



R. Raimondi

Dipartimento di Terapie  
Cellulari ed Ematologia.  
U.O. di Ematologia,  
Vicenza, Italy

## Definizione del condizionamento ad intensità ridotta

Il condizionamento mieloablativo è nato con il triplice scopo di eradicare la malattia di base, creare spazio nel midollo per le cellule staminali del donatore, sopprimere il sistema immunitario del ricevente per evitare il rigetto (HVG) e favorire l'attecchimento, ma è gravato da un'elevata tossicità extraematologica che si estrinseca in una significativa mortalità legata alla procedura (TRM). Successivamente i primi due obiettivi sono stati riconsiderati. Si è visto che la "creazione di spazio midollare" non deve necessariamente essere un obiettivo primario del condizionamento in quanto sono probabilmente le stesse cellule staminali infuse che si creano il loro proprio spazio, ma soprattutto è divenuto evidente che l'eradicazione della malattia di base non è esclusivamente dovuta alla mieloablazione perché un ruolo maggiore è giocato dalle cellule allogeniche del donatore che mediano gli effetti immunologici sia contro i tessuti sani (GVHD) che contro le cellule neoplastiche (GVT). Questa "immunoterapia adottiva" insita nella procedura è dimostrata dall'incidenza di ricaduta che è maggiore dopo trapianto autologo o singenico o allogenico T-depleto, mentre è minore dopo trapianto allogenico con sviluppo di GVHD. Un'altra dimostrazione del fenomeno GVT è data dal

potere della DLI (*Donor Lymphocyte Infusion*) di indurre remissione dopo ricaduta post-trapianto. Queste evidenze hanno stimolato la ricerca per ottenere la guarigione tramite l'effetto GVT senza essere mieloablativi, con l'obiettivo di ridurre la TRM e di aprire la possibilità del trapianto a pazienti con età maggiore di 50-55 anni o con comorbidità.

Lungo questa linea si sono mossi gli studi pionieristici del gruppo di Seattle. Sono state studiate le dosi di TBI e si è visto che dosi di 2 Gy sono subletali e non mieloablative, ma da sole non permettono l'attecchimento che viene invece ottenuto associando un'immunosoppressione post-trapianto in particolare con ciclosporina e micofenolato. La traduzione in clinica di questo concetto con la descrizione dei primi 45 casi trattati è stata pubblicata nel 2001 da McSweeney P. *et al.*<sup>1</sup> Questo condizionamento ha dimostrato che anche con una mielosoppressione modesta (neutropenia severa assente o molto breve) si poteva ottenere un chimerismo inizialmente misto che poi nel tempo si convertiva a completo, spesso spontaneamente, anche senza ricorrere alla DLI come inizialmente pianificato. Con tale schema però l'incidenza di graft rejection è risultata elevata (20%) e per prevenirla è stata aumentata l'immunosoppressione

T del ricevente con l'aggiunta della fludarabina alla TBI 2 Gy. Questo tipo di condizionamento è stato definito non mieloablato.

Il concetto su cui si basano questi condizionamenti è quello di sfruttare principalmente l'immunosoppressione pre e post-trapianto per prevenire la HVG, permettere l'attecchimento e preparare così il terreno per lo sviluppo dell'effetto GVT (spontaneo o indotto da successiva DLI) che ha il vero compito di eradicare la malattia.

Il perno su cui sono ruotati i principali tentativi di costruire schemi di condizionamento a dosi inferiori a quelle mieloablative, i cosiddetti *Reduced Intensity Conditioning (RIC)* è stata la fludarabina. Tale farmaco, introdotto nel condizionamento dal gruppo di Perugia, ha attività modestamente mielotossica e principalmente immunosoppressiva sulle cellule T permettendo così di migliorare l'attecchimento; inoltre potenzia l'effetto antitumorale degli alchilanti perché inibisce i meccanismi di riparazione del DNA. Quest'ultima proprietà è utile in quanto l'effetto GVT impiega mesi per diventare pienamente operativo e tale lasso di tempo può essere troppo lungo per patologie "aggressive". Per questo motivo in molti schemi di condizionamento RIC si è affiancato alla fludarabina un altro farmaco, in genere un alchilante, con l'intento di operare almeno una parziale citoriduzione che controlli la malattia di base fino al pieno manifestarsi dell'effetto GVT.

Sono così sorti innumerevoli schemi (per le sole neoplasie ematologiche se ne contano circa 40) tutti denominati RIC, ma molto diversi nella loro composizione e nel loro effetto mielosoppressore. Alcuni sono basati sul concetto primario dell'immunosoppressione e dell'effetto GVT ed altri hanno solo ridotto empiricamente le dosi di chemio/radioterapia rispetto allo standard mantenendo per il resto il protocollo simile a quello convenzionale. La fludarabina è stata variamente associata

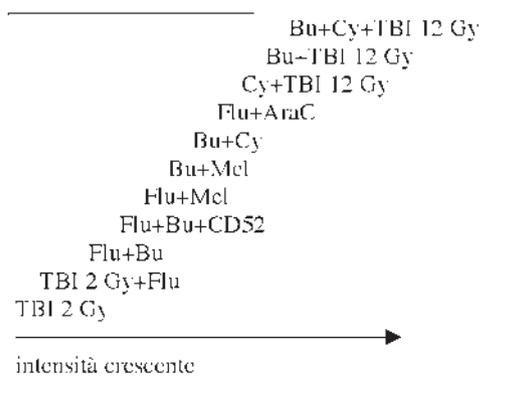


Figure 1.

tra gli altri a idarubicina-AraC, melphalan, busulfano, ciclofosfamide, thiotepa e ciclofosfamide, con o senza ATG, campath, ciclosporina, methotrexate, rituximab o irradiazione timica. Ma vi sono anche altri schemi senza fludarabina, come ad esempio quelli che impiegano thiotepa + ciclofosfamide. Inoltre non variano solo le combinazioni dei farmaci, ma anche i dosaggi che per la fludarabina vanno da 90 a 240 mg/m<sup>2</sup>, per il busulfano da 3.2 a 12 mg/kg, per il melphalan da 70 a 180 mg/m<sup>2</sup> e per la TBI da 2 a 8 Gy. All'interno dell'onnicomprendente definizione di "intensità ridotta" sono finiti quindi numerosi regimi che vanno da basse dosi di TBI (2 Gy) associate a terapia immunosoppressiva a regimi policchemioterapici con dosi molto vicine a quelle del condizionamento mieloablato.

Non è peraltro sempre facile definire l'intensità "clinica" di un condizionamento, anche in considerazione dell'ampia eterogeneità presente nei singoli report (varie patologie e vari stadi di malattia, varie età, non sempre ben definiti criteri di non eleggibilità al condizionamento convenzionale, non sempre omogenea profilassi della GVHD, etc.) che può influire sul parametro target per i RIC, cioè la TRM. Un tentativo di ordinare alcuni regimi di condizionamento in base all'intensità è stato fatto da Deeg HJ *et al.*<sup>2</sup> usando una "intensità

stimata” ed evidenziando come esista un continuum con discrete sovrapposizioni, come riportato qui in forma modificata.

La definizione dei regimi di condizionamento ad intensità ridotta rimane dunque per il momento arbitraria e controversa<sup>3</sup> e risulta a questo proposito significativo che nei numerosi report di trapianti con condizionamento definito RIC la TRM a 1 anno vari dal 7 al 55%.<sup>4</sup>

I criteri a cui deve rispondere un condizionamento non mieloablato come proposti inizialmente da Champlin *et al.*<sup>5</sup> sono: 1) non eradicazione dell'emopoiesi dell'ospite, 2) recupero ematologico entro 4 settimane, senza supporto di cellule staminali, 3) presenza di chimerismo misto all'attecchimento. Molti dei regimi riportati in letteratura non rispondono a questi criteri.<sup>6</sup>

Un tentativo di classificare i condizionamenti è stato fatto da Kassim *et al.*<sup>7</sup> che li ha distinti in:

- MAST (Myeloablative Stem Cell Transplant): è prevedibile un decorso simile con i differenti schemi MAST ed il chimerismo, quasi sempre completo in tutte le linee emopoietiche, è raggiunto rapidamente, entro 1 mese. Esempi di tali schemi sono: Cy+TBI 12 Gy, Bu+Cy, Cy+TBI 5.5 Gy.

