

Anno 3 - Numero 2 - 2016

# **Ematologia** **Oncologica.it**

## **Trapianto allogenico**

Organo Ufficiale  
della **Fondazione Matarelli** - Milano

*Con il supporto non condizionato di*



## Trapianto allogenico

### L'evoluzione della filosofia trapiantologica nella leucemia acuta

*Massimo Fabrizio Martelli*

7

### Scelta del donatore di cellule staminali

*William Arcese, Raffaella Cerretti, Laura Cudillo,  
Gottardo De Angelis, Alessandra Picardi*

15

### Regimi di condizionamento

*Franco Aversa, Lucia Prezioso, Ilenia Manfra*

29

### Profilassi e terapia della GvHD acuta

*Andrea Bacigalupo, Federica Sorà*

43

### Profilassi e terapia della recidiva post-trapianto

*Federico Lussana, Orietta Spinelli, Paola Stefanoni, Manuela Tosi,  
Roberta Cavagna, Maria Guinea Montalvo, Alessandro Rambaldi*

47

## Ematologia Oncologica.it

Vol 3 - n.2 - 2016

### Direttore Responsabile

Giorgio Maggiani

### Direttore Scientifico

Giorgio Lambertenghi Deliliers

Fondazione Matarrelli, Milano

### Comitato Editoriale

Sergio Amadori

Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccardo

Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi

Università degli Studi, Firenze

Michele Cavo

Università degli Studi, Bologna

Antonio Cuneo

Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi

Università degli Studi, Genova

Cristina Mecucci

Università degli Studi, Perugia

Fabrizio Pane

Università degli Studi, Napoli

Francesco Passamonti

Università degli Studi, Varese

Gianni Pizzolo

Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia

Università degli Studi, Bari

## Ematologia Oncologica.it

È una rivista quadrimestrale monotematica, di aggiornamento in lingua italiana, che ha essenzialmente lo scopo educativo di rendere disponibili le informazioni più aggiornate su argomenti pertinenti le malattie del sangue, in particolare quelle neoplastiche. Per raggiungere questo obiettivo la rivista desidera coinvolgere gli specialisti italiani più qualificati e informare il lettore sui più recenti progressi nel campo della ricerca di base, della clinica e della terapia.

La rivista si attiene alle raccomandazioni indicate dal World Association of Medical Editors (WAME) riguardante l'etica delle pubblicazioni in ambito sanitario.

### Registrazione Tribunale di Milano

n. 348 del 19/11/2013

### Progetto grafico

Dynamicom srl

### Sito Internet

www.ematologiaoncologica.it

### Coordinamento editoriale

Dynamicom - Milano

Tel. (+39)0289693750 - Fax (+39)02201176

### Editore

Fondazione Matarrelli

### Periodicità

Quadrimestrale

### Avvertenze ai lettori

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni eventualmente citati negli articoli, ed invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

### Norme per gli Autori

- L'accettazione dei testi inviati è comunque subordinata al parere del Comitato Editoriale che deve verificare la loro compatibilità con le norme redazionali.

- Gli Autori dei testi sono gli unici responsabili del loro contenuto, e della riproduzione delle immagini allegate.

- Il primo Autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora utilizzi figure e/o tabelle già pubblicate altrove.

- La proprietà dell'articolo, una volta pubblicato, appartiene alla Fondazione Matarrelli, (Largo Crocetta, 2 - 20122 MI) che ha depositato il nome della rivista presso il Tribunale di Milano in data 19/11/2013

- Il manoscritto deve essere inviato a Dynamicom Edizioni (segreteria@ematologiaoncologica.it) che, dopo averlo controllato ed impaginato, lo invierà al Direttore Scientifico (giorgio.lambertenghi@unimi.it) per la revisione e il controllo della stesura secondo le norme redazionali. Le bozze di stampa verranno quindi rinviate all'Autore per le opportune correzioni, che dovrà provvedere entro cinque giorni lavorativi a rinviarle a: segreteria@ematologiaoncologica.it

### Norme redazionali

Il contenuto dell'articolo, redatto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh, non deve superare le 30-35 cartelle dattiloscritte (2000 battute cad.) compresa la bibliografia, e corredato delle illustrazioni (tabelle, grafici, figure) nel numero che l'Autore ritiene necessario, in file ad alta risoluzione (salvate in formato pdf, jpg o eps).

Lo stile del manoscritto, le citazioni bibliografiche e il loro riferimento nel testo del manoscritto devono seguire le raccomandazioni dell'International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Per le relative informazioni, gli Autori sono pregati di consultare il sito <http://www.icmje.org>.

### L'articolo deve essere così strutturato:

- **Titolo conciso** e pertinente con il tema della rivista;
- **Prima pagina** con nome e cognome degli Autori, istituzione di appartenenza, foto tessera a colori del primo Autore;
- **Introduzione iniziale** che esponga in maniera chiara lo scopo dell'articolo;
- **Corpo del testo** suddiviso in sottocapitoli a contenuto omogeneo;

### Pagina finale:

- 1) nome e cognome del primo autore, con telefono, fax, e-mail al quale andrà indirizzata la corrispondenza;
- 2) eventuali **ringraziamenti** a persone e/o associazioni;
- 3) 3-5 parole chiave.

### Bibliografia

Per lo stile nella stesura seguire le seguenti indicazioni o consultare il sito "International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals Sample References". Le **voci bibliografiche** non devono superare il numero massimo di 150, numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo, citate tra parentesi con il testo in apice e con i numeri arabi, tenendo presente gli esempi sottostanti.

### Articoli con 1-6 autori

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2000;30(1):100-1.

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2000;30(1):100-1.

### Articoli con più di 6 autori

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E, De Giglio I, Baldoni A, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2000;30(1):100-1.

### Abstract e Congressi

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2000;100(10):1000.

### Capitoli di libri

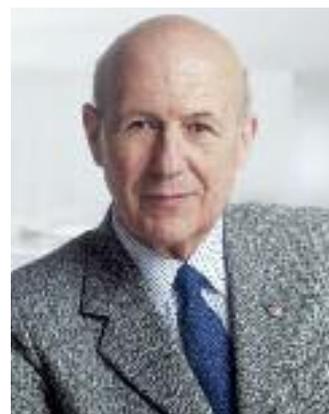
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. *The Hemoglobin*, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1980:10-15.

# Editoriale

**Giorgio Lambertenghi Delilieri**

Fondazione Matarrelli - Milano



Il trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore rappresenta ancora oggi la terapia postremissionale d'elezione per molte emopatie neoplastiche. In questo numero *Ematologia Oncologica.it* riassume i progressi significativi che hanno permesso di superare le difficoltà e i limiti della procedura tradizionale con conseguenti benefici sulla sua tollerabilità.

L'acquisizione più significativa è stata la possibilità di ricorrere a fonti diverse di cellule staminali con tecniche e protocolli che permettono di superare il limite imposto dal rispetto della compatibilità tra donatore e ricevente. Il donatore ideale è sempre rappresentato da un familiare HLA-compatibile, un'eventualità questa che si verifica solo nel 25-30% dei casi, per cui si sono progressivamente espansi i Registri di donatori volontari e le Banche di sangue cordonale che insieme permettono di reperire un donatore compatibile o semicompatibile con una probabilità di circa il 70%. Essendo molteplici i fattori del binomio donatore /ricevente che incidono sul decorso clinico del trapianto, sono state formulate linee guida per il giudizio di eligibilità di un paziente al trapianto e criteri clinici e biologici per la selezione del donatore volontario e dell'unità di sangue placentare. Nell'ultimo decennio l'interesse dei ricercatori si è focalizzato sempre di più sul trapianto da donatore familiare HLA-aploidentico che ha il rilevante vantaggio di ridurre notevolmente i tempi di realizzazione dell'intervento. La fattibilità di questo trapianto è oggi possibile grazie a protocolli di condizionamento, alle tecniche di T deplezione ed agli studi sulla alloreattività NK. Ma l'obiettivo centrale rimane ancora la possibilità di prevenire la aGvHD preservando l'effetto GvL e di favorire la ricostituzione immunologica. A questo scopo è stato recentemente disegnato per i pazienti affetti da leucemia mieloide acuta un protocollo di trapianto aplo T-depleto con immunoterapia adottiva con cellule T-reg che impediscono ai linfociti T di indurre aGvHD, ma al contempo ne consentono l'effetto GvL.

Il successo del trapianto allogenico dipende soprattutto dalla

efficacia eradicante del regime di condizionamento e dalla sua limitata tossicità sugli organi. In questi ultimi anni, nell'ottica di bilanciare capacità antitumorale e riduzione delle complicanze post-trapianto, sono stati disegnati regimi di condizionamento ad intensità variabile, diversificati sulla base della malattia, dell'età del ricevente, della prevenzione della aGvHD, della sorgente di cellule staminali e del tipo di donatore. La TBI, che è stata per anni il cardine del condizionamento, oggi è meno utilizzata, grazie all'utilizzo dei vecchi farmaci in nuove formulazioni, come il busulfano e la ciclofosfamide, e alla disponibilità di nuovi farmaci, come la fludarabina e l'ATG. Recenti studi randomizzati hanno confermato che ATG pre-trapianto e ciclofosfamide post-trapianto sono in grado di ridurre l'incidenza della GvHD acuta e prevenire in modo significativo anche la GvHD cronica. Un'acquisizione importante, in quanto il 50% dei pazienti con aGvHD è dipendente o refrattario alla terapia steroidea, candidato quindi alla sperimentazione con l'infusione di cellule mesenchimali espanse o al trattamento con l'anticorpo anti-CD26.

Ma il problema più rilevante è la recidiva di malattia che può interessare dal 25 al 50% dei soggetti sottoposti a trapianto allogenico, a seconda di diversi fattori legati al paziente e alla patologia di base. Dal momento che la recidiva dipende dal mancato controllo immunologico della malattia minima residua, sono state migliorate le tecniche diagnostiche e introdotte terapie innovative tumore specifiche. La chemioterapia e l'uso di linfociti non manipolati del donatore sono le principali opzioni per il salvataggio di pazienti non in remissione molecolare o con un chimerismo T linfocitario misto. Tuttavia sono in corso di sperimentazione terapie di prevenzione della recidiva post-trapianto utilizzando anticorpi monoclonali o cercando di potenziare il controllo immunologico della malattia minima residua con l'infusione di cellule T geneticamente modificate (CAR) o di linfociti T attivati in vitro (CIK).



# L'evoluzione della filosofia trapiantologica nella leucemia acuta



*Massimo Fabrizio Martelli*

*Professore Emerito dell'Università di Perugia*

## Introduzione

Nella seconda metà degli anni settanta Donnall Thomas dimostrò l'efficacia del trapianto di midollo osseo da donatore familiare HLA-compatibile nel trattamento di pazienti con leucemia acuta (LA). I decenni successivi videro significativi progressi in diversi aspetti della strategia trapiantologica, quali composizione del regime di condizionamento, prevenzione farmacologica della malattia trapianto contro ospite (GvHD), diagnosi e terapia delle infezioni opportunistiche post-trapianto, con conseguenti benefici sulla tollerabilità della procedura e sull'incidenza della mortalità trapianto-relata (TRM). L'acquisizione più significativa fu poi la dimostrazione che con l'impiego di sorgenti alternative di cellule staminali emopoietiche (donatore volontario geneticamente non correlato, unità di sangue cordonale geneticamente non correlata, familiare HLA-aploidentico) era possibile raggiungere risultati non dissimili da quelli ottenibili con il trapianto da donatore familiare compatibile. Negli ultimi anni l'interesse preminente dei ricercatori si è focalizzato sul trapianto HLA-aploidentico: scopo di questa rassegna è analizzarne le varie modalità, tra loro profondamente differenti, con cui oggi viene realizzato. Inoltre, verranno discusse le recenti ricerche in campo sperimentale e clinico miranti a prevenire la GvHD preservando al contempo un potente effetto trapianto contro leucemia (GvL): un obiettivo cruciale, sino ad oggi non raggiunto nel trapianto allogenico.

## Fonti alternative di cellule staminali

Il donatore ideale è rappresentato da un familiare HLA-compatibile, un'eventualità questa che si verifica solo nel 25-30% dei casi per cui è necessario ricorrere, per la massima parte dei pazienti, a fonti alternative di cellule staminali. Tradizionalmente, quale donatore di seconda linea, viene preferito un soggetto geneticamente non correlato HLA-compatibile. L'impiego della tipizzazione ad alta risoluzione ha consentito di selezionare donatori compatibili per HLA-A, B, C, -DRB1 e -DQB1 a livello molecolare, con conseguente riduzione dell'incidenza e gravità della GvHD ed impatto positivo sull'esito del trapianto. I risultati in termini di sopravvivenza libera da

malattia sono analoghi a quelli raggiungibili con il trapianto da familiare HLA-identico. Ad esempio, in un'analisi <sup>(1)</sup> dei dati del CIBMTR che comprendeva 226 pazienti con leucemia acuta mieloide (LAM) in prima remissione completa (CR1) e con citogenetica a prognosi sfavorevole sottoposti a trapianto da fratello HLA compatibile, la sopravvivenza priva di malattia (LFS) a 3 anni era del 37% con un'incidenza cumulativa di recidiva del 42%. Nello stesso studio, i 254 pazienti trapiantati da donatori da Registro HLA-compatibili (trapianto MUD) mostravano, in analisi multivariata, simile LFS con incidenza di recidiva del 40%. D'altro canto, nonostante la progressiva espansione del pool dei donatori sino all'attuale numero di 25 milioni, la probabilità di reperire un donatore 8/8 compatibile varia grandemente con la razza, dal 75% per i caucasici al 16-19% per i soggetti di discendenza africana. Inoltre i tempi di attesa necessari per l'identificazione del donatore e per il prelievo delle cellule staminali comportano, nei pazienti con malattia aggressiva, un significativo rischio di ricaduta prima del trapianto.

Il trapianto da unità di sangue cordonale ha tempi di ricerca più rapidi e consente l'impiego di un inoculo incompatibile per 2 loci. Negli adulti, d'altro canto, la rilevante discrepanza tra peso corporeo del ricevente e numero di cellule staminali presenti in un'unità cordonale standard è causa di un attecchimento oltremodo lento e comporta un elevato rischio di rigetto. La dose cellulare minima per unità cordonale necessaria per prevenire queste complicanze è stata identificata in  $2,5 \times 10^6$  cellule nucleate per kg di ricevente <sup>(2)</sup>. Ove non sia disponibile un'unità con dose cellulare uguale o superiore a quella minima, è stato proposto l'impiego di due unità cordonali <sup>(3)</sup>.

Uno studio retrospettivo <sup>(4)</sup> con più di 1500 pazienti, in cui è stato seguito il concetto di dose minima cellulare, ha dimostrato che il trapianto di cordone, a confronto con il trapianto da donatore da registro, comporta una maggiore TRM, minori incidenze di recidiva e di GvHD e simile LFS. L'analisi <sup>(5)</sup> dei dati dei Registri CIBMTR e *National Cord Blood Program, New York Blood Center* ha riguardato 409 pazienti adulti, in gran parte in CR1- CR2 al momento del trapianto, di cui 303 infusi con due unità cordonali e 106 con un'unica

unità, contenente un'adeguata dose di cellule. A due anni, le probabilità di sopravvivenza dopo trapianto di doppia unità o di singola unità cordonale erano, rispettivamente, del 35% e 33%, con incidenze cumulative di recidiva del 36% e del 32%.

Per quanto concerne il trapianto da donatore familiare HLA- aploidentico, il vantaggio più rilevante è costituito dal fatto che tale donatore è identificabile in oltre il 95% dei casi e che la procedura trapiantologica può essere effettuata senza alcun ritardo. Sovente, nell'ambito familiare si hanno due o più donatori aploidentici, il che consente di scegliere quello più valido sulla base di vari aspetti quali la potenziale alloreattività delle cellule *natural killer* (NK) e lo stato del citomegalovirus. In caso di rigetto è poi possibile effettuare un secondo trapianto dal donatore iniziale o, se disponibile, da un altro donatore familiare con aplotipo differente da quello coinvolto nel rigetto.

