sulla dose/kg raccomandata, sul numero/tempistiche precise di infusione

Post-transplant infusion Natural Killer cells

- **NON NECESSITANO L'ATTIVAZIONE** per esercitare la loro attività di killer → azione è estremamente veloce
 - Vita breve, pochi giorni
 - Immunità innata, responsabili di una risposta immunologica non specifica, antigene-indipendente;
- Possono essere impiegati donatore diversi (no HLA-matching!)
 - Non c'è una dose-limite max, non possono provocare una GVHD
 - Infezione virale può generare in NK una risposta di memoria persistente e antigene-dipendente. Le NK memory-like hanno una citotossicità e attività effettrice più potente rispetto a NK convenzionali!



RINGRAZIAMENTI



Associazione
Genitori
Malati
Emopatici
Neoplastici



IRCCS materno infantile Burlo Garofolo

Regione Friuli Venezia Giulia

Oncoematologia

Direttore di struttura complessa : Dott. Marco Rabusin

Trapianto di midollo e Terapie cellulari

Dirigente Responsabile : Dott.ssa Natalia Maximova

Farmacia

Direttore di struttura complessa : Dott.ssa Anna Arbo

Responsabile laboratorio galenica: Dott. Davide Zanon



Dott.ssa Marilena Granzotto

DIRIGENTE BIOLOGO PRESSO
SC Laboratorio Analisi Unico

Dott. Roberto Simeone

REFERENTE PRESSO
Ambulatorio di aferesi terapeutica e raccolta di cellule staminali emopoietiche - medico

DIRIGENTE MEDICO PRESSO
SC Medicina Trasfusionale

Dott. Nicola Bet

REFERENTE PRESSO
Laboratorio di congelamento e crioconservazione di cellule staminali emopoietiche - medico

RESPONSABILE PRESSO
SSD Immunotrasfusionale Burlo

DIRIGENTE MEDICO PRESSO
SC Medicina Trasfusionale