- RIST (Reduced-Intensity Stem Cell Transplant): sono molto variabili per quanto riguarda l'intensità della mieloablazione, l'immunoablazione, l'effetto antineoplastico diretto, la tossicità, il raggiungimento del chimerismo completo, la tossicità extraematologica. Sono a loro volta suddivisi in:

- MIST (Minimal-Intensity Stem Cell Transplant): veri non mieloablativi, permettono il recupero autologo. Il chimerismo è raggiunto lentamente, dapprima per la linea linfoide T e poi per la linea mieloide (3 mesi). Esempi sono: TBI 2 Gy, Flu+TBI 2 Gy, Flu+Cy

- MOST (Moderate-Intensity Stem Cell Transplant): il raggiungimento del chimerismo

è più rapido per la linea mieloide e più lento, 2-3 mesi, per la linea linfoide T. Esempi sono: Flu+Bu, Flu+Mel, Flu+Bu+ ATG, Flu+Mel+Alemtuzumab.

Ma di fatto, nonostante migliaia di casi descritti, tuttora non esistono definizioni di condizionamento ad intensità ridotta.<sup>8</sup> È a questo proposito significativo quanto riportato nell'ultima versione (dicembre 2007) delle istruzioni del CIBMTR per la compilazione dei Transplant Essential Data. Alla domanda “Is the intent of the preparative regimen (allo only) myeloablative?” le istruzioni per la risposta sono: “to date there are no published definitions of non-myeloablative/reduced intensity conditioning, there exists some diversity of opinion on the topic. Answer the question based on the belief of the physician overseeing the care of the recipient at your center”. È chiaro che il fatto di basarsi sul giudizio soggettivo del singolo clinico rende difficile il confronto dei dati, come dimostrato dal fatto che in letteratura vengono riportati come RIC anche alcuni schemi chiaramente sovrapponibili ai mieloablativi standard. Lo stesso CIBMTR comunque suggerisce alcuni criteri, che si basano su proposte di definizione in corso di elaborazione dal CIBMTR Working Committee for regimen-related toxicity/supportive care coordinato da Andrea Bacigalupo ed in parte riportate da Lazarus e Rowe.<sup>9</sup> Queste sono basate sulla durata della citopenia e sulla necessità di un rescue con cellule staminali e riconoscono 3 categorie:

- Conventional Intensity Conditioning (CIC) o Myeloablative (MAC): regimi che causano prolungata citopenia e richiedono rescue con cellule staminali. Quando dati senza rescue di cellule staminali questi regimi causano una pancitopenia irreversibile e sono quindi letali. L'intensità della mielo-immunoablazione è alta e vicina alle dosi massime tollerate.

- Minimally Intensive Conditioning (MIC) o Non myeloablative Stem cell Transplant

(NST): regimi che non causano citopenia e non richiedono supporto di cellule staminali per il recupero ematologico. L'intensità della mielo-immunoablazione è minima.

- Reduced Intensity Conditioning (RIC): regimi che non possono rientrare nelle due definizioni precedenti. Molti di questi regimi richiedono un supporto di cellule staminali per essere clinicamente applicabili; in mancanza di tale supporto il recupero ematologico si avrebbe solo dopo molte settimane.

Un altro tentativo di definizione dei condizionamenti è quello dell'EBMT che contempla 2 categorie: il condizionamento standard ed il condizionamento ad intensità ridotta (RIC), quest'ultimo definito come qualsiasi condizionamento con dosi  $\leq 50\%$  di quelle del condizionamento standard. I condizionamenti sono poi elencati in base alla patologia. Questo tipo di classificazione ha il vantaggio della semplicità perché presenta i singoli schemi già "incasellati", ma ha il limite della parzialità perché non sono presenti alcuni condizionamenti di uso comune ed inoltre mette sullo stesso piano nell'unica categoria RIC condizionamenti discretamente mieloablativi e condizionamenti veri non mieloablativi. Un recente lavoro di de Lima 10 ha evidenziato come la distinzione tra RIC e non mieloablativo sia clinicamente significativa.

L'uso dei RIC è aumentato in modo esponenziale negli ultimi 10 anni; nel 1998 erano usati dall'1% dei Centri e nel 2006 dal 34%. La necessità di arrivare a definizioni condivise dei regimi di condizionamento è quindi sicuramente attuale ed ha varie finalità tra cui:

- Eliminare la dizione "mini trapianto", è errata e fuorviante. È errata concettualmente perché è solo il condizionamento che è ridotto e non il trapianto e perché anche i trapianti con condizionamento ridotto sono soggetti, sostanzialmente nella stessa misura del trapianto

standard, a complicanze primarie come la GVHD e le infezioni. È fuorviante perché può indurre in un falso giudizio di "leggerezza" della procedura trapiantologica, che può essere ritenuta meno aggressiva e con meno complicanze sia dai medici non specificamente dedicati che dai pazienti e dalle compagnie assicurative o comunque dalle istituzioni che devono coprire i costi. A questo proposito è stato dimostrato che i costi del trapianto mieloablativo standard e quelli del trapianto con condizionamento RIC sono uguali nel 1° anno post-trapianto.<sup>11</sup> La proposta di eliminare tale dizione era già stata formulata nel 1999,<sup>12</sup> ma il termine "mini" continua tuttora ad essere usato;

- Precisare che il condizionamento può essere non mieloablativo di per sé, ma il trapianto allogenico è sempre mieloablativo per definizione in quanto è seguito dalla eliminazione della mielopoiesi del ricevente che può avvenire non solo per effetto della chemio/radioterapia, ma anche per un meccanismo "immunologico" tipo GVH subclinica;

- Permettere la comparazione dei risultati dei diversi schemi, in particolare nelle singole patologie;

- Permettere la comparazione dei risultati dei regimi RIC con quelli dei regimi mieloablativi;

- Permettere di fare chiarezza e di adottare terminologie comuni. Fino ad ora sono state usate molte dizioni tra cui: non mieloablativo, vero non mieloablativo, ad intensità ridotta, a tossicità ridotta, ad intensità moderata, relativamente intensivo, mini, midi, micro, a ridotta intensità più mielosoppressivo, a mieloablazione ridotta, minimamente ablativo o mielosoppressivo.