L'inconveniente maggiore è dovuto alle intense risposte alloreattive del ricevente contro il trapianto (*host versus graft*) e del trapianto verso il ricevente (*graft versus host*), indotte dall'elevata frequenza di T linfociti che riconoscono le differenze tra donatore e ricevente per le maggiori classi I e II di HLA. Conseguentemente, nel passato, il trapianto aploidentico non manipolato (T-repleto) si dimostrò clinicamente non fattibile per l'alta frequenza di GvHD severa<sup>(6)</sup>. D'altro canto, il trapianto basato sulla rimozione *ex vivo* dei T linfociti dall'inoculo (trapianto T-depleto) si associò ad un 30% di rigetti, indotti da linfociti T citotossici con specificità anti-donatore che erano sopravvissuti al regime di condizionamento<sup>(7)</sup>.

Nel far seguito agli studi di Reisner et al in modelli murini,<sup>(8)</sup> la barriera di istocompatibilità venne superata agli inizi degli anni novanta con l'utilizzo di un inoculo contenente una megadose di progenitori emopoietici ( $10 \times 10^6$  cellule CD34+/kg), raccolti da sangue periferico dopo mobilitazione con G-CSF e depletati *ex vivo* dei T linfociti con la metodica della Soy bean agglutinazione ed E-rosettazione,<sup>(9)</sup> successivamente sostituita con la immunoselezione positiva delle cellule CD34+<sup>(10,11)</sup>. Il regime di condizionamento comprendeva TBI (8Gy), tiotepa, fludarabina ed ATG. Questa strategia assicurò l'attecchimento stabile nel 95% di oltre 250 pazienti affetti da LA con un'incidenza estremamente bassa di GvHD acuta e cronica, pur in assenza di qualsiasi trattamento immunosoppressivo post-trapianto. Con un follow up massimo di oltre 15 anni, la sopravvivenza libera da malattia fu del 50% nei pazienti con LAM in CR 1 e del 35% per quelli in CR $\geq$  2. Dati analoghi sono stati riportati in un'analisi retrospettiva concernente i risultati dei trapianti aploidentici T-depleti effettuati in alcuni Centri europei<sup>(12)</sup>.

Inoltre si evidenziò come la rigenerazione post-trapianto di un repertorio di cellule NK, comprensivo di cloni alloreattivi nei riguardi delle cellule emopoietiche del ricevente, venisse ad esercitare un potente effetto GvL, in assenza di GvHD<sup>(13-15)</sup>. Le cellule NK dell'uomo presentano dei recettori inibitori, clonalmente distribuiti,

denominati *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs). Essi riconoscono epitopi (KIR *ligands*) espressi da gruppi allelici di classe I (*HLA-C group 2 alleles; HLA-C group 1 alleles; HLA-B alleles sharing the Bw4 specificity*). Nel trapianto aploidentico l'alloreattività NK è esercitata da quelle cellule NK, di origine dal donatore, che esprimono, come unico recettore inibitorio per il *self*, un KIR il cui ligando è assente sui bersagli allogeneici del ricevente. Pertanto esse riconoscono la mancata espressione del ligando KIR di classe I del donatore sulle cellule *target*, con conseguente azione litica. La probabilità per un paziente di disporre, nell'ambito familiare, di un donatore potenzialmente NK alloreattivo è di circa il 50%. In un recente aggiornamento, con un followup di oltre 18 anni, della casistica dei pazienti con LAM in CR1 o CR2 ad alto rischio, l'alloreattività NK si associò ad un'incidenza di recidiva oltremodo bassa (12%) e ad una soddisfacente LFS pari al 60%<sup>(13-15)</sup>. Per contro, l'incidenza di recidiva permase attorno al 35% nei pazienti con leucemia acuta linfoide (LAL) ed in quelli con LAM che non disponevano di un donatore potenzialmente alloreattivo.

L'inconveniente maggiore del trapianto aplo T-depleto è costituito dalla lenta ricostituzione immunologica a causa del basso numero di T linfociti presenti nell'inoculo e dell'addizionale T-deplezione esercitata *in vivo* dall'ATG. Nei 145 pazienti in CR1-CR2 al momento del trapianto, si osservò un'incidenza cumulativa di TRM pari al 36%, prevalentemente dovuta ad infezioni opportunistiche quali CMV o aspergillo.

Al fine di migliorare la ricostituzione immunologica, è stata proposta l'infusione post-trapianto di T linfociti del donatore patogeno-specifici, diretti contro il CMV, l'aspergillo o l'EBV<sup>(16-19)</sup>. Anche se efficaci, simili forme di immunoterapia adottiva sono di complessa attuazione, nella profilassi o nel trattamento di infezioni virali non responsive alla terapia. In alternativa, è stato propugnato l'impiego di T linfociti ad ampio repertorio, depletati di alloreattività tramite varie metodologie. Ad esempio, previa deplezione fotodinamica *ex vivo* con dibromorhodamine (TH9402), una dose di T linfociti pari a  $1-2 \times 10^6$ /kg si dimostrò in grado di favorire la ripresa immunologica senza indurre significativa GvHD<sup>(20,21)</sup>.

Un'altra interessante metodologia è basata sull'inserzione nelle cellule T del gene suicida timidinchinasi (cellule TK), al fine di determinarne la suscettibilità *in vivo* al ganciclovir<sup>(22,23)</sup>. Nei pazienti trattati con cellule TK l'incidenza di GvHD fu modesta ed, in una percentuale significativa, non richiese il trattamento con ganciclovir. In questi soggetti la ricostituzione immunologica venne sostenuta dalla progressiva comparsa in circolo di cellule T non esprimenti il gene TK, con caratteristiche proprie di un'origine timica recente e pertanto tolleranti nei riguardi del ricevente<sup>(24)</sup>. Altri tentativi miranti a favorire la ripresa immunologica sono basati su modifiche dei procedimenti di T-deplezione *ex vivo*, sostituendo alla immunoselezione positiva delle cellule CD34+, la selezione negativa dei progenitori

emopoietici da sangue periferico. Nello studio condotto da Handgretinger et al.<sup>(25)</sup> il prodotto leucaferetico è stato depletato solo delle cellule T con recettore  $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta$ +), in modo tale da preservare altre cellule effettrici quali cellule T TCR $\gamma\delta$  + e cellule NK. Le cellule T TCR $\gamma\delta$  + sono in grado di espletare risposte dirette contro gli stress sterili ed i patogeni<sup>(26)</sup>. Per converso non dovrebbero indurre GvHD, dacchè non riconoscono specifici antigeni peptidici presentati da molecole del maggiore complesso di istocompatibilità. La casistica dell'Università di Tubingen comprende bambini con LA in fase avanzata sottoposti a trapianto T TCR $\alpha\beta$ + depletato dopo regime di condizionamento chemioterapico. Locatelli et al.<sup>(27)</sup> hanno impiegato lo stesso tipo di inoculo, ma il condizionamento era basato sulla TBI. In ambedue gli studi, non fu impiegata una profilassi farmacologica della GvHD, anche se un'addizionale T deplezione venne esercitata *in vivo* dagli anticorpi anti T (ATG o OKT3) inclusi nel condizionamento. L'attecchimento si verificò in tutti i pazienti, con bassa incidenza di GvHD e rapida ricostituzione immunologica<sup>(27)</sup>. Risultati soddisfacenti con una sopravvivenza a 3 anni del 91% sono stati osservati anche in 23 bambini affetti da malattie non neoplastiche<sup>(28)</sup>.

La stessa metodologia è stata anche impiegata in uno studio pilota comprensivo di 25 adulti con età mediana di 45 anni affetti da LAM e da LAL<sup>(29)</sup>. Il regime di condizionamento comprendeva treosulfano, tiotepa, fludarabina ed ATG. Similmente a quanto riportato nella fascia pediatrica, l'incidenza di GvHD fu oltremodo modesta e del pari soddisfacente la TRM (10%). Ad un follow up mediano di 12 mesi, 10 dei 14 pazienti trapiantati in remissione sopravvissero in assenza di malattia.

Più recentemente, nuove strategie di prevenzione farmacologica della GvHD hanno consentito di superare la barriera di istocompatibilità senza far ricorso alla T deplezione *ex vivo*. Presso la Johns Hopkins University è stato messo a punto un metodo per la deplezione *in vivo* dei T linfociti alloreattivi basato sulla somministrazione di alte dosi di ciclofosfamide (Cy) in una stretta finestra temporale dopo il trapianto (trapianto aplo PT-Cy)<sup>(30)</sup>. La ciclofosfamide non lede le cellule staminali emopoietiche, ma al contempo esercita un controllo selettivo sull'espansione dei T linfociti alloreattivi proliferanti, venendo così a ridurre il rischio sia di GvHD che di rigetto. Le cellule T non-alloreattive e non-proliferanti sono relativamente preservate con conseguente effetto positivo sulla ricostituzione immunologica. Come ulteriore prevenzione della GvHD era anche prevista un'immunosoppressione post-trapianto standard con un inibitore della calcineurina e mycophenolate mofetil. Il regime di condizionamento, non-mieloablativo (NMA), comprendeva ciclofosfamide, fludarabina e basse dosi di TBI. Questa strategia si dimostrò molto tollerabile, con una bassa incidenza di GvHD (4% a 1 anno) e di TRM (15% a 2 anni), il che ne ha favorito un'ampia e rapida diffusione, a paragone dei livelli piuttosto statici di impiego del trapianto

da cordone<sup>(31)</sup>. D'altro canto, come in altre esperienze con trapianto non-mieloablativo, si osservò un'incidenza cumulativa di recidive superiore al 45%. L'impiego di regimi di condizionamento mieloablativi (MA), basati ad esempio sul busulfano o sulla TBI, ha consentito di ridurre il rischio di recidiva, ma con modesto o assente impatto sulla sopravvivenza a causa del parallelo incremento nella TRM, sostenuto dalla tossicità del condizionamento. Vari studi retrospettivi di confronto tra i risultati del trapianto aplo PT-Cy e del trapianto MUD, con l'impiego di condizionamenti non-mieloablativo (NMA) o mieloablativo (MA), documentano simili sopravvivenze in pazienti con LA, anche se sino al momento attuale non sono stati eseguiti studi randomizzati. L'analisi più ampia è stata effettuata da Ciurea et al.<sup>(32)</sup> usufruendo dei dati del Registro CIBMTR comprensivi di 192 trapianti aplo PT-Cy e 1.982 trapianti MUD effettuati in pazienti adulti con LAM. Dopo trapianto aplo PT-Cy MA e trapianto MUD MA la recidiva era del 44% *vs* 39% (p=0,37), la TRM del 14% *vs* 20%, (p=0,14), e la sopravvivenza globale OS del 45% *vs* 50%, (p=0,38). Nelle coorti dei pazienti sottoposti a condizionamento non-mieloablativo il trapianto aplo PT-CY era associato ad una maggiore incidenza di recidiva (58% *vs* 42%, p=0,001) e ad una migliore TRM (9% *vs* 23%, p=0,002), ma la OS non era significativamente differente (46% *vs* 44%, p=0,71).

In sintesi, nel trapianto aplo NMA il minor rischio di TRM era controbalanciato dal maggior rischio di recidiva; per contro, nei trapianti mieloablativi non si osservò nessun effetto connesso al tipo di donatore sui rischi di TRM e di recidiva. La causa predominante di insuccesso del trattamento rimase la recidiva post-trapianto che si verificò nel 39%-58% dei casi. Come atteso, il rischio di recidiva era maggiore per i pazienti con indice di rischio della malattia (DRI) alto a paragone di quelli con DRI basso o intermedio (HR, 3,17; 95% CI, 2,66-3,78; p<0,0001).

Ricercatori dell'Università di Pechino<sup>(33)</sup> hanno proposto una diversa strategia di controllo dell'alloreattività nel trapianto aplo basata sull'impiego di midollo osseo e progenitori emopoietici da sangue periferico G-CSF-*primed* e su un trattamento immunosoppressivo post-trapianto con ciclosporina, mycophenolate mofetil e metotrexate. Nello studio iniziale, tutti i 171 pazienti raggiunsero un attecchimento stabile, con un'incidenza di GvHD acuta di III-IV grado del 23% e di GvHD cronica del 47%. Le probabilità di TRM, recidiva e LFS erano rispettivamente del 19,5%, 12,2% e 68,2% nei pazienti a rischio standard e del 31,1%, 38,9% e 42,1% nei pazienti ad alto rischio. Un recente studio multicentrico prospettico effettuato in Cina,<sup>(34)</sup> comprensivo di 231 pazienti con LAM sottoposti a trapianto aplo in CR1, riporta una LFS a 3 anni del 74% con incidenze di recidiva del 15% e di TRM del 13%. Le incidenze cumulative di GvHD grado II-IV e grado III-IV furono del 36% e 10% rispettivamente, con una GvHD cronica del 42%. Risultati del tutto simili (LFS 78%; recidiva 15%; TRM 8%) vennero osser-

vati nella coorte di 219 pazienti trapiantati da familiare HLA-identico. Vi è una limitata esperienza con questa strategia al di fuori della Cina, ad eccezione del gruppo italiano *Rome Transplant Network*. Al fine di ridurre l'incidenza di GvHD acuta e cronica, Di Bartolomeo et al<sup>(35)</sup> hanno impiegato come inoculo il solo midollo osseo e hanno aggiunto il basiliximab per la prevenzione della GvHD. Un aggiornamento dello studio originale, comprensivo di 60 pazienti affetti da LA (46 LAM, 10 LAL) in CR1 e CR2 (*early phase*), riporta un'incidenza di GvHD acuta di grado II-IV e di grado III-IV del 24% e del 5%, rispettivamente. A 5 anni, la TRM fu del 34% e la recidiva del 28% con una LFS del 48%, a paragone del 27% nei 37 pazienti trapiantati in fase avanzata di malattia<sup>(36)</sup>.

I risultati di Wang et al<sup>(34)</sup> sono migliori di quelli riportati dalla stragrande maggioranza dei trapianti aplo, compreso lo studio di Arcese et al<sup>(36)</sup> in cui è stata impiegata una strategia simile. Anche se è problematico confrontare diverse esperienze, queste divergenze potrebbero essere dovute a varie cause. Ad esempio, nello studio cinese la popolazione dei pazienti sottoposti a trapianto aplo ha un'età media (23 anni) ed una percentuale di soggetti ad alto rischio di recidiva nettamente inferiore ad altri studi.

In conclusione, anche se sino al momento attuale non sono stati effettuati studi prospettici randomizzati, l'imponente mole di studi retrospettivi di confronto ed i risultati di studi di singole Istituzioni concordemente indicano come i trapianti da unità cordonale geneticamente non correlata o da donatore familiare HLA aploidentico debbano essere considerati quale valida opzione per i pazienti privi di donatore HLA-compatibile. Nessuna delle due sorgenti di cellule staminali appare chiaramente superiore, per cui la scelta tra trapianto da cordone o da familiare aploidentico dipende in gran parte dalla politica del singolo Centro.

Nel caso poi della scelta tra trapianto aplo T repleto o T depleto, l'analisi dei dati osservazionali da Registri non fornisce indicazioni pregnanti sulla strategia trapiantologica da seguire, a causa dell'estrema eterogeneità dei regimi di condizionamento, delle procedure di manipolazione midollare, dell'impiego o meno dell'immunosoppressione post-trapianto, dei farmaci eventualmente impiegati nella profilassi della GvHD. Deve essere però sottolineato come il trapianto aplo T depleto, con la sua capacità di prevenire la GvHD senza dover ricorrere ad un trattamento immunosoppressivo post-trapianto, rappresenta la piattaforma ideale per immunoterapie con cellule T miranti a potenziare l'effetto GvL e la ripresa immunologica. Un esempio significativo è costituito dall'immunoterapia adottiva con cellule T regolatorie e T convenzionali (vedi avanti). In un futuro prossimo la stessa piattaforma potrà essere utilizzata per infusioni di cellule del donatore con specifica azione antineoplastica, essendo sempre un prerequisito per simili trattamenti l'assenza di GvHD e di immunosoppressione post-trapianto.