È emblematico che in alcuni casi gli stessi Autori non hanno saputo se considerare il condizionamento da loro usato come "mieloablativo o RIC o entrambi".<sup>13</sup>

---

## **Bibliografia**

1. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001;97:3390-400.
2. Deeg HJ, Maris MB, Scott BL, Warren EH. Optimization of allogeneic transplant conditioning: not the time for dogma. *Leukemia* 2006;20:1701-5.
3. Sandmaier BM, Mackinnon S, Childs RW. Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic cell transplantation: current perspectives. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13 Suppl 1:87-97.
4. Alyea EP, Kim HT, Ho V, Cutler C, Gribben J, DeAngelo DJ, et al. Comparative outcome of nonmyeloablative and myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age. *Blood* 2005; 105:1810-4.
5. Champlin R, Khouri I, Shimoni A, Gajewski J, Kornblau S, Mouldrem J, et al. Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy. *Br J Haematol* 2000; 111:18-29.
6. Baron F, Little MT, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. *Blood Rev* 2005;19:153-64.
7. Kassim AA, Chinratanalab W, Ferrara JL, Mineishi S. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemias: 'what is the best recipe?'. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:565-74.
8. Mohty M, Nagler A, Killmann NM. Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation: hype, reality or time for a rethink? *Leukemia* 2006;20:1653-4.
9. Lazarus HM, Rowe JM. Reduced-intensity conditioning for acute myeloid leukemia: is this strategy correct. *Leukemia* 2006;20:1673-82.
10. de Lima M, Anagnostopoulos A, Munsell M, Shahjahan M, Ueno N, Ippoliti C, et al. Nonablative versus reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: dose is relevant for long-term disease control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104:865-72.
11. Cordonnier C, Maury S, Esperou H, Pautas C, Beaune J, Rodet M, et al. Do minitransplants have minicosts? A cost comparison between myeloablative and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant in patients with acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36:649-54.
12. Bacigalupo A. Hematopoietic stem cell transplants after reduced intensity conditioning regimen (RI-HSCT): report of a workshop of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 2000;25:803-5.
13. Chunduri S, Dobogai LC, Peace D, Sauntharajah Y, Quigley J, Chen YH, et al. Fludarabine/i.v. BU conditioning regimen: myeloablative, reduced intensity or both? *Bone Marrow Transplant* 2008;41:935-40.



E.P. Alessandrino  
F. Ripamonti  
P. Bernasconi  
A. Colombo  
D. Caldera

Unità di trapianto, Clinica  
ematologica, Fondazione  
IRCCS Policlinico San  
Matteo, Pavia, Italy

## Cinetica del chimerismo dopo trapianto allogenico ad intensità ridotta

L'attecchimento dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche viene generalmente confermato mediante la dimostrazione di un chimerismo completo o parziale, osservato su ripetuti campioni di sangue periferico e o di midollo prelevati al paziente trapiantato in tempi diversi.

Si parla di chimerismo completo o full chimerism quando nei campioni di sangue periferico o midollare del ricevente, non c'è apparente traccia di cellule emopoietiche o linfoidi del ricevente. Si parla di chimerismo parziale o mixed chimerism quando cellule emopoietiche e linfoidi del ricevente convivono con cellule emopoietiche e/o linfoidi del donatore. Il termine di split chimerism viene utilizzato per indicare quelle rare situazioni nelle quali alcune filiere di cellule emopoietiche derivano totalmente da cellule staminali dell'inneso ed altre da cellule staminali del ricevente.<sup>1</sup>

Con i termini chimerismo completo e chimerismo misto si definiscono due quadri biologici diversi la cui interpretazione varia in funzione della diagnosi, del tipo di trapianto, del tipo di sorgente di cellule staminali, della durata del follow-up, del tipo di condizionamento. La definizione stessa di chimerismo completo o misto può variare in

funzione del tipo di indagine adottata.

I test di laboratorio utilizzati per lo studio del chimerismo sono cambiati nel tempo. Fino alla prima metà degli anni ottanta venivano usate tecniche di laboratorio che oggi sono praticamente fuori uso: lo studio degli antigeni eritrocitari, i marker enzimatici degli eritrociti e dei leucociti, l'analisi citogenetica convenzionale, gli antigeni HLA in caso di disparità genetica e fenotipica fra donatore e ricevente.

Gli antigeni eritrocitari dei sistemi ABO, MN, Rh, Kidd, Duffy, Lutheran, SS sono stati routinariamente utilizzati per documentare l'attecchimento per molti anni. La sensibilità dei vari tests proposti, oggi raramente utilizzati, è dello 0.1-0.5%.<sup>2</sup>

L'analisi citogenetica convenzionale, oggi definitivamente abbandonata, veniva utilizzata nei casi di trapianto HLA identico da consanguineo mismatch per sesso. La sensibilità di questo test è bassa e la valutazione del chimerismo poteva essere effettuata esclusivamente su cellule in mitosi.

Oggi giorno la cinetica del chimerismo viene fatta con tecniche di citogenetica molecolare o mediante lo studio dei microsatelliti.<sup>3-8</sup> Numerose evidenze hanno dimostrato che la ricerca

del cromosoma Y mediante tecniche di ibridazione in situ comporta un limite d'errore per falsi negativi dello 0.3%,<sup>3,7</sup> mentre la valutazione della chimera mediante lo studio dei microsatelliti mostra una soglia di sensibilità del 1-5%.<sup>8</sup>

Se si utilizzano tecniche di studio sufficientemente sensibili, si può documentare la presenza di cellule del ricevente anche dopo diversi anni dal trapianto; virtualmente una quota di cellule residue del ricevente è sempre presente.<sup>8,9</sup> Per una corretta interpretazione del chimerismo e della sua cinetica, è cruciale utilizzare nel tempo la stessa metodica di valutazione. Va ricordato che la chimera può variare nel tempo in funzione di diverse variabili: l'intensità del condizionamento, la patologia di base, le pregresse terapie, il tipo di sorgente di cellule staminali, l'uso di ATG, la terapia immunosoppressiva post trapianto. È noto che nei pazienti sottoposti a trapianto T depletato l'incidenza di chimerismo misto è un evento frequente così come è frequente il riscontro di un chimerismo misto dopo trapianto a condizionamento non mieloablativo soprattutto se la valutazione della chimera viene effettuata precocemente.

Lo studio della chimera viene effettuato per documentare l'attecchimento, in caso di graft failure, nei pazienti candidati a terapia cellulare con linfociti del donatore, nei pazienti candidati ad un secondo trapianto, in quelli a rischio di recidiva, nei pazienti in recidiva o con sindrome linfoproliferativa post trapianto. Lo studio del chimerismo viene richiesto inoltre nei pazienti con GvHD acuta, erroneamente trasfusi con emocomponenti non irradiati, per stabilire se cellule allogeneiche presenti nell'emocomponente possano aver provocato la GvHD. Lo studio longitudinale del chimerismo è indispensabile per conoscere la cinetica di attecchimento e ci aiuta ad interpretare i vari fenomeni osservati nel post trapianto.

### **Modificazione della chimera nei pazienti sottoposti a trapianto non mieloablativo**

Il trapianto non mieloablativo e/o a condizionamento ridotto è una procedura terapeutica proposta per estendere l'applicabilità del trapianto allogenico ed i suoi eventuali vantaggi a pazienti che per età, comorbidità, performance status non potrebbero tollerare un trapianto mieloablativo. Sulla base di esperienze pilota, sono state proposte numerose combinazioni chemioradioterapiche, generalmente ben tollerate, che hanno trovato ampia applicabilità in diversi tipi di patologia.<sup>10-15</sup> Il trapianto a condizionamento ridotto prevede generalmente l'uso di cellule staminali emopoietiche ottenute da sangue periferico e somministrate dopo un trattamento fortemente immunosoppressivo eseguito con una associazione di alchilanti somministrati a dosi ridotte o radioterapia e fludarabina somministrata a dosaggio compreso fra 90 e 200 mg/m<sup>2</sup>.

Il processo che porta all'attecchimento dell'innesto è complesso e di difficile interpretazione: si ipotizza che lo stato di anergia indotto dal trattamento immunosoppressivo di preparazione al trapianto, possa favorire l'attecchimento di cellule immunocompetenti presenti nell'innesto le quali favorirebbero successivamente l'espansione delle cellule staminali del donatore a spese dell'emopoiesi del ricevente. La rivoluzione concettuale del trapianto a condizionamento ridotto sta nel fatto che le cellule staminali presenti nell'innesto creano il proprio spazio nel midollo attraverso un effetto GVH. Questo processo si verifica con una cinetica non sempre prevedibile che varia in funzione della terapia immunosoppressiva post trapianto, della entità della T deplezione, del numero di cellule staminali infuse, della pregressa chemioterapia.