## Prevenire la GvHD, preservando l'effetto GvL

Nelle sue linee essenziali, il trapianto allogenico, quale trattamento post-remissionale delle LA, segue a tutt'oggi la strategia disegnata da Donnal Thomas 50 anni or sono, che comprende: un regime di condizionamento atto a favorire l'attecchimento ed a ridurre l'entità della malattia residua; un inoculo (midollo osseo o progenitori emopoietici da sangue periferico) non manipolato, contenente, oltre alle cellule staminali emopoietiche, T linfociti ed altre cellule accessorie; una profilassi farmacologica della GvHD. Cruciale per il successo del trapianto è l'apporto dei T linfociti del donatore che riconoscono antigeni (minori o maggiori) di istocompatibilità del ricevente. Le allorisposte T linfoidi favoriscono l'attecchimento, venendo a spostare la bilancia immunologica ricevente-donatore a favore di quest'ultimo. Esse poi svolgono un ruolo essenziale nell'eradicazione della malattia minima residua, come storicamente dimostrato dalle seguenti osservazioni:

- incidenza più alta di recidive nel trapianto T depletato e nel trapianto da gemello identico a confronto del trapianto da fratello HLA-compatibile;
- incidenza più bassa di recidive nei pazienti con GvHD acuta e/o cronica a confronto di quelli senza GvHD;
- remissioni citogenetiche e molecolari indotte dall'infusione di linfociti del donatore dopo recidiva post-trapianto.

La lisi delle cellule leucemiche è prevalentemente sostenuta dal riconoscimento, sulla loro superficie, degli antigeni di istocompatibilità da parte di T linfociti alloreattivi, anche se possono verificarsi risposte ematopoietiche-specifiche e leucemico-specifiche<sup>(37)</sup>. D'altro canto, le stesse cellule T mediano anche la distruzione immunologica dei tessuti dell'ospite, un'importante causa di morbidità e mortalità. Il trattamento post-trapianto con farmaci immunosoppressori atti a prevenire la GvHD è, purtroppo, immunologicamente aspecifico ed in grado di compromettere lo stesso effetto GvL indotto dai T linfociti. In effetti, come precedentemente sottolineato, il trapianto T repleto si associa ad un'incidenza di recidiva non inferiore al 30-35% nelle LAL ad alto rischio indipendentemente dalla sorgente di cellule staminali (familiare HLA-compatibile, donatore HLA-compatibile da registro, unità di sangue cordonale geneticamente non correlata, familiare HLA-aploidentico). Nel caso, poi, del trapianto aplo T-depleto la paucità di T linfociti nell'inoculo cagiona un'incidenza di recidiva del tutto simile, ad eccezione dei pazienti con LAM trapiantati da donatori NK alloreattivi.

Preservare gli effetti positivi dei T linfociti del donatore - effetto GvL e ricostituzione immunologica - in assenza di GvHD rimane quindi la sfida centrale del trapianto. A questo fine, l'attenzione si è rivolta verso una sottopopolazione di cellule T CD4+CD25+ FoxP3+ con proprietà regolatorie (Treg) che fisiologicamente svolge un ruolo

chiave nel mantenimento della tolleranza nei riguardi del *self* e dell'omeostasi immunologica<sup>(38)</sup>.

Studi in modelli murini di trapianto incompatibile hanno dimostrato come cellule Treg, ove coinfuse con cellule T convenzionali (Tcon), sono in grado di prevenire la GvHD, sopprimendo la proliferazione dei T linfociti alloreattivi nei linfonodi e nei tessuti non linfoidi (cute, fegato, intestino, polmone). Esse, per contro, non bloccano l'espansione omeostatica dei T linfociti non-alloreattivi, favorendo così la ricostituzione immunologica<sup>(39-43)</sup>. Al contempo viene conservata, in assenza di GvHD, l'azione antineoplastica dei Tcon contro linee cellulari (cellule leucemiche A20, lymphoma BCL1 e mastocitoma P815)<sup>(44,45)</sup> e contro la leucemia umana mieloide in modelli murini umanizzati<sup>(46)</sup>.

Sulla base di questi dati sperimentali è stato disegnato un protocollo clinico di trapianto aplo T-depleto con immunoterapia adottiva con cellule Treg e Tcon<sup>(46,47)</sup>. In un recente aggiornamento di questi studi, sono stati inclusi 41 pazienti con LAM (22 CR1, 19 ≥ CR2) e 18 con LAL (12 CR1; 6 ≥ CR2) con età mediana di 40 anni (range 20-59). Il regime di condizionamento comprendeva TBI, tiotepa, fludarabina e ciclofosfamide (70/mg/kg) nei primi 25 pazienti, mentre nei rimanenti 34 vennero somministrati anticorpi anti-T (in sostituzione della ciclofosfamide) o 30 mg/kg di ciclofosfamide, con lo scopo di ridurre la tossicità extraematologica. Tutti i pazienti ricevettero cellule Treg (2,5±1x10<sup>6</sup>/kg) – purificate da sangue periferico tramite immunoselezione magnetica – seguite, al giorno 0, da cellule CD34+ (9±3,17x10<sup>6</sup>/kg) e cellule Tcon (1,1±0,6x10<sup>6</sup>/kg). Non venne somministrata alcuna immunosoppressione nel post-trapianto. Un attecchimento rapido si verificò in 57/59 pazienti. Come previsto in base ai dati preclinici, l'immunoterapia adottiva con Tregs naturali consentì la somministrazione di un alto numero di Tcon, con un'incidenza di GvHD oltremodo bassa (14%), ove si consideri che nel trapianto aplo, in assenza di immunosoppressione post-trapianto, la somministrazione di un quantitativo di cellule T pari a 1x10<sup>4</sup>/kg - quindi di due log inferiore - provoca GvHD fatale. A paragone dei controlli storici, il *pool* periferico di cellule T aumentò rapidamente, con frequenze relativamente elevate di linfociti CD4+ e CD8+ patogeno-specifici. Nella coorte pilota, in cui venne testata per la prima volta l'immunoterapia con cellule Treg, la LFS a 6 anni risultò essere pari al 50% a causa di un'elevata TRM. Molti pazienti erano ad alto rischio per essere stati pesantemente pretrattati o per avere in atto, prima del trapianto, un'aspergillosi invasiva. Nel successivo gruppo di 34 pazienti - il cui regime di condizionamento comprendeva anticorpi anti T o ciclofosfamide a dosaggio ridotto - la LFS fu del 61% con TRM del 22%. Nell'intera casistica, l'incidenza cumulativa di recidiva, ad un follow up mediano di 44 mesi, fu oltremodo bassa (0,09) ove si consideri che questi pazienti erano ad alto rischio di recidiva per citogenetica, markers molecolari e fase di malattia.

Un'ipotesi circa i meccanismi con cui le cellule Treg impediscono alle cellule Tcon di indurre GvHD, ma al contempo ne consentono l'effetto GvL può essere formulata sulla base di una serie di studi, nei modelli animali e nell'uomo, che riguardano le interazioni tra Treg e Tcon e la migrazione delle cellule Treg nei tessuti del ricevente. Edinger et al<sup>(44)</sup> hanno dimostrato che le cellule Treg alloantigene-specifiche bloccavano, a livello dei linfonodi, la proliferazione delle cellule Tcon alloreattive, prevenendone così la capacità di indurre GvHD. D'altro canto non ne veniva inibita l'attivazione per cui le Tcon conservavano la potenzialità citotossica allogenica. Studi nel topo umanizzato<sup>(46)</sup>, infuso con cellule umane Treg e Tcon e senza manifestazioni di GvHD, hanno evidenziato che le cellule Treg venivano a localizzarsi a livello della milza e del fegato, ma non nel midollo osseo. Le cellule Tcon prelevate dalla milza e dal fegato non mostravano alloreattività nei riguardi del *target* allogenico, essendo verosimilmente sotto il controllo delle Treg, mentre le cellule Tcon prelevate dal midollo osseo conservavano la capacità di lisare *in vitro* i *targets* allogenici (cellule umane di LAM e blasti PHA autologhi).

Pertinenti sono inoltre le seguenti osservazioni che riguardano l'*homing* delle Treg, in rapporto all'espressione di CXCR4, e la loro funzione a livello della nicchia della cellula staminale: da una parte, Booth et al<sup>(48)</sup> hanno osservato che nell'uomo le cellule Treg CD45RO+ con bassa espressione di CXCR4 si localizzavano a livello cutaneo, mentre le cellule Treg CD45RA+ con alta espressione di CXCR4 erano presenti nel midollo osseo; dall'altra, in un modello murino di trapianto allogenico non irradiato, Fujisaki et al<sup>(49)</sup> hanno dimostrato che le cellule Treg FoxP3+ del ricevente si disponevano in clusters a livello della superficie endosteale, tutt'attorno alle cellule staminali emopoietiche provenienti dal donatore, proteggendole dall'attacco immunologico dei linfociti alloreattivi del ricevente. All'ablazione delle cellule Treg, faceva seguito il rigetto delle cellule staminali del donatore.

Sulla base di queste osservazioni, nel caso del trapianto umano, potrebbe essere formulata la seguente ipotesi di lavoro:

- le cellule Treg del donatore alloantigene-specifiche 100% CD45RO+, dopo essere andate incontro ad attivazione ed espansione a livello dei linfonodi, migrano in periferia (cute, polmone, fegato, intestino), in funzione dell'espressione delle molecole di *homing* per i vari tessuti, ed ivi esercitano un ulteriore controllo dei Tcon alloantigeni-specifici, contribuendo così alla prevenzione della GvHD;
- le stesse Treg, a causa della bassa espressione di CXCR4, non sono in grado di localizzarsi nel midollo osseo, e pertanto la nicchia della cellula staminale manca dell'ombrello protettivo da loro esercitato;
- le cellule Tcon alloreattive sono, quindi, libere di espletare la loro azione litica contro le cellule leucemiche ivi presenti.

In conclusione, il trapianto aloplo con immunoterapia adottiva con cellule Treg e Tcon fa sì che la reazione trapianto contro ospite sia confinata al solo midollo osseo, venendosi così a separare la GvHD dall'effetto GvL. Non necessitando di profilassi farmacologica della GvHD - che peraltro compromette l'effetto GvL - l'infusione di un quantitativo di Tcon pari a  $1 \times 10^6$ /kg riduce in maniera marcata l'usuale incidenza di recidiva (30%-45%) che si verifica nel trapianto T repleto. Inoltre, nei pazienti affetti da LAM trapiantati da donatori NK alloreattivi, le cellule NK e le cellule Tcon contribuiscono entrambe a sviluppare un potente effetto GvL in assenza di GvHD: in effetti, sino al momento attuale, nessuna recidiva è stata osservata in questa coorte di soggetti.

Un problema connesso all'impiego di cellule Treg naturali riguarda il quantitativo collezionabile da un donatore, che in genere è attorno a  $2 \times 10^6$  /kg di peso corporeo del ricevente. Dacchè il

rapporto ottimale tra Treg e Tcon per la prevenzione della GvHD è pari a 2:1, il quantitativo di Tcon da infondere non supera  $1 \times 10^6$ /kg. Questi limiti possono essere superati con l'impiego di cellule Treg espanse *in vitro*. Per esempio, Brunstein et al.<sup>(50)</sup> hanno utilizzato, nel trapianto non manipolato di doppia unità cordonale, l'infusione di un numero di Treg sino a  $100 \times 10^6$ /kg, dimostrando una rilevante riduzione dell'incidenza di GvHD rispetto ai controlli storici.

Rimane da stabilire quale strategia sia la più efficace, tenendo conto, d'altro canto, che i sistemi di espansione delle Treg richiedono procedure GMP costose, non sempre disponibili e che, talora, non vengono raggiunti i quantitativi cellulari prefissati.

Comunque, sia che siano impiegate Treg naturali o Treg espanse, è di fondamentale importanza che non sia effettuato alcun trattamento immunosoppressivo post-trapianto, pena la compromissione dell'effetto GvL.

## Bibliografia

- Gupta V, Tallman MS, He W, Logan BR, Copelan E, Gale RP, et al. Comparable survival after HLA-well matched unrelated or matched sibling donor transplantation for acute myeloid leukemia in first remission with unfavorable cytogenetics at diagnosis. *Blood*. 2010;115(11):1839-1848.
- Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2001;344(24):1815-1822.
- Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2005;105(3):1343-1347.
- Eapen M, Rocha V, Sanz G, Scaradavou A, Zhang MJ, Arcese W, et al. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11(7):653-660.
- Scaradavou A, Brunstein CG, Eapen M, Le-Rademacher J, Barker JN, Chao N, et al. Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia. *Blood*. 2013;121(5):752-758.
- Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, et al. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med*. 1985;313(13):765-771.
- Kernan NA, Flomenberg N, Dupont B, O'Reilly RJ. Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia: identification of host-derived antidonor alloctotoxic T lymphocytes. *Transplantation*. 1987;43(6):842-847.
- Bachar-Lustig E, Rachamim N, Li HW, Lan F, Reisner Y. Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. *Nat Med*. 1995;1(12):1268-1273.
- Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Giannoni C, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood*. 1994;84(11):3948-3955.
- Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med*. 1998;339(17):1186-1193.
- Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full haplo-type-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3447-3454.
- Ciceri F, Labopin M, Aversa F, Rowe JM, Bunjes D, Lewalle P, et al. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. *Blood*. 2008;112(9):3574-3581.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-2100.
- Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007;110(1):433-440.
- Velardi A, Ruggeri L, Mancusi A, Aversa F, Christiansen FT. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(5):525-530.
- Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, Topini F, Ruggeri L, Carotti A, et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood*. 2005;106(13):4397-4406.
- Feuchtinger T, Opher K, Bethge WA, Topp MS, Schuster FR, Weissinger EM, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2010;116(20):4360-7.
- Comoli P, Schilham MW, Basso S, van Vreeswijk T, Bernardo ME, Maccario R, et al. T-cell lines specific for peptides of adenovirus hexon protein and devoid of alloreactivity against recipient cells can be obtained from HLA-haploidentical donors. *J Immunother*. 2008;31(6):529-36.
- Leen AM, Christin A, Myers GD, Liu H, Cruz CR, Hanley PJ, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114(19):4283-92.
- Mielke S, Nunes R, Rezvani K, Fellowes VS, Venne A, Solomon SR, et al. A clinical-scale selective allopeletion approach for the treatment of HLA-mismatched and matched donor-recipient pairs using expanded T lymphocytes as antigen-presenting cells and a TH9402-based photodepletion technique. *Blood*. 2008;111(8):4392-402.
- Roy DC, Guerin M, Boumedine RS, Lachance S, Cohen S, Sauvageau G, et al. Reduction in incidence of severe infections by transplantation of high doses of haploidentical T cells selectively depleted of alloreactive units. [Abstract] *ASH Annual Meeting 2011*;118(21):3020.

22. Marktel S, Magnani Z, Ciceri F, Cazzaniga S, Riddell SR, Traversari C, et al. Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*. 2003;101(4):1290-8.
23. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, Bondanza A, Traversari C, Salomoni M, et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):489-500.
24. Vago L, Oliveira G, Bondanza A, Noviello M, Soldati C, Ghio D, et al. T-cell suicide gene therapy prompts thymic renewal in adults after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2012;120(9):1820-30.
25. Handgretinger R, Lang P, Feuchtinger TF, Schumm M, Teltschik HM, Schulz AS, et al. Transplantation of TcR $\alpha\beta$ /CD19 depleted stem cells from haploidentical donors: robust engraftment and rapid immune reconstitution in children with high risk leukemia. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2011;118:1005.
26. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):336-45.
27. Airoidi I, Bertaina A, Prigione I, Zorzoli A, Pagliara D, Cocco C, et al.  $\gamma\delta$ -T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR $\alpha\beta$ /CD19+ lymphocytes. *Blood*. 2015;125(15):2349-2358.
28. Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of  $\alpha\beta$ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood*. 2014;124(5):822-6.
29. Prezioso L, Bonomini S, Lambertini C, Schifano C, Rossetti E, Monti A, et al. Haploidentical Stem Cell Transplantation After Negative Depletion Of T Cells Expressing The Chain Of The T-Cell Receptor (TCR) For Adults With Hematological Malignancies. *Blood*. 2013;122: 4609 (abstract).
30. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):641-50.
31. Passweg J, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(4):476-82.
32. Ciurea SO, Zhang M-J, Bacigalupo A, Bashey A, Appelbaum FR, Aljaitawi OS, et al. Haploidentical transplant with post-transplant cyclophosphamide versus matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126:1033-1040.
33. Huang X-J, Liu D-H, Liu K-Y, Xu LP, Chen H, Han W, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplantation*. 2006;38(4):291-7.
34. Wang Y, Liu QF, Xu LP, Wang Y, Liu QF, Xu LP, et al. Haploidentical vs identical-sibling transplant for AML in remission: a multicenter, prospective study. *Blood*. 2015;125(25):3956-3962.
35. Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, Picardi A, Cudillo L, Cerretti R, et al. Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies. *Blood*. 2013;121(5):849-57.
36. Arcese W, Picardi A, Santarone S, De Angelis G, Cerretti R, Cudillo L, et al. Haploidentical, G-CSF-primed, unmanipulated bone marrow transplantation for patients with high-risk hematological malignancies: an update. *Bone Marrow Transplant* 2015;50, S24-S30.
37. Rezvani K, Barrett AJ. Characterizing and optimizing immune responses to leukaemia antigens after allogeneic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21(3):437-453.
38. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-1164.
39. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2002;196(3):389-399.
40. Nguyen VH, Zeiser R, Dasilva DL, Chang DS, Beilhack A, Contag CH, et al. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood*. 2007;109(6):2649-2656.
41. Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS, Ho L, Kambham N, Bachmann M, et al. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2008;111(2):945-953.
42. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)/CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002;99(10):3493-3499.
43. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 2002;196(3):401-406.
44. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144-1150.
45. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1688-1696.
46. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood*. 2014;124: 638-644.
47. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921-3928.
48. Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, Kissane S, Agius E, Jackson SE, et al. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol*. 2010;184(8):4317-4326.
49. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, Silberstein L, Putheti P, Larocca R, et al. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the hematopoietic stem-cell niche. *Nature*. 2011;474(7350):216-219.
50. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, Hippen KL, DeFor TE, Sumstad D, et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood*. 2016;127(8):1044-1051.

## Parole Chiave

Trapianto da sorgenti alternative, trapianto aplo T depleto, leucemia acuta, effetto GvL, cellule T regolatorie

## Indirizzi per la corrispondenza

*Massimo Fabrizio Martelli*

Professore Emerito, Università di Perugia

Tel: (+39) 0755728686

E-mail: mfmartelli39@gmail.com

## Si ringrazia

Si ringrazia l'Associazione Umbra Leucemie e Linfomi (AULL) per aver contribuito, con un sostegno economico, alla realizzazione di alcune ricerche descritte in questa rassegna



# Scelta del donatore di cellule staminali



*William Arcese, Raffaella Cerretti, Laura Cudillo, Gottardo De Angelis, Alessandra Picardi*

*Università di Roma Tor Vergata, Roma  
UOC Trapianto Cellule Staminali, Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione  
Rome Transplant Network*

## Introduzione

Le numerose innovazioni intervenute nel campo del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (CSE) hanno determinato la necessità di una sempre maggiore definizione delle caratteristiche biologiche e cliniche del binomio ricevente/donatore al fine di selezionare il donatore ottimale da utilizzare a fini trapiantologici. Partendo dal presupposto che il germano HLA identico possa ancora essere considerato come il miglior donatore, la questione che a tutt'oggi resta assai controversa e oggetto di grande dibattito è rappresentata dalla seguente domanda: qual è il miglior donatore alternativo per i pazienti che non dispongono di donatore familiare HLA compatibile?

Nella corrente strategia trapiantologica, le fonti più comunemente utilizzate come donatore alternativo sono il donatore non familiare HLA compatibile *matched unrelated donor* (MUD) o incompatibile *mismatched unrelated donor* (MMUD), inteso sia come donatore adulto da Registro internazionale che come unità di sangue cordonale, o il donatore familiare aploidentico. Nel tempo, il progressivo incremento del numero di donatori alternativi con la possibilità di attingere a fonti diverse e il raffinamento delle tecniche e dei protocolli per la profilassi della *graft versus host disease* (GvHD) hanno permesso di superare il limite imposto dal rispetto della compatibilità immunogenetica tra donatore e ricevente. Pertanto, oltre il 90% dei pazienti dispone oggi di un potenziale donatore alternativo. Altri fattori, quali ad esempio la patologia di base del paziente e l'urgenza trapiantologica, contribuiscono a definire il percorso da seguire nella ricerca del donatore. In quest'ottica e nei limiti di quanto è oggi possibile disporre su una materia in rapida evoluzione, l'obiettivo del presente capitolo consiste nel guidare il lettore nell'utilizzare in maniera corretta le conoscenze attualmente disponibili per identificare un algoritmo di selezione del donatore alternativo di CSE e nel valutare, ai fini dell'outcome trapiantologico, i parametri clinici e biologici più significativi nella scelta del miglior candidato tra gli eventuali, molteplici donatori disponibili per lo stesso paziente.

## Il sistema maggiore di istocompatibilità

Alla base della bio-immunologia del trapianto allogenico di CSE è il sistema maggiore di istocompatibilità (MHC), un complesso genico atto a determinare la costituzione dei loci HLA (*Human Leukocyte Antigens*) dotato del più elevato grado di polimorfismo presente nel genoma umano e, pertanto, caratterizzato da sequenze nucleotidiche estremamente variabili <sup>(1)</sup>. Esso è situato sul braccio corto del cromosoma 6 (p21.3), ha una lunghezza di circa 4000 kilobasi e rappresenta un millesimo dell'intero genoma umano. I loci HLA sono distinti in Classe I (HLA-A, B, C) e Classe II (HLA-DR, DQ, DP) con differenze sia nella struttura che nelle funzioni. Le molecole di Classe I sono costituite da una catena di 43.000 dalton divisa in tre porzioni, citoplasmatica, transmembranaria ed extracellulare, quest'ultima con tre domini ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), associati in modo non covalente con la  $\beta 2$  - microglobulina, proteina non polimorfica, codificata da un gene localizzato sul cromosoma 15. Le molecole di Classe II sono formate da una catena  $\alpha 1$  (34.000 dalton) legata a una catena  $\beta 1$  (28.000 dalton), che, come le molecole di Classe I, presentano una porzione intracitoplasmatica, una transmembranaria ed una extracellulare. Mentre le molecole di Classe I sono virtualmente presenti su ogni cellula nucleata e sulle piastrine, quelle di Classe II sono espresse soltanto sulle cellule immunocompetenti, come i linfociti B, le cellule T attivate, i monociti, i macrofagi, le cellule di Langherans e dendritiche. Ciascun individuo dispone da 10 a 12 geni che codificano per HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ e -DP. La gran parte di questi geni sono altamente polimorfici, con un range di variabilità allelica compresa tra poco più di 20 per il locus HLA-DRB4 e oltre 4000 per il locus HLA-B. Negli ultimi tre decenni, l'elevata diversità allelica di questi loci è stata ben evidenziata attraverso l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare, caratterizzate da un comune denominatore, l'amplificazione con PCR del DNA, con la formulazione di una nuova nomenclatura <sup>(2)</sup>. Lo sviluppo della PCR nel 1985 ha permesso in particolare di studiare i polimorfismi che caratterizzano gli esoni 2 e 3 dei geni di Classe I e l'esone 2 dei geni di Classe II dell'HLA, dove la maggior parte delle variazioni al-

leliche sono rappresentate. Le molecole HLA di Classe I e II giocano un ruolo critico nella risposta immunitaria sia cellulo-mediata che umorale in quanto fungono da segnale per le cellule T circolanti nel riconoscimento di antigeni non *self*, cioè non appartenenti all'ospite. I cloni linfocitari che riconoscono antigeni *self* vengono eliminati durante la maturazione dei linfociti T mediante un processo di selezione cellulare, che distrugge o inibisce i linfociti T autoreattivi. Tale processo rappresenta il presupposto biologico della cosiddetta tolleranza immunologica.

Il riconoscimento degli antigeni estranei avviene mediante l'interazione tra gli antigeni stessi, presentati all'interno di una vera e propria tasca dalle molecole dell'MHC, ed un recettore presente sui linfociti T (*T Cell Receptor*, TCR), specifico per ciascun antigene. Relativamente al diverso profilo di espressione delle molecole del sistema MHC, i linfociti T possono essere ristretti per la Classe I o II. Infatti, le molecole di Classe I, espresse costitutivamente su tutte le cellule nucleate, e gli antigeni ad esse legate, derivati soprattutto da patogeni intracellulari come i virus, vengono riconosciuti selettivamente dai linfociti T con fenotipo CD8+. Le molecole di Classe II, generalmente espresse sulle cellule immunitarie, legano antigeni o parti di essi, che vengono riconosciuti prevalentemente dai linfociti T CD4+. Grazie a questa variabilità genetica, il sistema HLA è in grado di legare un'ampia selezione di antigeni potenzialmente patogeni e di innescare una valida risposta immunitaria cellulo-umorale. La validità del sistema immunitario di un individuo è potenziata dalla liberazione di citochine prodotte nel corso delle risposte immunitarie innate e specifiche, che aumentano l'espressione delle molecole HLA sia a livello tissutale che cellulare<sup>(1)</sup>.

Oltre agli antigeni maggiori dell'MHC, esistono anche antigeni minori di istocompatibilità (miHags). Gli antigeni minori di istocompatibilità sono peptidi derivati da proteine del *self*, altamente polimorfiche, normalmente processate nel contesto dell'HLA e presentati ai linfociti T del donatore<sup>(3)</sup>. Gli miHags sono codificati da geni diallelici che danno luogo ad una variante per la quale le molecole HLA presentano un'alta affinità, immunogena, ed una per la quale le molecole HLA presentano una bassa affinità, non immunogena. Alcuni di essi vengono codificati da geni presenti sui cromosomi sessuali, con migliore caratterizzazione di quelli correlati con il cromosoma Y. È noto che un antigene minore di istocompatibilità può differire nella distribuzione tissutale e nella molecola HLA di restrizione. Le evidenze scientifiche dimostrano che alcuni antigeni miHags, come l'antigene *sex-linked* codificato dal gene SMCY, sono espressi in maniera ubiquitaria, mentre altri come l'antigene *sex-linked* codificato dal gene UTY ed i geni autosomici HA-1 e HA-2, sono selettivamente espressi sulle cellule emopoietiche<sup>(4-6)</sup>. Il rigetto e la GvHD sono innescati dal *mismatch* allelico del complesso HLA della coppia donatore-ricevente<sup>(7-8)</sup>. Presupposto fondamentale perché donatore e ricevente siano istocompatibili è in

entrambi l'espressione tissutale di antigeni e alleli geneticamente identici. Tale condizione permette al tessuto trapiantato di sopravvivere e previene la reazione del ricevente contro il donatore o, come nella GvHD, del donatore contro il ricevente. Nel trapianto di organi solidi i linfociti T del ricevente riconoscono gli antigeni dei tessuti trapiantati, o attraverso le molecole HLA espresse sulle cellule presentanti l'antigene (*antigen presenting cell*; APC) del donatore, processo diretto, o attraverso la processazione delle molecole HLA del donatore da parte delle APC del ricevente e l'esposizione dei peptidi che ne derivano su molecole HLA *self*, processo indiretto. Nel trapianto di CSE, l'assenza nell'ospite di linfociti T immunologicamente competenti permette ai linfociti T del donatore di riconoscere come non *self* gli antigeni del ricevente, presentati dalle molecole HLA del ricevente stesso.

Per stabilire quali antigeni del complesso HLA siano presenti in ciascun individuo e per valutare il grado di compatibilità della coppia donatore-ricevente, si procede alla tipizzazione HLA mediante tecniche specifiche, oggi prevalentemente di tipo molecolare. Il vantaggio correlato alla definizione molecolare degli antigeni maggiori di istocompatibilità consiste nell'identificazione di disparità alleliche piuttosto che antigeniche, consentendo una più accurata analisi del sistema HLA nella coppia donatore-ricevente. La compatibilità allelica del sistema HLA in un trapianto allogenico di CSE, migliora l'attecchimento e riduce, senza tuttavia eliminarlo, il rischio di GvHD suggerendo l'esistenza di fattori concorrenti.

Nel contesto di un trapianto HLA-identico, l'allorreattività si esplica attraverso il riconoscimento degli antigeni minori di istocompatibilità del ricevente, trasportati dalle molecole HLA del ricevente stesso ed identificati come estranei dal TCR dei linfociti T del donatore<sup>(6)</sup>. Numerose acquisizioni scientifiche hanno suggerito che gli antigeni miHags espressi sulle cellule emopoietiche potrebbero essere espressi anche sulle cellule tumorali, rappresentando un interessante *target* per l'induzione delle cellule T del donatore, responsabili, oltre che dell'effetto GvHD, anche dell'attività immunoterapeutica del trapianto stesso, definita *Graft-versus-Tumor*.

## Metodiche di tipizzazione HLA

Alla base di ogni trapianto di CSE vi è il test di compatibilità HLA della coppia donatore-ricevente che, per legge, deve essere ripetuto due volte su campioni prelevati in momenti diversi per confermare il livello di compatibilità selezionato. Il primo test HLA viene chiamato test di compatibilità iniziale e il secondo test, effettuato sul binomio donatore/ricevente, viene definito test di compatibilità finale. A seconda della tipologia di trapianto da effettuare, verranno eseguite tipizzazioni HLA più o meno estese. Tuttavia, per confermare l'identità HLA della coppia donatore-ricevente è necessario disporre o di una tipizzazione HLA in alta risoluzione effettuata su 12 loci del sistema HLA o di avere nell'ambito familiare la possibilità di definire la segregazione aplo-tipica.