In corso di trapianto a condizionamento ridotto o non mieloablativo, la chimera varia in funzione della schedula immunosoppressiva uti-

lizzata nel post trapianto. Uno stato di chimerismo misto si verifica obbligatoriamente nei primi mesi del post trapianto quando il trattamento immunosoppressivo è ancora in atto. Con la sospensione del trattamento immunosoppressivo le cellule immunocompetenti del donatore manifestano pienamente il loro effetto citotossico contro l'emopoiesi residua del ricevente favorendo la stabilizzazione di una chimera completa. In alcune situazioni si può ricorrere all'uso dei linfociti del donatore se la sospensione dei farmaci immunosoppressori non ha prodotto gli effetti desiderati.<sup>15</sup> Fluttuazioni del chimerismo si possono osservare anche tardivamente ed il ricorso ai linfociti del donatore può essere giustificato.

---

## Bibliografia

1. Bryant E, Martin P. Documentation of engraftment and characterization of chimerism following hemopoietic cell transplantation. In Thoma's Hemopoietic Stem Cell Transplantation. third edition, Blackwell Publishing 2004.
2. David B, Bernard D, Navenot JM, et al. Flow cytometric monitoring of red blood cell chimerism after bone marrow transplantation. *Transfus Med* 1999;9:209-17.
3. Bernasconi P, Cavigliano PM, Genini E, et al. Assessment of chimerism in sex-mismatched allogeneic bone marrow transplants (allo-BMT) by in situ hybridization and cytogenetics. Is host cell percentage predictive of relapse? *Leukemia* 1997;11:1989-90.
4. Blazar BR, Orr HT, Arthur DC, et al. Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1985;66:1436-44.
5. Przepiorka D, Thomas ED, Durnam DM, et al. Use of a probe to repeat sequence of the Y chromosome for detection of host cells in peripheral blood of bone marrow recipients. *Am J Clin Pathol* 1991;95:201-6.
6. Lawer M, McCann SR, Conneally E, et al. Chimerism following allogeneic bone marrow transplantation. Detection of residual host cells using the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1989;73:205-10.
7. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, et al. Fluorescence in situ hybridization with x and y chromosome probes for cytogenetic studies on bone marrow cells after opposite sex transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993;12:149-54.
8. Petit T, Raynal B, Socie G, et al. Highly sensitive polymerase chain reaction methods show the frequent survival of residual recipient multipotent progenitors after non T cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 1994;84:3575-83.
9. Mangioni S, Balduzzi A, Rivolta A, et al. Long term persistence of haemopoietic chimerism following sex mismatched bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:969-73.
10. Storb RF, Champlin R, Riddell SR, et al. Non myeloablative transplant for malignant disease in Schechter GP, Broody VC, Williams ME eds *Haematology 2001*. American society of haematology Education Program Book. Washington, DC. *Am Soc Haematol* 2001;375-91.
11. Khouri IF, Keating M, Korblyng M. Transplant lite induction of graft- versus-malignancy using fludarabine based non ablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 1998;16:2817-24.
12. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Non ablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoablation for the treatment of malignant and non malignant hematologic disease. *Blood* 1998;91:756-63.
13. Child R, Clave E, Contentin N. Engraftment kinetic after non myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999;94:3234-41.
14. Alessandrino EP, Bernasconi P, Colombo AA, et al. Reduced-intensity conditioning regimen with thiotepa and fludarabine followed by allogeneic blood stem cell transplantation in haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:1039-45.
15. Antin JH, Childs R, Filipovich AH et al., Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohemopoietic transplantation: recommendations from a Workshop at the 2001 Tandem Meetings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:473-85.

B. Bruno  
L. Giaccone  
R. Sorasio  
M. Ladetto  
D. Novero  
P. Omedè  
M. Boccardo

Divisione Universitaria  
di Ematologia, Università  
di Azienda Ospedaliera  
S. Giovanni Battista  
di Torino, Italy

## Evidenza dell'effetto trapianto versus tumore dopo trapianto ad intensità ridotta



In questa presentazione, si riassumono le tappe fondamentali dell'evoluzione della biologia dei trapianti che hanno portato allo sviluppo degli attuali condizionamenti a ridotta intensità, o squisitamente non-mieloablativi, il cui effetto terapeutico si basa principalmente sull'evidenza di un'azione anti-tumorale delle cellule immunocompetenti del donatore.

Il concetto di "immunosorveglianza" in chiave moderna nasce con Burnet che agli inizi degli anni '50 propose la teoria secondo la quale, in condizioni fisiologiche, il sistema immunitario è in grado di distruggere cellule tumorali avviate ad un'iniziale cancro perché differiscono dalla controparte normale per profilo antigenico.<sup>1</sup>

Negli stessi anni, ma non ancora in relazione al concetto di "immunosorveglianza", con gli studi pionieristici di Thomas e Mathè, avveniva l'introduzione nella pratica clinica dei primi trapianti di midollo allogenico come potenziale trattamento curativo delle malattie oncoematologiche.<sup>2,3</sup> Il potenziale terapeutico del trapianto allogenico era, però, associato esclusivamente alla possibile distruzione delle cellule leucemiche con le dosi sopra-letali di irradiazione corporea totale (TBI) del regime di condizionamento.

Le prime osservazioni dell'esistenza di un'attività anti-tumorale

delle cellule trapiantate provengono dagli studi murini di Barnes e Loutit che osservarono come i topi con leucemia non potevano essere curati dalla TBI e dall'infusione di midollo singenico, mentre i topi trapiantati con midollo allogenico sopravvivevano più a lungo senza evidenza di malattia.<sup>4,5</sup> Già in questi studi, però, emerse che i topi potenzialmente curati andavano incontro a graft versus host disease (GVHD). Fu poi Mathè, per primo, a coniare, secondo la concezione moderna, il concetto di graft versus leukemia (GVL) nel 1965.

Bisogna attendere fino alla fine degli anni '70 per l'evidenza clinica dell'esistenza di una GVL.<sup>6</sup> Weiden *et al.* per determinare l'associazione tra trapianto allogenico ed effetto GVL valutarono la relazione tra ricaduta leucemica e GVHD in pazienti sottoposti a trapianto singenico rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto allogenico con GVHD minima o di grado moderato-severo. Il rischio di ricaduta di malattia nei primi mesi dal trapianto era due volte e mezzo minore nei pazienti con GVHD moderata-severa. Interessante il fatto che tale effetto GVL era più marcato nei pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta, patologia in cui non sempre si è concordi sulla reale esistenza di una GVL. Un successivo aggiornamento dello

studio mise inoltre in risalto l'effetto antileucemico della GVHD cronica.<sup>7</sup>

Nel corso degli anni, altri elementi che hanno sottolineato l'esistenza della GVL sono stati l'aumentato rischio di ricaduta della malattia nei pazienti sottoposti a trapianti T depleti o singenici e la possibilità di riottenere la remissione della malattia dopo ricaduta post-trapianto con l'infusione di linfociti del donatore.<sup>8</sup> Gli attuali trapianti a condizionamento ridotto o non-mieloablativo sono frutto di un'ulteriore evoluzione della biologia dei trapianti, grazie alla quale si è sfatato un dogma che per decenni era stato un concetto basilare: oggi sappiamo che per ottenere l'attecchimento delle cellule del donatore non è necessaria un'intensa chemio-radioterapia mieloablativa.<sup>9</sup> In tal modo, l'effetto terapeutico del trapianto non dipende più dall'intensità del trattamento condizionante che lo precede, ma dall'instaurarsi di una reazione immunologica antitumorale da parte dei linfociti T del donatore, ai quali è lasciato il compito di eradicare la malattia. Più è ridotto il condizionamento, più si trasferisce il potenziale curativo del trapianto da una chemioterapia intensa ad una vera e propria immunoterapia cellulare.