Attualmente le più comuni metodiche per l'identificazione di specifici polimorfismi sono di tipo molecolare ed includono: PCR-SSP (*sequence-specific primers*), PCR-SSO (*sequence-specific oligonucleotides*) e PCR-SBT (*sequencing-based typing*). La tipizzazione HLA mediante PCR-SSP prevede l'amplificazione di una sequenza di DNA bersaglio con coppie di *primers* studiate in modo da essere perfettamente complementari solo ad un allele o a un gruppo di alleli <sup>(9)</sup>. Nella metodica di PCR-SSO il processo della PCR è usato solo come procedimento di amplificazione di un determinato tratto di DNA, allo scopo di ottenerne quantità elevate, dove siano contenuti tutti i loci HLA di interesse <sup>(10)</sup>. La tipizzazione HLA in questo caso richiede quindi una fase di post-amplificazione per discriminare i diversi alleli. Il prodotto della reazione PCR viene denaturato e fatto successivamente reagire con sonde di DNA complementari, coniugate a marcatori fluorescenti, al fine di consentirne la rivelazione. L'assegnazione della tipizzazione HLA si basa pertanto sul pattern della reazione di fluorescenza confrontato con quello di sequenze note descritte negli specifici database. La metodica di PCR-SBT, inventata da Sanger, rappresenta il metodo più completo per la caratterizzazione dei polimorfismi della regione HLA <sup>(11)</sup>. La tecnica prevede l'utilizzo di una polimerasi che sia in grado di aggiungere specificamente alla catena di DNA in formazione, oltre ai normali nucleotidi, anche dei dideossiribonucleotidi. Questi ultimi hanno la caratteristica di bloccare la sintesi del DNA, impedendo quindi alla polimerasi di aggiungere altri nucleotidi, e di permettere pertanto la formazione di filamenti di DNA di diversa lunghezza. I diversi frammenti di DNA così ottenuti vengono analizzati tramite un laser, posizionato all'interno di un sequenziatore automatico, che rileva l'ultimo didossinucleotide di ogni filamento, permettendo di risalire alla esatta sequenza del DNA in esame. Infine, da pochissimi anni sono disponibili nei laboratori di tipizzazione HLA nuove metodiche, note come NGS (*Next Generation Sequencing*). L'applicazione in routine di queste nuove tecniche, basate non più sul sequenziamento Sanger, permetterà di evidenziare con certezza assoluta i diversi alleli HLA. Nonostante le diverse piattaforme commerciali propongano l'utilizzo di diversi principi chimici nell'applicazione della NGS, una comune strategia è rappresentata dal fatto che il DNA template viene adeso o immobilizzato su una superficie solida. Tale immobilizzazione di molecole spazialmente separate permette di eseguire simultaneamente milioni di reazioni di sequenziamento. Attualmente, al fine di rendere l'esame *low cost*, si rende necessario eseguire numerose tipizzazioni HLA contemporaneamente, il che costituisce anche un limite di corrente applicazione di questa metodica. In futuro, una strategia di centralizzare le tipizzazioni HLA a livello nazionale o l'avvento di piattaforme NGS utilizzabili per un numero limitato di campioni biologici disegneranno nei prossimi anni i nuovi scenari legati alla tipizzazione HLA.

## Tipologia di donatore allogenico

La condizione necessaria per eseguire un trapianto allogenico di CSE è rappresentata dalla disponibilità di un donatore HLA compatibile. L'estremo polimorfismo del sistema HLA nell'ambito della popolazione generale consente di reperire un donatore compatibile solo nel 30% dei casi in ambito familiare, definito donatore correlato. Tale percentuale aumenta relativamente al numero di fratelli di cui dispone il paziente ed è ricavabile grazie alla seguente formula matematica:  $1 - (0,75)^{n^{\text{fratelli}}}$ . Il trapianto da donatore correlato viene definito singenico quando donatore e ricevente sono gemelli monozigoti e risultano pertanto genotipicamente identici sia per gli antigeni maggiori che minori dell'HLA, tanto che in questi casi la procedura trapiantologica non necessita di immuno-profilassi contro rigetto e GVHD. Nel caso in cui il donatore sia rappresentato da un fratello gemello, non sono sufficienti le metodiche sopra citate di tipizzazione HLA per affermare che si tratti di un trapianto singenico, ma il dato va confermato mediante un ulteriore test genetico chiamato test di zigosità, <sup>(12)</sup> che è un confronto tra profili specifici di marcatori genetici ed è in grado pertanto di determinare in maniera definitiva se i gemelli siano monozigoti (identici) o eterozigoti, non identici. Nel caso in cui il paziente non abbia un donatore correlato HLA-identico, è necessario identificare un donatore alternativo, termine che include tutti i potenziali donatori familiari/correlati o non, diversi dal fratello germano HLA identico, e cioè il donatore volontario da Registro Internazionale, l'unità di sangue di cordone ombelicale da banca e il donatore familiare aploidentico. Oggi è possibile reperire un donatore non correlato compatibile o semicompatibile, o nell'ambito dei Registri Internazionali di donatori volontari di midollo osseo (*Bone Marrow Donor Worldwide*) o nell'ambito del Network di Banche di sangue di cordone ombelicale (SCO). Rivolgendosi ai Registri Internazionali di donatori volontari di midollo osseo, circa il 75% dei pazienti caucasici identifica un donatore 8/8 HLA allelicamente compatibile, probabilità che, tuttavia, si riduce in maniera drastica per i pazienti appartenenti ad etnie minori, dal momento che i donatori volontari iscritti ai Registri sono prevalentemente di razza caucasica <sup>(13-15)</sup>. Recenti studi hanno dimostrato che i tempi di identificazione del Donatore da Registro sono diventati estremamente rapidi grazie alla più completa tipizzazione HLA dei donatori e dei riceventi al momento di attivazione della ricerca, tanto che estendere una ricerca oltre 2 mesi aumenta la possibilità di identificare il donatore solo del 5% con 1 punto di incremento per anno <sup>(16)</sup>. Rivolgendosi simultaneamente alle Banche SCO, la probabilità di identificare un donatore aumenta fino a circa il 70% anche per le etnie meno rappresentate, grazie alle peculiarità biologiche di questa fonte di CSE che ne permettono l'utilizzo clinico anche nel caso di reperimento di unità SCO solo parzialmente compatibili con il paziente <sup>(15)</sup>.

Attualmente, i donatori volontari iscritti nell'ambito dei Registri In-

ternazionali risultano essere oltre 25 milioni mentre le unità SCO disponibili in tutto il mondo sono oltre 650.000<sup>(17)</sup>.

Oltre alla possibilità di utilizzare unità SCO per un paziente che non dispone di donatore compatibile né familiare né da Registro, l'alternativa terapeutica è rappresentata dall'uso del donatore familiare non compatibile o aploidentico. Dal momento che i geni del sistema HLA vengono trasmessi come una regione unica, definita aplotipo, per metà dal padre e per metà dalla madre, ogni paziente che dispone di un genitore o di un figlio è dotato di un potenziale donatore aploidentico. Trattandosi di un trapianto incompatibile, tale procedura è quanto mai complessa e prevede l'uso di una severa immunosoppressione che può essere eseguita o *in vitro*, attraverso tecniche di deplezione dei linfociti T, o *in vivo* attraverso l'uso di combinazioni di molteplici farmaci immunosoppressori. Il trapianto aploidentico, costituendo una potenziale e rapida opzione terapeutica per oltre il 90% dei pazienti e permettendo di ottenere risultati clinici quanto mai promettenti, rappresenta ormai una valida e consolidata alternativa trapiantologica. Sebbene introdotto più recentemente nella pratica clinica e pur in assenza di studi prospettici controllati, il trapianto aploidentico sia nelle più recenti versioni di T-deplezione<sup>(18,19)</sup> che nelle modalità di trapianto di CSE non manipolato<sup>(20-25)</sup>, sembra competere con le altre opzioni di trapianto da donatore alternativo (MUD, MMUD e SCO)<sup>(26,27)</sup> e, per alcune osservazioni, con lo stesso trapianto da donatore familiare HLA compatibile<sup>(28)</sup>.

### Caratteristiche del paziente

Molteplici sono i fattori del binomio donatore/ricevente che incidono sul decorso clinico del trapianto. A tal proposito, sono stati calcolati numerosi *score* basati sulle caratteristiche cliniche del paziente che consentono di definirne la prognosi trapiantologica e che rappresentano valide linee guida per il clinico nel giudizio di eleggibilità finale del paziente alla procedura stessa. Tra i più accreditati vanno menzionati l'indice di comorbidità secondo Sorror (HCT-I) e l'EBMT index<sup>(29-33)</sup>.

L'HCT-I, proposto nel 2004, è uno strumento molto efficace nella valutazione pre-trapianto della prevalenza e severità dei possibili danni d'organo del paziente con significativo valore prognostico sul decorso post-trapianto. In particolare, l'HCT-I si basa sul calcolo dell'effetto di 17 possibili patologie concomitanti al trapianto, per le quali è stato identificato un peso prognostico con impatto significativo sugli indici di outcome trapiantologico, quali la mortalità non legata alla recidiva di malattia (*non relapse mortality*, NRM) e la sopravvivenza globale a 2 anni. Il limite di questo strumento, rappresentato dalla variabilità individuale del clinico nella definizione della severità delle comorbidità stesse, è stato superato nel corso degli anni grazie ad appositi programmi di formazione volti alla standardizzazione dei metodi di valutazione clinica dei parametri cruciali ai fini del calcolo dello *score* stesso (Tabella 1). L'HCT-I<sup>(32,33)</sup> è stato revisionato nel 2005<sup>(30)</sup> e più recentemente nel 2014<sup>(34)</sup> ai fini di as-

sociare il fattore età alle comorbidità precedentemente identificate. Infatti, l'età del paziente da sempre rappresenta un limite per le procedure trapiantologiche in quanto correla significativamente con gli indici di outcome, indipendentemente dalla patologia di base. Tuttavia, grazie alla possibilità di effettuare il trapianto allogenico utilizzando regimi di condizionamento ad intensità ridotta (RIC), le casistiche pubblicate sul trapianto allogenico negli ultimi 10 anni riportano in alcuni casi valori massimi di età anche fino a 75 anni. Anche in Italia è stato gradualmente innalzato il limite di età massima dei pazienti da sottoporre a trapianto allogenico di CSE e, in particolare, dal 2015 gli standard dell'*Italian Bone Marrow Donor Registry*<sup>(35)</sup> consentono di attivare la procedura di selezione del donatore non correlato per pazienti che abbiano compiuto 70 anni, con particolare attenzione alla fascia di età compresa tra 65 e 70 anni, che deve rispettare un limite di HCT-I < 3 per poter accedere a tale alternativa trapiantologica. Sulla base dei più recenti risultati, nel nuovo HCT-I composito, età/comorbidità, per pazienti di età >40 anni viene calcolato relativamente alla NRM un *Hazard Ratio* (HR) pari a 1,48 (p-value=0,04), significativamente maggiore rispetto ai pazienti più giovani (HR=1,25). Con particolare attenzione è stata inoltre analizzata la popolazione di pazienti di età >60 anni. Suddividendo la popolazione > 60 anni in 3 gruppi: *score* 1-2 (n=118), *score* 3-4 (n=152) e *score* >5 (n=117), la corrispondente NRM risulta pari al 21%, 28% e 39%, che si traduce in un decorso significativamente migliore per i pazienti con *score* 1-2 rispetto a quelli con *score* più elevato (*score* 3-4: HR 1,7, p=0,02; *score* >5: HR 2,75, p<0,0001). In definitiva, per i pazienti > 60 anni che, per definizione a causa dell'età, partono da uno *score* composito minimo pari a 1 è sufficiente una comorbidità con punteggio >2 a far elevare significativamente il rischio di NRM. Questo dato dovrà guidare il clinico nella selezione del donatore correlato ad un minor rischio trapiantologico come pure nella scelta del regime di condizionamento da utilizzare.

Altro importante *score* prognostico trapiantologico è rappresentato dall'EBMT *score* modificato<sup>(36)</sup>, basato sul peso attribuito, mediante specifico punteggio, a singoli parametri legati al trapianto del paziente ematologico affetto da leucemia acuta:

- età (<20=0, 20-40=1, >40 anni=2);
- stato di malattia al trapianto (1<sup>a</sup> remissione completa [RC]=0, RC>1<sup>a</sup>=1, non RC=2);
- *matching* di sesso donatore/ricevente (femmina *vs* maschio=1, altre combinazioni=0);
- tipo di donatore (correlato=0 *vs* alternativo=1) (Tabella 2).

Recentemente, l'applicazione di questo *score* prognostico a un *setting* di 350 pazienti affetti da LMA<sup>(36)</sup>, in cui vi era un'omogenea distribuzione per HCT-I, ha dimostrato differenze statisticamente significative in termini di OS a 2 anni in pazienti con *score* 1-2 *vs* pazienti con *score* > 3 (OS: 50 +/- 4% *vs* 34 +/- 4%, p=0,002).

In definitiva, l'utilizzo di *score* prognostici pre-trapianto rappresenta un utile ausilio nella scelta del miglior donatore da selezionare anche sulla base delle caratteristiche pre-trapianto del paziente.

## Donatore non correlato da registro

### Criteri di compatibilità HLA

Il trapianto allogenico di CSE rappresenta un trattamento potenzialmente curativo per diverse patologie ematologiche, ma la sua applicazione dipende in primis dalla disponibilità di un donatore compatibile. Recentemente, Gragert et al. <sup>(15)</sup> hanno dimostrato che nella popolazione statunitense la probabilità di reperire un donatore non correlato dal *National Marrow Donor Program* (NMDP), registro di donatori volontari di CSE statunitense, con una compatibilità

HLA 8/8 sui loci A, B, C e DRB1 è di circa il 75% per i bianchi europei, ma solo il 46% per i pazienti bianchi discendenti del medio oriente o del Nord Africa. Inoltre, questa probabilità si riduce ulteriormente al 18% e al 16% per i pazienti appartenenti rispettivamente al gruppo africano o nero del sud/centro America. Tuttavia, recentemente, Dhen et al. <sup>(37)</sup> hanno dimostrato un miglioramento significativo nella identificazione del donatore non correlato nel corso degli anni attraverso un'analisi condotta su 1.344 pazienti ideali nella banca dati del *Be the Match Registry* in 2 tempistiche diverse: 2009 e 2012 <sup>(37)</sup>. I risultati hanno dimostrato che il reperimento del donatore 8/8 HLA compatibile in alta risoluzione (A, B, CW e DRB1) è passata, tra il 2009 e il 2012, dal 68% al 72% per i bianchi (WH), dal 41% al 44% per gli ispanici (HIS), dal 44% al

Comorbidità	Definizione	Score
Pregresso tumore solido	Insorto in qualunque momento della storia clinica del paziente, esclusi i tumori "non melanomi" della pelle	3
Malattie infiammatorie dell'intestino	Malattia di Crohn o rettocolite ulcerosa	1
Malattie autoimmuni	Lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide, polimiosite, malattia mista del tessuto connettivo o polimialgia reumatica	2
Infezioni	Se richiedono trattamento specifico dopo il giorno 0	1
Diabete	In terapia con insulina o ipoglicemizzanti orali	1
Insufficienza renale moderata/severa	Creatinina sierica > 2 mg/dL o >177 mol/L in dialisi, o pregresso trapianto renale	2
Insufficienza epatica lieve	Epatite cronica, bilirubina >ULN a 1.5 × ULN, o AST/ALT >ULN a 2.5 × ULN	1
Insufficienza epatica moderata/severa	Cirrosi epatica, bilirubina > 0.5 × ULN, o AST/ALT > 2.5 × ULN	3
Aritmia	Fibrillazione atriale o flutter, sindrome del nodo del seno o aritmie ventricolari	1
Cardiopatie	Malattia coronarica, insufficienza cardiaca congestizia, infarto miocardico o frazione di eiezione ≤ 50%	1
Malattie vascolari cerebrali	Attacco ischemico transitorio o evento cerebrovascolare	1
Valvulopatie cardiache	Ad eccezione del prolasso della valvola mitrale	3
Pneumopatia moderata	DLco e/oFEV1 66-80% o dispnea in lieve attività	2
Pneumopatia severa	DLco e/oFEV1 ≤ 65% o dispnea a riposo o paziente che necessita di ossigeno	3
Obesità	Paziente con indice di massa corporea > 35 kg/m <sup>2</sup>	1
Ulcera peptica	Se richiede trattamento	2
Disturbi psichiatrici	In trattamento o consulenza psichiatrica per depressione o ansia	1
Altro (specificata):		
<b>Score totale</b>		

Tabella 1 – Indice di comorbidità o Hematopoietic Comorbidity Transplant Index (HCT-I). Per calcolare l'HCT-I composito, bisogna aggiungere il punteggio 1 allo score totale delle comorbidità ai pazienti di età ≥ 40 anni.