Numerosi sono i regimi di condizionamento ad intensità ridotta caratterizzati da combinazioni chemioterapiche, che spesso includono agenti quali la ciclofosfamida e la fludarabina, o francamente non-mieloablativi, basati sulla TBI a basse dosi (200 cGy), che si sono sviluppati dalla seconda metà degli anni '90. L'evidenza più tangibile di un effetto GVL nasce dal fatto che in svariate patologie oncoematologiche è stato possibile raggiungere remissioni complete prolungate anche in pazienti già trattati con numerose linee di terapia. È però emerso che l'effetto GVL è strettamente correlato allo stato della malattia al trapianto ed alla sua aggressività. Patologie non in remissione e ad alto indice di proliferazione determinano recidive/progressioni già nelle

fasi precoci post-trapianto, mentre patologie a carattere indolente permettono probabilmente al sistema immunitario del donatore di "montare" una risposta anti-tumorale più specifica nel tempo che permette un maggior successo terapeutico.<sup>10-13</sup>

Il nostro gruppo si è focalizzato, in particolare, sull'applicazione di un programma tandem "auto-allo" dopo regime di condizionamento non-mieloablativo nei pazienti affetti da mieloma multiplo alla diagnosi per valutare l'effetto graft versus myeloma (GVM).<sup>14</sup> In questo studio, si è confrontato un protocollo che prevedeva un autotrapianto seguito da un allotrapianto da fratello o sorella HLA identico, ad un protocollo di due trapianti autologhi. Centosessantadue pazienti consecutivi, di età uguale o minore ai 65 anni, con mieloma di nuova diagnosi con almeno un fratello o una sorella sono stati inclusi nello studio. Tutti i pazienti sono stati trattati inizialmente con vincristina, doxorubicina e desametasone, seguiti da melphalan ed un trapianto autologo. I pazienti con fratello/sorella HLA identico hanno quindi ricevuto TBI a dosi non-mieloablativi e cellule staminali allogeniche. I pazienti senza donatore sono stati trattati con un secondo trapianto autologo. Gli obiettivi primari dello studio erano la sopravvivenza globale e la sopravvivenza libera da eventi. Dopo un follow-up mediano di 45 mesi (range da 21 a 90), le mediane della sopravvivenza globale e della sopravvivenza libera da eventi sono risultate maggiori negli 80 pazienti che avevano fratello o sorella con HLA identico (rispettivamente 80 mesi versus 54 mesi,  $p=0.01$ ; e 35 mesi versus 29 mesi,  $p=0.02$ ).

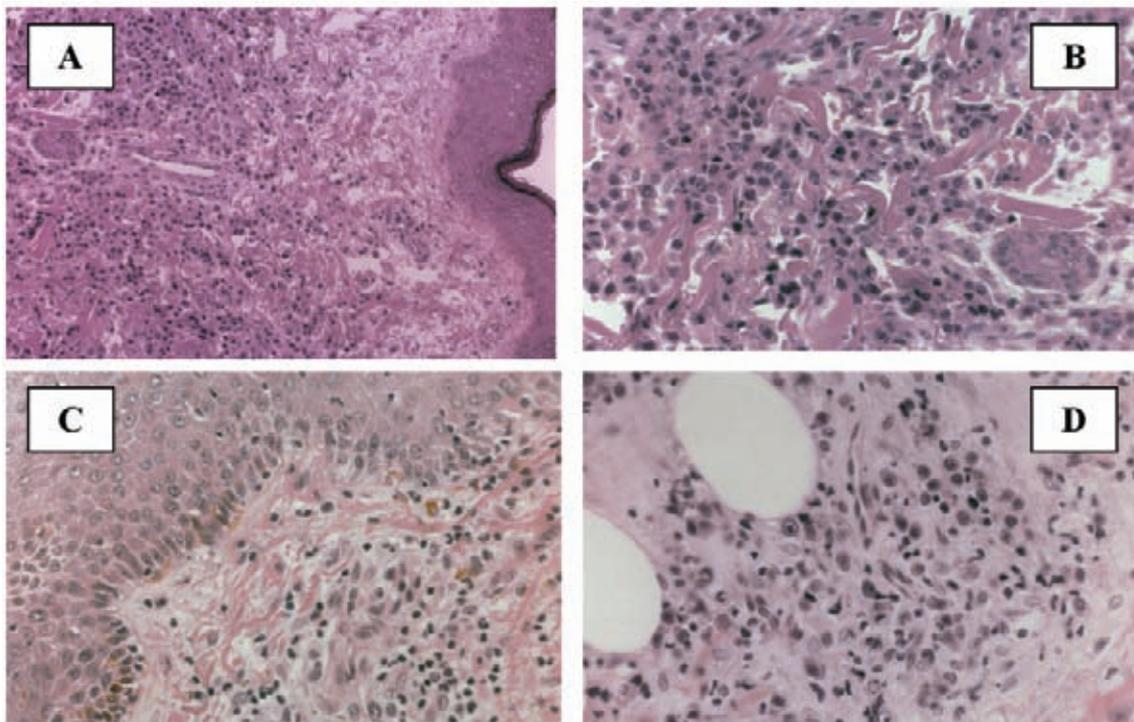
Tra i pazienti che hanno completato il protocollo di trattamento loro assegnato, la mortalità correlata al trattamento non ha differito in modo significativo fra il gruppo del doppio trapianto autologo (46 pazienti) e il gruppo auto-allo (58 pazienti,  $p=0.09$ ), ma la mortalità correlata alla malattia è risultata significati-

vamente più alta nel gruppo del doppio autologo (43% vs. 7%,  $p < 0.001$ ). L'incidenza cumulativa di GVHD di grado II-IV e di grado IV nel gruppo auto-allo è risultata rispettivamente del 43% e del 4%. Complessivamente, dopo un follow-up mediano di 38 mesi (range 10-72) 21 pazienti su 58 (36%) si trovavano in remissione completa dopo l'allogtrapianto, alcuni dei quali in remissione molecolare.

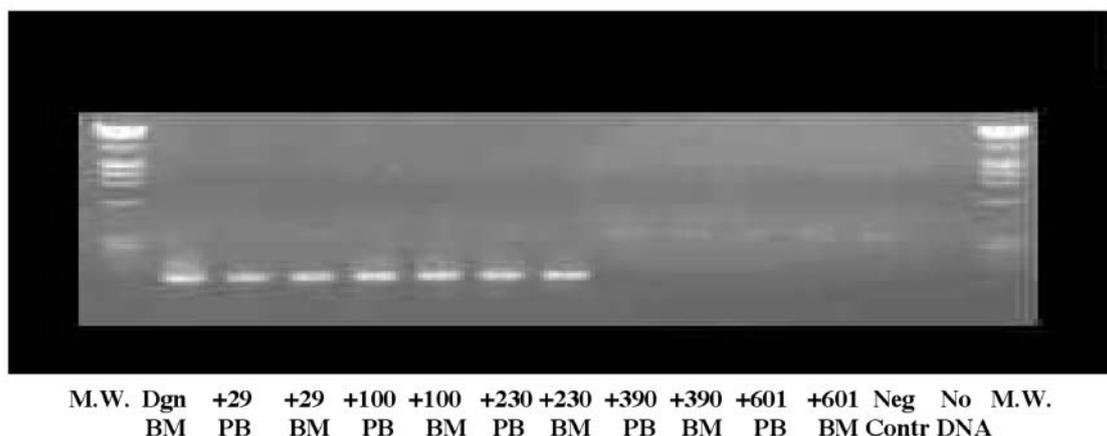
Un aggiornamento della nostra esperienza a 56 mesi di follow-up ha mostrato una sopravvivenza globale mediana non ancora raggiunta per i pazienti con un fratello/sorella HLA identico e di 56 mesi per i pazienti senza donatore. La sopravvivenza libera da eventi è rimasta significativamente più lunga nel primo gruppo. Inoltre, la sopravvivenza globale mediana non è stata raggiunta nei pazienti sottoposti al tandem "auto-allo" ed è risultata di 63 mesi nei pazienti trattati con il doppio trapianto autolo-

go. Nella nostra esperienza, quindi, la GVM ha conferito un vantaggio in termini di sopravvivenza globale e libera da eventi. Inoltre l'evidenza di una GVM è stata documentata istologicamente in localizzazione cutanee di mieloma scomparse con dopo l'esordio della GVHD (Figura 1) e con l'ottenimento di remissioni molecolari anche in assenza di GVHD clinica (Figura 2).

Un'altra evidenza diretta dell'esistenza di un effetto anti-tumorale dei regimi di condizionamento non-mieloablativi deriva dalla recente applicazione clinica della total-lymphoid irradiation (TLI) come regime di condizionamento, che sembrerebbe inoltre permettere una separazione netta tra la GVHD acuta e la GVL.<sup>15</sup> La separazione di queste due reazioni immunologiche, consentendo di sfruttare appieno il potenziale curativo del trapianto allogenico, rappresenta attualmente uno dei



**Figure 1.** Studi istologici (ematossilina-eosina): A&B: Localizzazioni cutanee di mieloma: la biopsia cutanea evidenzia un'infiltrazione plasmacellulare superiore al > 90% C: Graft-versus-Host Disease cutanea D: Graft-versus-Myeloma in concomitanza alla Graft-versus-Host Disease: infiltrato di linfociti e plasmacellule vitali ridotte ameno del 10%.



**Figure 2.** Remissione molecolare di mieloma multiplo dopo trapianto allogenico non-mieloablativo: Graft-versus-Myeloma. MW: peso molecolare Dgn: diagnosi; BM: midollo; PB: sangue periferico.

principali obiettivi della ricerca scientifica in campo trapiantologico. Recentemente, in un modello murino, le cellule natural killer T (NKT) si sono rivelate in grado di prevenire la GVHD attraverso l'inibizione dei linfociti T CD4 e CD8 lasciando inalterata l'attività antitumorale. Si è dimostrato dunque che cellule T regolatorie possono avere un ruolo nel separare GVHD e GVL. Le cellule NKT sono solo l'1-3% delle cellule T spleniche del topo, ma dopo multiple irradiazioni mirate a milza, timo e linfonodi, aumentano fino a costituire la maggioranza delle cellule T nella milza e nel midollo osseo. Tale fenomeno sembrerebbe dovuto alla resistenza alle radiazioni delle cellule NKT mediante una maggiore espressione di geni anti-apoptosi. In modelli murini preclinici, i riceventi di midollo allogenico dopo condizionamento con siero antilinfocitario (ATG) ed irraggiamento del solo tessuto linfoide (TLI) non manifestano GVHD, mentre i topi condizionati con ATG ed una singola seduta di TBI a basse dosi sviluppano GVHD. L'effetto biologico della TLI dipenderebbe da un pattern di attivazione Th2 dei linfociti T helper con aumentata secrezione di IL-4 e stimolazione dei linfociti B a produrre anticorpi

che riducono la risposta infiammatoria determinata dai Th1. La traslazione del modello TLI/ATG in uno studio clinico preliminare di fase I nei pazienti affetti da patologie oncoematologiche ha riportato risultati preliminari molto interessanti.<sup>15</sup> Il piano di cura ha previsto un trattamento radioterapico di dieci sedute di TLI di 80 rads ciascuna (campo sovradiaframmatico a mantellina, campo sottodiaframmatico che include Y rovesciata e milza, ovvero campi comprendenti tutti i maggiori organi linfoidi, inclusi timo, milza e linfonodi) nei giorni dal -11 al -2 ed infusione di ATG (dose di 1.5 mg/kg 2 volte al dì ev dal giorno -11 al giorno -7). Al giorno 0 si è eseguito il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche periferiche, mobilizzate con granulocyte colony-stimulating factor da donatore HLA-identico familiare o volontario, seguito da ciclosporina e micofenolato mofetile. Lo studio ha riportato la riduzione della GVHD acuta al di sotto del 3% senza alterare l'effetto antitumorale della GVL, specie nelle patologie ad evoluzione indolente. Tali osservazioni suggeriscono l'inequivocabile esistenza di meccanismi immunologici in grado di controllare la GVHD senza interferire con la GVL.

In conclusione, esistono evidenze dirette ed indirette di una GVL nel setting del trapianto allogenico dopo regime di condizionamento a ridotta intensità. La GVL ha però un potenziale curativo diverso a seconda della patologia e della sua aggressività. Una ridotta massa tumorale al trapianto ed un andamento indolente permettono una risposta anti-tumorale più efficace. Tali considerazioni sono soprattutto importanti per una migliore selezione dei pazienti candidati al trapianto.

---

## **Bibliografia**

1. Burnet M. The concept of immunological surveillance (review). *Prog Exp Tumor Res* 1970;13:1-27.
2. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-6.
3. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965;25:1525-31.
4. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, et al. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 1956;2:626-7.
5. Barnes DW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. *Br J Haematol* 1957;3:241-52.
6. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300:1068-73.
7. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, et al. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1981;304:1529-33.
8. Dazzi F, Fozza C. Disease relapse after haematopoietic stem cell transplantation: risk factors and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:311-27.
9. Storb R, Yu C, Wagner JL, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997;89:3048-54.
10. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*. 2001; 97:3390-4000.
11. Blaise D, Vey N, Faucher C, et al. Current status of reduced-intensity-conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007;92:533-41.
12. Khouri IF. Reduced-intensity regimens in allogeneic stem-cell transplantation for non-hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:390-7.
13. Barrett AJ, Savani BN. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. *Leukemia* 2006;20:1661-72.
14. Bruno B, Rotta M, Patriarca F, et al. A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *N Engl J Med* 2007;356:1110-20.
15. Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, et al. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2005;353:1321-31.



I. Majolino<sup>1</sup>  
M.B. Pinazzi<sup>1</sup>  
A. Locasciulli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UOC di Ematologia  
e Trapianti di Cellule  
Staminali;

<sup>2</sup>UOC  
di Pediatria, Azienda  
Ospedaliera  
S. Camillo-Forlanini,  
Roma, Italy

## Malattia minima residua ed immunoterapia cellulare adottiva dopo trapianto ad intensità ridotta

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche rappresenta una valida opzione terapeutica per una varietà di condizioni, ematologiche e non. I principali ostacoli alla riuscita del trapianto sono la tossicità della procedura e la recidiva della malattia di base. Proprio l'impossibilità di intensificare oltre un certo limite il regime di condizionamento ha portato ad esplorare i meccanismi di controllo allo-immune della malattia, che vengono racchiusi nel termine generico di graft versus tumor o graft versus leukemia (GVT/GVL).

Sperimentalmente, animali trapiantati con cellule midollari di soggetti non-identici sviluppano una reazione immune chiamata "sindrome secondaria" che porta ad un controllo della leucemia. Una serie di evidenze confermano la presenza di un meccanismo analogo anche nell'uomo.<sup>1</sup> In via indiretta tale meccanismo si evidenzia in una serie di situazioni cliniche, tra cui principalmente la possibilità di ottenere una remissione con la sospensione della terapia immunosoppressiva post-trapianto, l'efficacia della GVHD nell'indurre la comparsa o la persistenza della remissione ed infine negli effetti negativi sulla recidiva delle tecniche di T-deplezione. In via diretta la prova dell'effetto allo-immune del trapianto si fonda sull'efficacia antitumorale

dell'infusione di linfociti del donatore (DLI) dopo trapianto allogenico. DLI sono stati inizialmente impiegati nel controllo della recidiva post-trapianto di pazienti con leucemia mieloide cronica (LMC).<sup>2</sup> Da queste iniziali esperienze si è passati, con sempre minor successo, all'impiego nel mieloma multiplo, nelle malattie linfoproliferative e nelle leucemie acute sia mieloidi che linfoidi, con l'intento di trattare le recidive post-trapianto, di prevenirle o semplicemente di convertire un chimerismo misto in un chimerismo full-donor. Infatti, i linfociti del donatore hanno il vantaggio di non essere stati esposti a terapie immunosoppressive né di essere stati inattivati dai meccanismi di evasione tumorale che hanno favorito la ricaduta.