46% per gli abitanti delle isole asiatiche e/o del Pacifico (API) e dal 27% al 30% per la razza nera afro-americana. Lo stesso studio ha documentato un incremento nella percentuale di reperimento del donatore compatibile anche per un livello di compatibilità richiesta per trapianto di 10/10 antigeni HLA definiti in alta risoluzione. In particolare, il donatore 10/10 HLA identico con il paziente è stato identificato per il 67% dei pazienti di razza bianca, per il 38% degli ispanici, per il 41% degli abitanti delle isole asiatiche e/o del Pacifico e per il 23% dei pazienti appartenenti alla razza nera afro-americana. I risultati scientifici attualmente disponibili conferiscono alla ridotta compatibilità del binomio donatore/ricevente (compatibilità HLA 6-7/8) un corrispondente aumento significativo del rischio di GvHD acuta di grado II-IV e III-IV, di GvHD cronica e di NRM con conseguenti peggiori risultati clinici in termini di sopravvivenza globale (OS) rispetto ai trapianti effettuati con donatore HLA-8/8 *matched*. Lee et al nel 2007<sup>(38)</sup> hanno pubblicato una metanalisi retrospettiva sull'impatto del *mismatching* HLA allelico valutato in alta risoluzione sul decorso clinico del trapianto allogenico da donatore non correlato. Questo studio includeva 3.857 trapianti effettuati negli Stati Uniti, nel 94% dei casi da CSE midollari, e riportava un progressivo, significativo aumento in termini di TRM con contestuale riduzione della OS a seconda che l'incompatibilità fosse localizzata sui loci B/Cw, A o DRB1, concludendo che l'incompatibilità meno sfavorevole era quindi rappresentata da quella sui loci B o Cw.

Parametri	Score
<b>Età (anni)</b>	
<20	0
20-40	1
>40	2
<b>Stato di Malattia al Trapianto</b>	
Prima remissione completa	0
Remissione completa >1°	1
Malattia presente	2
<b>Tipologia di Donatore</b>	
Correlato HLA identico	0
Alternativo	1
<b>Compatibilità di Genere</b>	
Altro	0
Donatore Femmina a Ricevente Maschio	1

Tabella 2 – EBMT risk score modificato.

Altre conclusioni di quest'analisi furono l'aver identificato nel *mismatching* allelico, tranne che per il locus Cw, lo stesso ruolo prognostico di quello antigenico e l'aver definito che la somma di più incompatibilità peggiora i risultati di outcome clinico in quanto l'aggiunta di ogni mismatched sembra correlare con un 10% in meno di sopravvivenza nei pazienti trapiantati in fase precoce di malattia. Questi risultati non furono del tutto concordi con il successivo studio di registro condotto da Woolfrey et al<sup>(39)</sup> su 1.933 pazienti sottoposti a trapianto da CSE periferiche. In quest'analisi, infatti, il singolo mismatched allelico non aveva significatività sulla sopravvivenza globale a differenza di quello antigenico, tranne che per il locus Cw ( $p=0,009$ ), mentre si confermava che aumentando il numero di incompatibilità aumentava il rischio di mortalità trapianto correlata. La non uniformità dei risultati dei 2 studi è verosimilmente attribuibile alla fonte di CSE, prevalentemente midollo nel primo e staminali periferiche nel secondo, tuttavia la conclusione di entrambi è rappresentata dall'identificare quale miglior donatore da Registro quello A, B, Cw e DRB1 HLA compatibile a livello allelico. Nel 2009, una simile analisi retrospettiva è stata condotta anche dal Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo in collaborazione con l'IBMDR, su 805 coppie selezionate in base alla disponibilità della tipizzazione allelica donatore/ricevente sui loci HLA-A, B, Cw, DRB1 e DQB1<sup>(40)</sup>. Questo studio ha riportato assenza di differenze significative in termini di OS in pazienti adulti affetti da malattie neoplastiche trapiantati da donatore 10/10 o 9/10 HLA-*matched*, per qualsiasi locus coinvolto nel *mismatching*. Tuttavia, selezionando i pazienti affetti da LMA e stratificandoli per fase di malattia al momento del trapianto, una sola incompatibilità HLA riduceva, sebbene non in maniera statisticamente significativa, la OS nei pazienti riceventi trapianto in fase precoce, ovvero in prima remissione completa, rispetto a quelli trapiantati in fase avanzata di malattia (HR 1,65,  $p=0,08$  vs HR 1,08,  $p=0,82$ ). La conclusione dello studio italiano consisteva quindi nel confermare l'indicazione di selezionare il donatore HLA A, B, Cw, DRB1 *matched* nei pazienti neoplastici in fase precoce di malattia al trapianto e di riservare il trapianto con 1 locus HLA incompatibile ai pazienti trapiantati in fase avanzata di malattia.

Relativamente all'incompatibilità locus specifica associata a miglior outcome clinico, i risultati sono ancora controversi per cui numerosi sono gli studi in corso per valutare la reale esistenza di incompatibilità HLA permissive o non permissive sui *mismatching* allelici di I e di II Classe<sup>(41-43)</sup>.

Circa il 15-30% dei trapianti allogenici da donatore non correlato sono caratterizzati da un'incompatibilità sul locus Cw, dovuta al severo squilibrio nel legame aplo tipico (*linkage disequilibrium*) tra il locus B e Cw, che, a seconda degli studi, si traduce in un variabile, aumentato rischio di mortalità compreso tra il 21 e il 43%. Tuttavia, negli esperimenti *in vitro* di alloreattività dei linfociti T è stata dimo-

strata un'ampia eterogeneità di risultati in coppie donatore/ricevente incompatibili per il locus Cw. Questo dato può essere attribuibile alla posizione e alla natura dei residui aminoacidici delle molecole Cw *mismatched* coinvolte, ma anche alla variabilità nei livelli di espressione degli alleli incompatibili. Basandosi su questi principi, risultano spiegabili i recenti risultati di associazione di miglior outcome clinico con alcune incompatibilità Cw, quali le disparità Cw\*03:03 vs Cw\*03:04 o Cw\*07:01 vs Cw\*07:02 che, pertanto, possono essere considerate permissive<sup>(44)</sup>. Di contro, una recente metanalisi giapponese su 6.967 pazienti ha dimostrato che la presenza di HLA-B\*51:01 nelle coppie donatore/ricevente è associata a GvHD acuta non solo per il forte *linkage disequilibrium* tra HLA-B\*51:01 e Cw\*14:02, ma anche per il potente effetto immunogenico esplicito dallo stesso HLA-B\*51:01. Alla luce di questi dati, l'incompatibilità HLA-Cw\*14:02 dovrebbe essere considerata un *mismatching* Cw non permissivo, perché ad alto rischio di mortalità e di insorgenza di GvHD acuta severa<sup>(45)</sup>.

Relativamente ai loci di II Classe del sistema HLA, un elegante algoritmo di disparità non-permissive sul DPB1 è stato identificato nel 2004 sulla base dei risultati clinici ottenuti da coppie donatori/riceventi non familiari, HLA-A-B-C-DRB1 compatibili ma diverse sul locus DPB1<sup>(46)</sup>. Questi dati sono stati confermati da uno studio del Gruppo Italiano Trapianti di Midollo Osseo che ha riportato un aumento globale della mortalità nel trapianto da donatore da Registro con incompatibilità non-permissive DPB1<sup>(47)</sup>. Tuttavia, confrontando pazienti trapiantati sia in fase precoce che avanzata di malattia, che avevano ricevuto CSE da donatore 10/10 HLA (HR 2,12; CI: 1,23-3,64; p=0,006) o 9/10 allelicamente compatibile (HR 2,21; CI: 1,28-3,80; p=0,004), l'incremento della mortalità nelle coppie con *mismatching* DPB1 non permissivo risultava sovrapponibile. Ad ulteriore conferma di tali risultati, Pidala et al.<sup>(48)</sup> hanno in seguito riportato che nei trapianti HLA-A-B-C-DRB1 *matched* la combinazione di incompatibilità HLA-DPB1/DQB1 provoca un'aumentata incidenza di GvHD acuta laddove il singolo *mismatching* HLA-DPB1 è associato a riduzione del tasso di recidiva. Tuttavia, relativamente alla incompatibilità DPB1, gli Autori hanno registrato una maggiore NRM in caso di *mismatching* non permissivo sia nei trapianti HLA 8/8 che 10/10 compatibili con inclusione del DQB1<sup>(48)</sup>. Da questo il suggerimento di procedere, allorché geneticamente possibile, con la selezione del donatore con incompatibilità DPB1 permissiva in tutti i casi in cui siano disponibili molteplici donatori 8/8 *matched* con il paziente. A differenza del DPB1, ancora non sono disponibili solidi risultati sul ruolo del DQA1 e del DPA1 nella selezione del donatore da Registro.

In conclusione, oggi, dal punto di vista della compatibilità del donatore volontario da Registro, le indicazioni sono di selezionare donatori HLA 8/8 allelicamente compatibili con il paziente e, allorché non sia possibile, di prediligere le incompatibilità sul

locus Bw, ad eccezione del B51:01. Infine, l'incompatibilità che coinvolge il locus Cw\* 14:02 è meritevole di un *warning* particolare e, in caso di molteplici donatori 8/8 HLA compatibili, selezionare quello con *mismatching* DPB1 permissivo.

Infine, in caso di selezione di donatore HLA 7/8 compatibile è raccomandabile effettuare lo studio degli anticorpi anti-HLA ai fini della selezione del miglior donatore alternativo.

### Criteri Clinici

Nella selezione del donatore volontario da Registro, oltre ai criteri di compatibilità HLA vanno presi in considerazione anche alcuni fattori clinici quali lo stato sierologico per il citomegalovirus (CMV), l'età, il sesso, la compatibilità ABO e la fonte di CSE, midollo o sangue periferico, per la quale il donatore dichiara la propria disponibilità. Una pregressa infezione per il CMV, documentata dalla positività IgG, viene oggi riconosciuta parametro di elevato impatto clinico nell'outcome trapiantologico del paziente<sup>(49-52)</sup>. La migliore combinazione è rappresentata da negatività per le IgG del CMV di entrambi i componenti della coppia donatore/ricevente perché correlata al minor rischio di sviluppare infezione da CMV post-trapianto con conseguenti migliori risultati in termini di OS a 5 anni. Tuttavia, questa situazione in Italia è quanto mai rara per l'alta siero prevalenza dell'infezione da CMV nella popolazione (circa 80%). Al contrario, la situazione donatore CMV-negativo/ricevente CMV-positivo rappresenta il più alto rischio di riattivazione del CMV post-trapianto. Nel 2014, Ljungman et al.<sup>(52)</sup> hanno confermato attraverso uno studio dell'*European Blood and Marrow Transplant Group*<sup>(52)</sup> (EBMT), condotto su 19.192 trapianti da donatore da Registro, l'impatto negativo in termini di OS a 5 anni del donatore CMV positivo per pazienti CMV negativi rispetto allo stesso utilizzato per trapiantare pazienti CMV positivi (CMV: D pos /R neg: OS 45% vs D pos /R pos: OS 49%, p < 0,0001). Inoltre, la combinazione CMV D pos/R pos rispetto a quella Dneg/Rpos sembra particolarmente favorevole nel trapianto preceduto da condizionamento mioablativo in quanto significativamente correlata a una minore incidenza cumulativa di riattivazione generale (21% vs 48%; p < 0,001), di riattivazione ricorrente (4% vs 15%, p = 0,003), di malattia d'organo da CMV (3% vs 13%, p = 0,005) e di mortalità (42% vs 56%, p = 0,006).

Relativamente al fattore età e sesso, un giovane donatore maschio è preferito<sup>(53,54)</sup> rispetto alla donatrice femmina tanto che oggi anche in Italia l'età massima di iscrizione al Registro di donatori volontari è pari a 35 anni di età. Questo *cut-off* è legato al fatto che diversi studi hanno dimostrato come l'età del donatore >45 anni sia correlata ad un aumentato rischio di NRM e di recidiva. Infatti, la OS a 5 anni dei pazienti sottoposti a trapianto di CSE allogenico da donatore volontario risulta pari a 33%, 29% e 25% per un donatore selezionato di età rispettivamente compresa tra i 18 e 30 anni, 31 e 45 anni, e più di 45 anni (p=0,0002)<sup>(53)</sup>. Relativamente al sesso del

donatore, è noto che le donatrici femmine sono generalmente a rischio di sviluppare uno stato di allo-immunizzazione in seguito a gravidanze e/o a precedenti aborti e che alcuni antigeni di istocompatibilità minore vengono codificati dal cromosoma sessuale Y, rappresentando quindi un *target* immunologico specifico nell'incompatibilità di sesso della coppia donatore femmina *vs* ricevente maschio. Questo dato, dal punto di vista clinico, si traduce in un'aumentata incidenza di GvHD cronica (54% *vs* 44%;  $p < 0,001$ ). Pertanto, l'algoritmo da seguire nella scelta clinica del donatore dal punto di vista del genere è in prima ipotesi il donatore maschio giovane, seguito da donatore femmina nullipara o con il minor numero di gravidanze<sup>(53,55-57)</sup>.

Quando possibile, al fine di minimizzare il rischio di un ritardato attecchimento della serie eritroblastica o di aplasia eritroide pura o di anemia emolitica, è preferibile selezionare donatore ABO *matched* con il paziente. Tuttavia, diversi studi hanno riportato risultati contraddittori in termini di correlazione tra compatibilità ABO D/R e la sopravvivenza globale, tanto da non poter essere considerato un elemento cruciale nella scelta del donatore<sup>(58-59)</sup>. Relativamente alla scelta del donatore in base alla disponibilità della fonte di CSE da donare, ad oggi, c'è un solo studio prospettico che ha mostrato un vantaggio significativo per PBSC in termini di incidenza cumulativa di attecchimento in PMN e PLT rispetto al BM, con associata maggiore incidenza di cGvHD senza svantaggi in termini di OS<sup>(60)</sup>. Pertanto, va preferito il donatore disponibile alla raccolta di PBSC in casi selezionati quali l'elevato rischio infettivo del paziente, l'alto rischio di recidiva della malattia sulla quale la GvHD cronica potrebbe rappresentare un vantaggio clinico, la necessità di eseguire un trapianto RIC o una grossa sproporzione di peso tra donatore e ricevente.