L'impiego di DLI ha trovato applicazione anche in combinazione con regimi di condizionamento ad intensità ridotta (reduced intensity conditioning, RIC), che per la minore tossicità, offrono il vantaggio di essere applicabili anche in soggetti di età avanzata o con patologie concomitanti, un'impostazione che attribuisce al regime di condizionamento il compito di creare una "piattaforma" sulla quale il sistema immunitario del donatore, grazie anche all'infusione di DLI, esplica la sua azione anti-tumorale.

Numerosi fattori sono in gioco

nel determinare il successo dell'impiego di DLI, e tra questi i più importanti sono: la malattia di base, il regime di condizionamento, la disparità immunologica donatore/ricevente, il numero di cellule linfoidi infuse, l'intervallo di tempo DLI-trapianto, l'occorrenza di una GVHD. Per questo motivo è difficile trarre dai dati della letteratura, che riportano sempre casistiche disomogenee con impiego di metodologie differenti, convinzioni che possano essere di indirizzo nell'attività clinica quotidiana.

La LMC è sicuramente la condizione in cui maggiormente si esplica l'azione terapeutica delle DLI. Inizialmente Kolb *et al.*<sup>3</sup> combinavano IFN- $\alpha$  con l'infusione di buffy-coat del donatore in tre pazienti con LMC ricaduti dopo trapianto allogenico, ottenendo la remissione completa anche citogenetica. L'efficacia della DLI in questi pazienti è stata successivamente ampiamente confermata ed è divenuta la modalità più diffusa di terapia delle recidive post-trapianto. L'unico fattore in grado di predire la risposta è lo stato di malattia al momento della DLI. Infatti in fase cronica rispondono il 70-80% dei pazienti, ma le percentuali sono nettamente inferiori (<30%) e le remissioni di durata più breve per i pazienti in crisi blastica. I pazienti la cui ricaduta è identificata solo a livello molecolare (PCR per il trascritto BCR-ABL) o citogenetico rispondono in percentuale maggiore rispetto ai pazienti nei quali la terapia viene cominciata quando la malattia è in ricaduta ematologica.<sup>4</sup> La maggioranza dei pazienti che ottengono la remissione sono anche molecolarmente negativi e la risposta è di lunga durata, ma tipicamente compare dopo settimane o mesi dalla somministrazione di DLI.<sup>5,6</sup> Vi è per converso una tossicità midollare che compare in oltre la metà dei casi e che consiste in un quadro di aplasia midollare, spesso transitoria, che è meno frequente quando DLI sono somministrati precocemente nella storia della malattia. La GVHD rappresenta

l'evenienza più temibile. In uno studio EBMT<sup>1</sup> la sopravvivenza appariva legata a: intervallo dalla diagnosi, intervallo dal trapianto, stato di malattia al trapianto ed alla ricidiva, tipo di donatore. Le dosi scalari offrono percentuali di risposta estremamente elevate (>90%). La dose cellulare è critica. Iniziando con una dose relativamente bassa ( $2 \times 10^7/\text{kg}$ ) si ha meno mielosoppressione e migliore sopravvivenza.<sup>7</sup>

La storia naturale della LMC è stata profondamente modificata dall'introduzione degli inibitori delle tirosino-chinasi. La risposta ad imatinib in pazienti che falliscono il trapianto allogenico è >90% per i soggetti in fase cronica. Tuttavia un confronto tra imatinib e DLI mostra un vantaggio per DLI sia per probabilità di ricidiva (60% vs. 14%) che per sopravvivenza libera da leucemia (30% vs 60%).<sup>8</sup> 18 pazienti con LMC di nuova diagnosi ricevevano imatinib per 6-12 mesi per ottenere il controllo della malattia e 15 erano successivamente sottoposti a trapianto RIC con fludarabina, melphalan e alemtuzumab. La maggioranza (n=13) riceveva DLI in dosi crescenti come consolidamento del risultato ottenuto con il trapianto allo scopo di ottenere un controllo persistente della malattia e di convertire ad un chimerismo full-donor. I trascritti bcr-abl continuavano a ridursi dopo RIC e il 53% ottenevano livelli persistentemente non determinabili.<sup>9</sup>

Al contrario della LMC, le risposte dopo DLI sono rare (<30%) e di breve durata sia nelle leucemie acute che nelle sindromi mielodisplastiche in ricidiva dopo allotrapianto. Molte delle ricadute post-DLI si manifestano con localizzazioni extramidollari e in siti *sanctuario*, ciò fa supporre l'esistenza di meccanismi di escape immunologico. È verosimile che lo scarso effetto dell'immunoterapia nelle leucemie acute sia da imputarsi all'elevata attività proliferativa e quindi al numero di cellule leucemiche che impedirebbero un'efficace stimolazione dei linfociti allogenici. Il fattore predit-

tivo più importante è l'epoca di insorgenza della recidiva post trapianto. Tuttavia lo stato di malattia gioca in questo caso un ruolo fondamentale.<sup>10</sup> Nei pazienti in remissione completa o con citogenetica favorevole la prognosi è nettamente più favorevole con oltre il 40% dei pazienti in remissione a 3 anni dal trapianto.<sup>11</sup> L'uso di DLI dopo il trapianto come misura profilattica in presenza di malattia residua minima potrebbe migliorare i risultati. Questo approccio è stato impiegato con successo per lo più nel contesto del trapianto ad intensità ridotta.<sup>12</sup> Nella leucemia linfoide acuta, nonostante che i dati depongano per un effetto favorevole della GVHD sulla sopravvivenza libera da leucemia, l'impiego delle DLI nel trattamento delle recidive ha dato risultati sconsigliati, con percentuali di remissione completa <10%.<sup>13</sup> Non sappiamo se un impiego precoce delle DLI con intento profilattico, quando il laboratorio mostra la presenza di una malattia minima, possa migliorare questi risultati.

Nel mieloma multiplo il trapianto allogenico, sebbene sia ad oggi l'unica forma di terapia in grado di determinare una lunga sopravvivenza libera da malattia, non rappresenta lo standard di trattamento a causa principalmente della tossicità della procedura.<sup>14</sup> L'impiego di programmi di condizionamento RIC in questa malattia hanno tuttavia notevolmente ridotto la mortalità.<sup>15</sup> I risultati dell'impiego di DLI hanno un valore intermedio tra quelli della LMC e quelli delle leucemie acute. DLI sono in grado di produrre la remissione completa in pazienti con persistenza di malattia dopo trapianto allogenico,<sup>16,17</sup> il che fa di questo trattamento una valida strategia per la malattia in recidiva o persistente dopo trapianto. La risposta richiede probabilmente dosi superiori a quelle impiegate altrove, pertanto sembra indicato l'impiego di dosi scalari per minimizzare gli effetti della GVHD acuta o cronica. Le percentuali di risposta sono del 40% ed una minoranza dei pazienti rimangono in remissione per

> 1 anno. Il fattore più importante per la risposta è lo sviluppo della GVHD.<sup>18</sup> Per migliorare i risultati delle DLI. Kroger *et al.*<sup>19</sup> hanno associato la talidomide. Un numero limitato di pazienti sviluppavano una GVHD di grado lieve o moderato, ed oltre il 50% ottenevano una risposta completa o parziale con una PFS del 100% a 2 anni. Questi risultati mostrano un possibile effetto sinergico tra DLI e talidomide. Resta da valutare l'impatto relativo di DLI e dei nuovi farmaci, in particolare, oltre a talidomide, lenalidomide e bortezomib sebbene sia documentata un'attività nella terapia delle recidive successive ad allotrapianto.<sup>20</sup> DLI sono stati impiegati come terapia di consolidamento dopo un allotrapianto con solo melphalan 100 mg/m<sup>2</sup> in pazienti con mieloma a cattiva prognosi.<sup>21</sup> Il regime era ben tollerato, anche in pazienti pesantemente pre-trattati, e le DLI inducevano nella maggioranza una GVHD, a cui faceva seguito una risposta completa o parziale della malattia in oltre il 50% dei casi.

I dati sull'effetto delle DLI in pazienti con linfoma sono pochi e di difficile interpretazione. I linfomi sono tumori sensibili all'effetto GVT ma il ruolo delle DLI nel trattamento delle malattie linfoproliferative è mal definito. Bloor *et al.*<sup>22</sup> hanno riportato di recente i risultati in 28 pazienti con neoplasie linfoidi indolenti sottoposti a DLI. In 5 casi si trattava di linfomi trasformati. Le indicazioni per il trattamento con DLI erano in 17 casi una progressione di malattia con o senza chimerismo misto ed in 11 casi chimerismo misto solamente. Dosi scalari di DLI venivano somministrate in assenza di GVHD con una percentuale di risposte cumulative del 76% per i casi di malattia progressiva e del 91% per quelli di chimerismo misto. La principale tossicità era rappresentata dalla comparsa di GVHD. Questi dati indicano che la somministrazione di dosi scalari di DLI è un trattamento efficace nei casi che progrediscono dopo trapianto allogenico. Nel linfoma di Hodgkin, i dati di studi

retrospettivi suggeriscono che la percentuale di recidive può essere inferiore nei pazienti che sviluppano una GVHD. Tredici pazienti con linfoma di Hodgkin, la maggioranza dei quali in progressione dopo trapianto allogenico con un regime ad intensità ridotta comprendente alemtuzumab, venivano sottoposti ad un trattamento con DLI a dosi scalari nello studio di Peggs *et al.*<sup>23</sup> Una risposta si verificava nel 70% indipendentemente dal chimerismo. Anche quest'esperienza indica l'opportunità di trattare con DLI pazienti con malattia di Hodgkin in progressione dopo allotrapianto.

L'associazione di GVL e GVHD rimane il fattore limitante l'applicazione delle DLI. I numerosi tentativi di separare questi due fenomeni sono basati in parte sul tentativo di ridurre il numero delle cellule T potenzialmente pericolose, e in parte sulla possibilità di limitarne la funzione. Una riduzione del numero di cellule T è in grado di indurre GVL in assenza di GVHD,<sup>24</sup> tuttavia la dose richiesta per indurre GVL/GVT varia probabilmente da una condizione all'altra e nella stessa malattia sulla base del numero di cellule tumorali. Anche la somministrazione di DLI deplete di CD8 si è mostrata efficace in pazienti con CML in recidiva, con una ridotta incidenza di GVHD.<sup>25,26</sup>

Numerose altre tecniche per ottimizzare l'impiego dei DLI sono state oggetto di sperimentazione nell'animale e nell'uomo. Esse comprendono l'impiego simultaneo di cellule dendritiche pulstate con antigeni tumorali, l'uso di cloni cellulari T selezionati verso antigeni minori di istocompatibilità o verso antigeni tumorali, la deplezione di cellule T alloreattive, l'impiego di cellule T trasdotte con un gene suicida, la polarizzazione della popolazione T verso il fenotipo di tipo 2 protettivo nei confronti della GVHD, ma nessuna di queste tecniche è entrata stabilmente nella pratica clinica.

In conclusione, l'effetto terapeutico della GVL/GVT è stato dimostrato in numerose

patologie, ed in particolare nella LMC. Tuttavia l'applicazione di questo tipo di terapia incontra alcuni ostacoli. In particolare le malattie a rapida proliferazione cellulare si mostrano non-responsive. La separazione dell'effetto GVL dall'effetto GVHD rimane ancora un obiettivo da raggiungere. La biologia delle cellule effettrici e dei rispettivi target cellulari sono tuttora oggetto di studio.

---

## Bibliografia

1. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions following bone marrow transplantation in humans. *Blood* 1990;75:555-62.
2. Kolb HJ, Shattenberg A, Goldman JM, et al. Graft versus leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995;86:2041-50.
3. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76:2462-5.
4. van Rhee F, Lin F, Cullis JO, et al. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood* 1994;83:3377-83.
5. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:2712-6.
6. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, et al. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:67-71.
7. Guglielmi C, Arcese W, Dazzi F, et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: prognostic relevance of the initial cell dose. *Blood* 2002;100:397-405.
8. Weisser M, Tischer J, Schnittger S, et al. A comparison of donor lymphocyte infusions or imatinib mesylate for patients with chronic myelogenous leukemia who have relapsed after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006;91:663-6.
9. Heaney NB, Copland M, Stewart K, et al. Complete molecular responses are achieved after reduced intensity stem cell transplantation and donor lymphocyte infusion in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:5252-5.
10. Loren AW, Porter DL. Donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:483-93.
11. Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischer J, Kolb HJ. Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2005;23:5675-87.
12. Massenkeil G, Nagy M, Lawang M, et al. Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukaemias if complete donor chimerism can be achieved. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:339-45

13. Collins RH Jr, Goldstein S, Giralt S, et al. Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:511-6.
14. Majolino I, Corradini P, Scimè R, et al. Allogeneic transplantation of unmanipulated peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:449-55.
15. Majolino I, Davoli M, Carnevalli E, et al. Reduced intensity conditioning with thiotepa, fludarabine, and melphalan is effective in advanced multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2007;48:759-66.
16. Lokhorst HM, Schattenberg A, Cornelissen JJ, Thomas LL, Verdonck LF. Donor leukocyte infusions are effective in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997;90:4206-11.
17. Kröger N, Krüger W, Renges H, et al. Donor lymphocyte infusion enhances remission status in patients with persistent disease after allografting for multiple myeloma. *Br J Haematol* 2001;112:421-3.
18. van de Donk NW, Kröger N, Hegenbart U, et al. Prognostic factors for donor lymphocyte infusions following non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37:1135-41.
19. Kröger N, Shimoni A, Zagrivnaja M, et al. Low-dose thalidomide and donor lymphocyte infusion as adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood* 2004; 104:3361-3.
20. van de Donk NW, Kröger N, Hegenbart U, et al. Remarkable activity of novel agents bortezomib and thalidomide in patients not responding to donor lymphocyte infusions following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 2006;107:3415-6.
21. Badros A, Barlogie B, Morris C, et al. High response rate in refractory and poor-risk multiple myeloma after allo-transplantation using a nonmyeloablative conditioning regimen and donor lymphocyte infusions. *Blood* 2001;97:2574-9.
22. Bloor AJ, Thomson K, Chowdhry N, et al. High response rate to donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation for indolent non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:50-8.
23. Peggs KS, Thomson K, Hart DP, et al. Dose-escalated donor lymphocyte infusions following reduced intensity transplantation: toxicity, chimerism, and disease responses. *Blood* 2004;103:1548-56.
24. Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, et al. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86:1261-8.
25. Shimoni A, Gajewski JA, Donato M, et al. Long-Term follow-up of recipients of CD8-depleted donor lymphocyte infusions for the treatment of chronic myelogenous leukemia relapsing after allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:568-75.
26. Alyea EP, Canning C, Neuberg D, et al. CD8+ cell depletion of donor lymphocyte infusions using cd8 monoclonal antibody-coated high-density microparticles (CD8-HDM) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:123-8.