## Unità di sangue placentare

Dal 1988 ad oggi, oltre 40.000 trapianti da sangue di cordone ombelicale sono stati eseguiti in tutto il mondo, per cui oggi questa fonte di CSE viene considerata una valida alternativa per il trapianto allogenico nei casi in cui non sia disponibile un germano HLA identico o un donatore da Registro 8/8 allelicamente HLA compatibile<sup>(61-64)</sup>. Tuttavia, in considerazione del vasto scenario di donatori alternativi di CSE attualmente disponibili, la scelta ottimale dell'unità SCO da selezionare per uso clinico è quanto mai complessa e dipende dalle caratteristiche del paziente oltre che da quelle specifiche dell'unità. Relativamente al paziente, risulta quanto mai importante, ai fini della selezione dell'unità SCO da trapiantare, se la patologia di base del paziente sia o meno di natura neoplastica. Per quanto la minore immunogenicità del SCO consenta di utilizzare unità con compatibilità HLA meno estesa rispetto al donatore volontario da Registro, ampliando così la possibilità di identificare un donatore anche per soggetti afferenti ad etnie minori<sup>(15)</sup>, le moderne linee guida suggeriscono una tipizzazione HLA allelica estesa a 8 loci HLA anche per questa tipologia di trapianto<sup>(65)</sup>. Questa moderna

strategia di selezione allelica, deriva dalla recente analisi retrospettiva di Eapen et al.<sup>(66)</sup> sul trapianto non correlato da SCO basata su 1.568 pazienti affetti da patologie maligne, in cui, partendo dalla tradizionale tipizzazione antigenica sulla I Classe (loci A e B) e allelica in alta risoluzione per la seconda Classe II (DRB1), si è passati ad analizzare i dati di outcome, estendendo e approfondendo la compatibilità stessa, utilizzando un livello allelico HLA, HLA-A, B, Cw, DRB1 al pari del donatore da Registro. I risultati emersi da questa analisi hanno evidenziato come l'attecchimento in polimorfonucleati (PMN) fosse significativamente inferiore per trapianti effettuati con unità con 3 o più incompatibilità alleliche rispetto a quelli 8/8 o 7/8 allelicamente *matched*. Allo stesso modo, la NRM risultava associata al grado di *matching* con dati significativamente migliori per le unità 8/8 allelicamente compatibili con il paziente. Un singolo *mismatch* allelico sui loci A, C o DRB1 risultava associato a un aumentata NRM con valori di HR pari a 3,05 ( $p=0,002$ ), 3,04 ( $p=0,01$ ) e 2,03 ( $p=0,005$ ), rispettivamente, suggerendo un ruolo permissivo dell'incompatibilità sul locus B. Dal punto di vista della dose cellulare, l'uso di unità con cellule nucleate (CN)/kg  $< 3 \times 10^7$  rappresentava un fattore di rischio indipendente per la NRM a 1 anno, che risultava pari a circa il 40% per trapianti effettuati con unità da 4/8 a 7/8 compatibili. Tuttavia, nei pazienti trapiantati con unità meno compatibili (4/8 o 5/8), incrementando la dose di CN/kg a valori  $> 5 \times 10^7$  si registrava una riduzione della NRM a 1 anno dal 40 al 20%, mentre una dose CN/kg  $> 3 \times 10^7$  non migliorava i risultati di outcome per unità 6 o 7/8 compatibili. Infine, la compatibilità allelica 3/8 si è rivelata inaccettabile in termini di NRM indipendentemente dalla dose cellulare utilizzata. Alla luce di questi dati, che in parte supportano studi pregressi<sup>(67,68)</sup>, emerge inoltre un *warning* per l'uso clinico di unità SCO in cui vi sia l'associazione di incompatibilità Cw e DRB1.

Per le patologie non neoplastiche, l'interazione tra dose cellulare e *matching* HLA risulta meno chiara probabilmente a causa della esiguità dei dati disponibili rispetto alle malattie maligne<sup>(69)</sup>, ma riflette anche la biologia di questo tipo di disordini e gli effetti dei precedenti trattamenti come ad esempio la terapia trasfusionale prolungata delle emoglobinopatie, che espone il paziente a maggior rischio di sviluppare Ab-antiHLA con conseguente maggior rischio di mancato attecchimento o di rigetto.

Partendo da questi presupposti, nella selezione dell'unità SCO ottimale per trapianto si devono considerare (figura 1):

- la compatibilità HLA in combinazione con la dose cellulare, intesa come CN/kg, CD34+/kg e GM/kg;
- la diagnosi del paziente;
- l'esclusione di unità 3/8 *matched* con il ricevente;
- la presenza di specifici Ab-antiHLA, che vanno ricercati ancor prima di iniziare la selezione dell'unità SCO da trapiantare. Relativamente al criterio di *matching* HLA, in caso di unità 6, 7 o 8/8

compatibili, la selezione dell'unità SCO deve prevedere una dose cellulare minima di CN/kg pari ad almeno  $3 \times 10^7$  mentre per unità 4 o 5/8 compatibili è consigliabile considerare unità con almeno  $5 \times 10^7$  kg di CN.

La dose cellulare in termini di CD34+ e GM/kg è un parametro meno affidabile delle CN in considerazione dell'alta variabilità di risultati e delle diverse metodiche utilizzate dalle banche pre e post-scongelo (70-71). Tuttavia, questi parametri, a fini di valutazione prognostica, risultano particolarmente utili nei casi in cui le CN al momento dell'infusione (post-scongelo) non corrispondano al valore sul quale è stata effettuata la selezione e abbiano dato valori inferiori a  $2 \times 10^7$ /kg. In questi casi, valori di CD34/kg  $> 1,7$  al momento della selezione o  $> 1 \times 10^5$  al momento dell'infusione e/o, rispettivamente, valori di GM/kg  $> 2$  o pari a  $1 \times 10^4$  sono correlati a un buon outcome clinico sia in termini di probabilità di attecchimento che di OS. Al contrario, per valori soglia di CD34 e di GM inferiori a quelli sopra citati bisogna subito considerare la possibilità di un secondo trapianto da altra fonte o da altra unità, monitorizzando l'attecchimento tramite l'agoaspirato midollare e la valutazione del chimerismo tra il giorno 20 e 28 post-trapianto (65).

In caso di trapianto per patologie non maligne, si raccomanda il trapianto da unità con il miglior livello di compatibilità e con dose cellulare minima di CN/kg pari ad almeno  $3,5 \times 10^7$  e di CD34+ kg  $> 1,7 \times 10^8$  (65). Per il test clonogenico sono parimenti valide le raccomandazioni precedenti.

Nel caso in cui molteplici unità SCO dovessero soddisfare i criteri di *matching* e dose cellulare raccomandati, altri parametri da prendere in considerazione sono la possibilità di reperire l'unità da una banca accreditata FACT e ABO compatibile con il paziente, anche se i dati in merito all'effetto dell'incompatibilità ABO in questa tipologia di trapianto sono ancora contraddittori. Allo stesso modo, ancora incerti sono i migliori risultati ottenuti utilizzando unità SCO *Non-Inherited Maternal Antigens* (NIMA) *matched* con il paziente rispetto a quelle NIMA *mismatched* (72), per cui non è ancora attuabile la loro applicazione clinica se non nell'ambito di specifici trials clinici.

### Donatore familiare aploidentico

Nell'ultimo decennio, il trapianto da donatore familiare aploidentico ha subito una radicale evoluzione, che ha comportato un notevole incremento della sua applicazione. La pratica del trapianto aploidentico T-depleto a lungo coltivata dal gruppo pionieristico di Perugia utilizzando megadosi di cellule CD34+ positive (18,19) è più recentemente proposta nella forma di coinfusione di cellule T regolatorie e T linfociti (73) o come T-deplezione parziale con eliminazione dei T-linfociti TcR $\alpha\beta$ + e mantenimento dei T-linfociti TcR $\gamma\delta$ + e delle cellule NK (21). Tuttavia, le esperienze nell'uso di queste procedure, benché particolarmente promettenti, riguardano casistiche di pazienti ancora limitate o anche esclusivamente pediatriche e con

follow up di osservazione relativamente breve. Ben più estensiva è invece risultata la pratica del trapianto aploidentico T-repleto, in cui la prevenzione del rigetto e della GvHD è affidata a diverse combinazioni farmacologiche per l'ottenimento di un adeguato livello di T-deplezione *in vivo* (20,22-25). L'alloreattività, correlata ad alcune incompatibilità sui loci Cw e Bw, riconosciuta dal gruppo di Perugia (19), ed associata ad un rischio di recidiva significativamente ridotto nei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (LMA), ha costituito un importante fattore nella selezione del donatore aploidentico. Tale correlazione non è stata però confermata nelle casistiche trattate con trapianto aploidentico T-repleto. Inoltre, nelle varie coorti di pazienti sottoposte a trapianto aploidentico, spesso il donatore condivide più che un aplotipo con il ricevente (risultando 4/6 o 5/8 *matched*), da cui le analisi volte ad analizzare se un maggior grado di compatibilità possa influenzare l'outcome clinico anche nel trapianto T-repleto. Gli studi ad oggi disponibili relativamente a tale problematica (22,74) concordano nel non attribuire un peso statisticamente significativo in termini di OS al diverso grado di *matching* o a specifiche incompatibilità alleliche della coppia donatore/ricevente. Relativamente alle altre variabili del donatore che possono giocare un ruolo nel decorso clinico post-trapianto aploidentico, recentemente Wang et al. (75) hanno riportato interessanti dati su una popolazione di 1.210 pazienti, omogenea per regime di condizionamento e profilassi della GvHD, sottoposti a trapianto aploidentico T-repleto con CSE da PBSC o MO, dopo stimolazione con G-CSF. Secondo tale studio, il sesso e l'età del donatore risultano parametri clinici importanti nella selezione del donatore aploidentico. In particolare, in analisi multivariata in cui sia l'età che il sesso del donatore vengono considerate quali variabili continue e dicotomiche, avere meno di 30 anni ed appartenere al genere maschile risultano entrambi fattori indipendenti ed associati favorevolmente a parametri di outcome clinico quali la GvHD acuta di grado II-IV (età: p=0,0001; sesso: p=0,007), la NRM (età: p=0,04; sesso: p=0,005), e la OS (età: p=0,04; sesso: p=0,01). Questo studio riporta una maggiore incidenza di aGvHD di grado II-IV per i pazienti sottoposti a trapianto aploidentico dalla madre, pertanto gli Autori hanno condotto un'ulteriore analisi su 909 trapianti escludendo le madri donatrici, da cui è emerso che il genere femminile non si conferma quale fattore con impatto significativo sull'incidenza di GvHD a differenza dell'età che mantiene la sua rilevanza statisticamente significativa nel determinare i risultati globali di outcome. Infine, gli Autori concludono che, andando ad esaminare il grado di parentela del donatore utilizzato rispetto al paziente in tutte le combinazioni analizzate, il fratello maschio di età  $< 30$  anni risulta essere il miglior donatore. Infine, analizzando quei casi in cui erano disponibili gli aplotipi dei genitori per determinare se l'incompatibilità NIMA o NIPA (*Non-Inherited Paternal Antigens*) avesse un ruolo importante nella selezione del donatore aploidentico, è risultato che il fratello giovane incompatibile per i NIMA sarebbe

associato a risultati migliori rispetto a quello NIPA incompatibile con il paziente. Questi dati necessitano tuttavia di essere validati su casistiche più numerose.

In assenza di studi prospettici randomizzati, cominciano ormai ad essere numerose le analisi di confronto dei risultati fra trapianto aploidentico ed il trapianto da altre fonti alternative (MUD, MMUD, CB) o anche da donatore familiare HLA identico <sup>(26-28)</sup>.

Nei limiti e con le cautele imposti dalla natura degli studi retrospettivi, tali analisi generalmente concordano nel non riconoscere significative differenze tra le diverse modalità di trapianto in termini di OS e DFS. Lo studio multicentrico condotto dall'MD Anderson in associazione con il CIBMTR su 2174 pazienti affetti da LMA, ricevuti un trapianto aploidentico (mieloablato: n=104; RIC: n=88; totale: n=192) e confrontati con i rispettivi pazienti ricevuti trapianto MUD (mieloablato: n=1245; RIC: n=737; totale: n=1.982) ha mostrato OS e DFS simili per i due gruppi e per entrambe le modalità di condizionamento (Aplo vs MUD: OS mieloablato (3 anni) 45% vs 50%; RIC 46% vs 44%; DFS mieloablato 41% vs 42%; RIC 35% vs 37%) <sup>(76)</sup>. Nel più recente studio prodotto dall'EBMT, è stata eseguita una *match-pair analysis* includente 273 pazienti affetti da leucemia acuta sia mieloide che

linfoide per ciascuno dei tre gruppi sottoposti a trapianto aploidentico o a trapianto da donatore MUD con compatibilità allelica HLA 10/10 o a trapianto MMUD 9/10. L'analisi concludeva per una superiorità del trapianto MUD 10/10 rispetto al trapianto aploidentico sia in termini di OS (65% vs 49% a 5 anni, p=0,004) che di DFS (59% vs 42% a 5 anni, p=0,001), mentre non risultavano differenze significative fra il trapianto MMUD 9/10 e il trapianto aploidentico (OS: 51% vs 49% a 5 anni, p=ns; DFS: 45% vs 42% a 5 anni, p=ns). Un ampio studio retrospettivo condotto dall'EBMT in associazione con l'Eurocord su 918 pazienti con LMA (Aplo: n=360; SCO: n=558) e 528 pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (LLA) (Aplo: n=158; SCO n=370) non trova, in analisi multivariata, differenze significative tra le due modalità di trapianto in termini di DFS a 5 anni (LMA: Aplo 32% vs 38% SCO; LLA: Aplo 28% vs 34% SCO) <sup>(77)</sup>.

È importante segnalare un'altra serie di studi, nei quali le analisi di confronto del trapianto aploidentico includono, assieme alle altre fonti alternative, anche il trapianto da donatore familiare HLA identico <sup>(26,28,75)</sup>. In termini di DFS, nessuno di questi studi trova differenze significative fra il trapianto aploidentico e le altre fonti di CSE incluso il donatore familiare HLA identico.

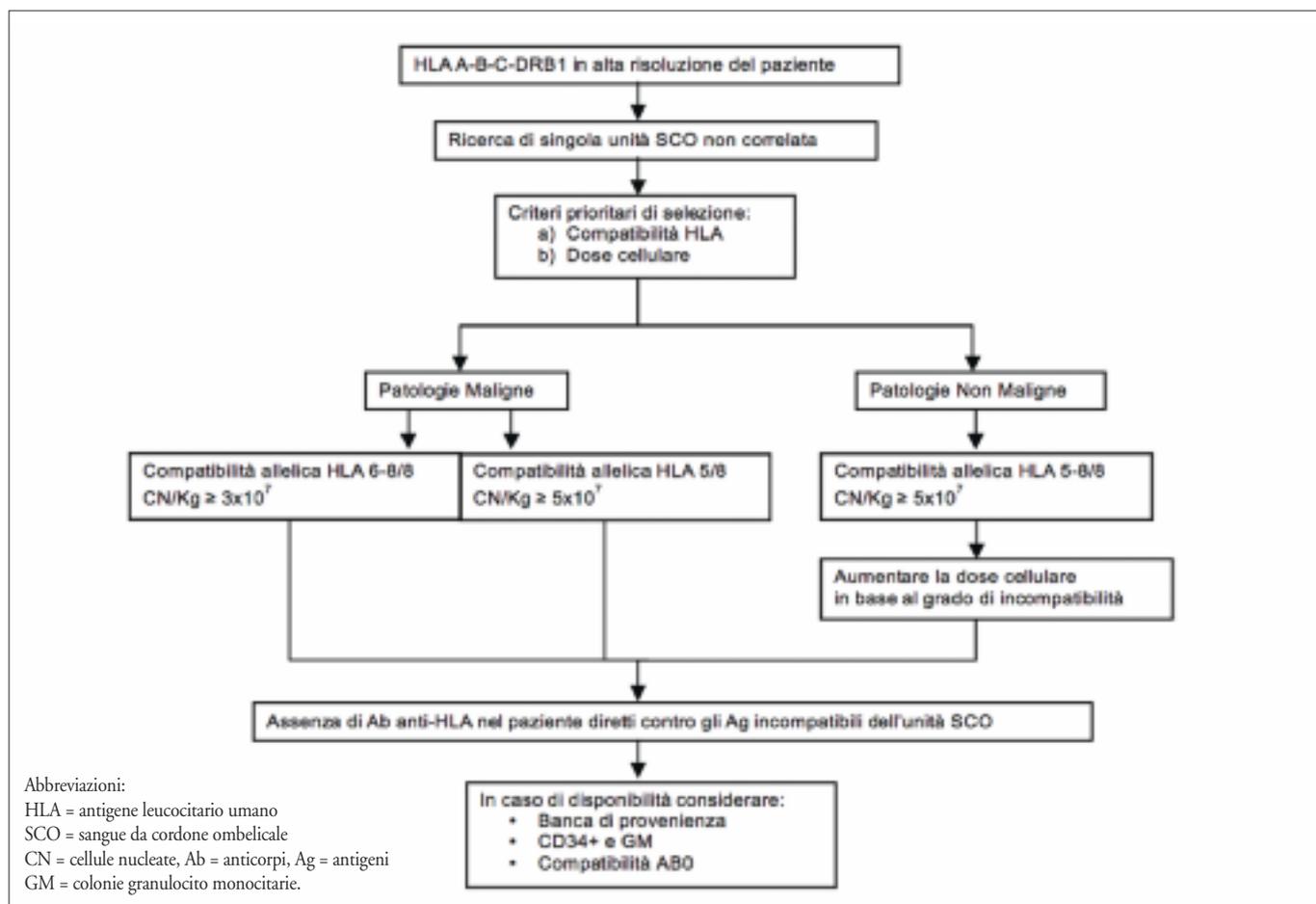


Figura 1 – Algoritmo di selezione SCO

Su questa tematica il nostro gruppo, per una popolazione di 225 pazienti consecutivamente ed uniformemente trapiantati con un identico regime di condizionamento mieloablativo o RIC, ha condotto una *match-pair analysis* includente 9 variabili di omogeneità, confrontando 58 pazienti riceventi trapianto aploidentico con 58 pazienti trapiantati da donatore familiare HLA identico: la DFS a 5 anni è risultata pressoché sovrapponibile tra le due serie di pazienti sia trapiantati in remissione di malattia che in fase avanzata<sup>(78)</sup>. In Tabella 3 sono in sintesi confrontate le caratteristiche relative alle tre diverse fonti di cellule staminali ematopoietiche per loro dispo-

nibilità e in rapporto a parametri di outcome clinico. Questa serie di osservazioni, per le implicazioni che comportano, aprono nuovi scenari nell'ambito della problematica della scelta del donatore, che in prospettiva non si limita solo alla già complessa ricerca del miglior donatore "alternativo", ma si estende a tutte le fonti disponibili di CSE, mette in discussione la gerarchia di selezione che ha sempre visto al primo posto il donatore familiare HLA identico e induce a ricercare altri fattori che, oltre il grado di compatibilità HLA, possano maggiormente influenzare l'outcome del trapianto e pertanto guidare il clinico nella scelta del miglior donatore in generale.

	Donatore da Registro	Sangue da cordone ombelicale	Donatore familiare aploidentico
Disponibilità	++	++	++++
Mancato attecchimento	+	++++	++
GvHD	++	+	++++
Infezioni	++	++++	+++
Recidiva di malattia	++	++++	++
Sopravvivenza libera da malattia	+++	++	++
Punteggio arbitrario degli eventi e degli esiti (Scala ordinale da + (meno probabile) a ++++ (più probabile) <sup>(63)</sup> .			

Tabella 3 – Comparazione dei donatori alternativi per trapianto allogeneico di CSE.

## Bibliografia

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Immunologia cellulare e molecolare. Elsevier. 6a Ed. 2010;75-321.
2. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. Tissue Antigens 2010;75(4):291-455.
3. De Buerger M, Bakker A, Van-Rood JJ, Van-der Woude F, Goulmy E. Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens: ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. J Immunol. 1992;149(5):1788-94.
4. Hobo W, Broen K, Van der Velden WJ, Greupink-Draaisma A, Adisty N, Wouters Y, et al. Association of disparities in known minor histocompatibility antigens with relapse-free survival and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2013;19(2):274-82.
5. Mortensen BK, Rasmussen AH, Larsen ME, Larsen MV, Lund O, Braendstrup P, et al. Identification of a novel UTY-encoded minor histocompatibility antigen. Scand J Immunol. 2012(2);76:141-50.
6. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. N Engl J Med. 1996;334(5):281-5.
7. Petersdorf EW, Kollman C, Hurley CK, Dupont B, Nademane A, Begovich AB, et al. Effect of HLA class II gene disparity on clinical outcome in unrelated donor hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia: the US National Marrow Donor Program Experience. Blood. 2001;98(10):2922-29.
8. Liu W, Xiao X, Demirci G, Madsen J, Li XC. Innate NK cells and macrophages recognize and reject allogeneic nonself in vivo via different mechanisms. J Immunol. 2012;188(6):2703-11.
9. Welsh K, Bunce M. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. Rev Immunogenet. 1999;1(2):157-76.
10. Testi M, Andreani M. Luminex-Based Methods in High-Resolution HLA Typing. Methods Mol Biol. 2015;1310:231-45.
11. Rozemuller EH, Tilanus MG. Bioinformatics: analysis of HLA sequence data. Rev Immunogenet. 2000;2(4):492-517.
12. Cutler TL, Murphy K, Hopper JL, Keogh LA, Dai Y, Craig JM. Why accurate Knowledge of Zygosity is Important to Twins. Twin Res Hum Genet. 2015;18(3):298-305.
13. Tiercy JM, Nicoloso G, Passweg J, Schanz U, Seger R, Chalandon Y, et al. The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor is highly predictable. Bone Marrow Transplant. 2007;40(6):515-522.
14. Tiercy JM. Unrelated hematopoietic stem cell donor matching probability and search algorithm. Bone Marrow Res. 2012;2(695018):1-8.
15. Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, et al. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. N Engl J Med. 2014;371(4):339-48.
16. Pidala J, Kim J, Schell M, Lee SJ, Hillgruber R, Nye V, et al. Race/ethnicity affects the probability of finding an HLA-A, -B, -C and -DRB1 allele-matched unrelated donor and likelihood of subsequent transplant utilization. Bone Marrow Transplant 2013;48(3):346-50.

17. WMDA.info [Internet]. World Marrow Donor Association (WMDA) Plesmanlaan 1b, 6th floor 2333 BZ Leiden - The Netherlands. Available from: <https://www.wmda.info>
18. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998;339(17):1186-93.
19. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3447-54.
20. Solomon SR, Sizemore CA, Sanacore M, Zhang X, Brown S, Holland HK, et al. Haploidentical transplantation using T cell replete peripheral blood stem cells and myeloablative conditioning in patients with high-risk hematologic malignancies who lack conventional donors is well tolerated and produces excellent relapse-free survival: results of a prospective phase II trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(12):1859-66.
21. Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, et al. HAL-haploidentical stem cell transplantation after removal of  $\alpha\beta^+$  T and B-cells in children with non malignant disorders. *Blood*. 2014;124(5):822-826.
22. Wang Y, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Zhang XH, Han W, et al. Long-term follow-up of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T cell depletion for the treatment of leukemia: nine years of experience at a single center. *Cancer*. 2013;119(5):978-85.
23. Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, Picardi A, Cudillo L, Cerretti R et al. Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies. *Blood* 2013;121(5):849-857.
24. Ciurea SO, Mulanovich V, Saliba RM, Bayraktar UD, Jiang Y, Bassett R, et al. Improved early outcomes using a T cell replete graft compared with T cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(129):1835-44.
25. Arcese W, Picardi A, Santarone S, De Angelis G, Cerretti R, Cudillo L, et al. Haploidentical, G-CSF-primed, unmanipulated bone marrow transplantation for patients with high-risk hematological malignancies: an update. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50:S24-S30.
26. Di Stasi A, Milton DR, Poon LM, Hamdi A, Rondon G, Chen J, et al. Similar transplantation outcomes for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with haploidentical versus 10/10 human leukocyte antigen-matched unrelated and related donors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(12):1975-81.
27. El-Cheikh J, Crocchiolo R, Furst S, Bramanti S, Sarina B, Granata A, et al. Unrelated cord blood compared with haploidentical grafts in patients with hematological malignancies. *Cancer*. 2015;121(11):1809-16.
28. Raiola AM, Dominiotto A, di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, Ibatci A, et al. Unmanipulated haploidentical transplants compared with other alternative donors and matched sibling grafts. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(10):1573-9.
29. Gratwohl A, Stern M, Brand R, Apperley J, Baldomero H, de Witte T, et al. Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Cancer*. 2009;115(20):4715-4726.
30. Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005;106(8):2912-9.
31. Sorror ML. How I assess comorbidities before hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2013;121(15):2854-63.
32. Diaconescu R, Flowers CR, Storer B, Sorror ML, Maris MB, Maloney DG, et al. Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared with myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donors. *Blood*. 2004;104(5):1550-8.
33. Sorror ML, Maris MB, Storer B, Sandmaier BM, Diaconescu R, Flowers C et al. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood*. 2004(4);104(4):961-8.
34. Sorror ML, Storb RF, Sandmaier BM, Maziarz RT, Pulsipher MA, Maris MB, et al. Comorbidity-age index: a clinical measure of biologic age before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2014;32(29):3249-56.
35. IBMDR (Italian Bone Marrow Donor Registry) - Italian National Standards for Unrelated Haematopoietic Stem Cell Donations version: XIX Feb 2016 - Available from: <http://ibmdr.galliera.it/standard-ibmdr>.
36. Michelis FV, Messner HA, Uhm J, Alam N, Lambie A, McGillis L, et al. Modified EBMT Pretransplant Risk Score Can Identify Favorable-risk Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for AML, not Identified by the HCT-CI Score. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(5):73-81.
37. Dehn J, Buck K, Maiers M, Confer D, Hartzman R, Kollman C, et al. 8/8 and 10/10 high-resolution match rate for the be the match unrelated donor registry. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(1):137-41.
38. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007;110(13):4576-4583.
39. Woolfrey A, Klein JP, Haagenson M, Spellman S, Petersdorf E, Oudshoorn M et al. HLA-C antigen mismatch is associated with worse outcome in unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(6):885-92.
40. Crocchiolo R, Ciceri F, Fleischhauer K, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S, et al. HLA matching affects clinical outcome of adult patients undergoing haematopoietic SCT from unrelated donors: a study from the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo and Italian Bone Marrow Donor Registry. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(9):571-7.
41. Fernandez-Viña MA, Wang T, Lee SJ, Haagenson M, Aljurf M, Askar M, et al. Identification of a permissible HLA mismatch in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;123(8):1270-8.
42. Petersdorf EW, Gooley TA, Malkki M, Bacigalupo AP, Cesbron A, Du Toit E, et al. HLA-C expression levels define permissible mismatches in hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2014;124(26):3996-4003.
43. Kanda J, Ichinohe T, Fuji S, Maeda Y, Ohashi K, Fukuda T, et al. Impact of HLA mismatch direction on the outcome of unrelated bone marrow transplantation: a retrospective analysis from the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(2):305-11.
44. Tiercy JM. HLA-C Incompatibilities in Allogeneic Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2014;5(216):1-6.
45. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood*. 2007;110(7):2235-41.
46. Zino E, Frumento G, Marktel S, Sormani MP, Ficara F, Di Terlizzi S, et al. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissible mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;103(4):1417-24.
47. Crocchiolo R, Zino E, Vago L, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S, et al. Nonpermissible HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114(7):1437-44.
48. Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, Spellman S, Wang HL, Aljurf M, et al. Nonpermissible HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2014;124(16):2596-606.
49. Ljungman P, Brand R, Einesle H, Frasson F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood* 2003; 102(13):4255-4260.
50. Mikulska M, Raiola AM, Bruzzi P, Valardo R, Annunziata S, Lamparelli T, et al. CMV infection after transplant from cord blood compared to other alternative donors: the importance of donor-negative CMV serostatus. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(1):92-9.
51. Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Zhou F, Williamson TS, Quinlan D, et al. Donor serostatus has an impact in cytomegalovirus-specific immunity, cytomegalovirus disease incidence and survival in seropositive hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(4):574-585.
52. Ljungman P. The role of cytomegalovirus serostatus on outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(6):466-9.
53. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow

- from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*. 2001;98(7):2043-51.
54. Confer DL, Abress LK, Navarro W, Madrigal A. Selection of adult unrelated hematopoietic stem cell donors: beyond HLA. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;(1 Suppl):S8-S11.
  55. Rezvani AR, Storer BE, Guthrie KA, Schoch HG, Maloney DG, Sandmaier BM, et al. Impact of donor age on outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(1):105-12.
  56. Kollman C, Spellman SR, Zhang MJ, Hassebroek A, Anasetti C, Antin JH, et al. The effect of donor characteristics on survival after unrelated donor transplantation for hematologic malignancy. *Blood*. 2016;127(2):260-7.
  57. Markiewicz M, Siekiera U, Dzierzak M, Zielinska P, Kyrzc-Krzemien S. The impact of H-Y mismatches on results of HLA-matched unrelated Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc* 2010;42(8):3297-300.
  58. Kanda J, Ichinohe T, Matsuo K, Benjamin RJ, Klumpp TR, Rozman P, et al. Impact of ABO mismatching on the outcomes of allogeneic related and unrelated blood and marrow stem cell transplantations for hematologic malignancies: IPD-based meta-analysis of cohort studies. *Transfusion*. 2009;49(4):624-35.
  59. Blin N, Traineau R, Houssin S, Peffault de Latour R, Petropoulou A, Robin M, et al. Impact of donor-recipient major ABO mismatch on allogeneic transplantation outcome according to stem cell source. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(9):1315-1323.
  60. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2012;367(16):1487-96.
  61. Ruggeri A. Alternative donors: cord blood for adults. *Semin Hematol*. 2016;53(2):65-73.
  62. Ballen KK, Koreth J, Chen YB, Dey BR, Spitzer TR. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood*. 2012;119(9):1972-80.
  63. Gale RP, Eapen M. Who is the best alternative allotransplant donor? *Bone Marrow Transplant* 2015;50:S40-S42.
  64. Arcese W, Mangione I, Picardi A. Algorithm for donor selection in 2011. *Current Opinion in Hematol*. 2011;18(6):401-7.
  65. Hough R, Danby R, Russell N, Marks D, Veys P, Shaw B, et al. Recommendations for a standard UK approach to incorporating umbilical cord blood into clinical transplantation practice: an update on cord blood unit selection, donor selection algorithms and conditioning protocols. *Br J Haematol*. 2016; 172(3):360-70.
  66. Eapen M, Klein JP, Ruggeri A, Spellman S, Lee SJ, Anasetti C, et al. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. *Blood*. 2014;123(1):133-40.
  67. Eapen M, Rocha V, Sanz G, Scaradavou Andromachi, Zhang MJ, Arcese W, et al. Effect of Graft Source on Unrelated Donor Haemopoietic Stem-Cell Transplantation in Adults with Acute Leukemia: A Retrospective Analysis *Lancet Oncol*. 2010;11(7):653-660.
  68. Cunha R, Loiseau P, Ruggeri A, Sanz G, Michel G, Iori AP, et al. Impact of HLA mismatch direction on outcome after umbilical cord blood transplantation for hematological malignant disorders: a retrospective Eurocord-EBMT analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(1):24-9. *Erratum in*: *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(6):864.
  69. Rocha V, Gluckman E. Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors; Eurocord-Netcord registry and European Blood and Marrow Transplant Group. *B J Haematol*. 2009;147(2):262-274.
  70. Laroche V, McKenna DH, Moroff G, Schierman T, Kadidlo D, McCullough J. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples. *Transfusion*. 2005;45(12):1909-16.
  71. Iori AP, Cerretti R, De Felice L, Screnci M, Mengarelli A, Romano A, et al. Pre-transplant prognostic factors for patients with high-risk leukemia undergoing an unrelated cord blood transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33(11):1097-1105.
  72. van Rood JJ, Stevens CE, Smits J, Carrier C, Carpenter C, Scaradavou A. Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;24(106):19952-7.
  73. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921-3928.
  74. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, Kowalski J, Tsai HL, Bolanos-Meade J, et al. Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(4):482-489.
  75. Wang Y, Chang YJ, Xu LP, Liu KY, Liu DH, Zhang XH, et al. Who is the best donor for a related HLA haplotype-mismatched transplant? *Blood*. 2014;124(6):843-50.
  76. Ciurea SO, Zhang MJ, Bacigalupo AA, Bashey A, Appelbaum FR, Aljitali OS, et al. Haploidentical transplant with post transplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126(8):1033-40.
  77. Ruggeri A, Labopin M, Sanz G, Piemontese S, Arcese W, Bacigalupo A, et al. Comparison of outcomes after unrelated cord blood and unmanipulated haploidentical stem cell transplantation in adults with acute leukemia. *Leukemia*. 2015;29(9):1891-900.
  78. Arcese W, Cerretti R, Cudillo L, De Angelis G, Picardi A, De Fabritiis P, et al. Survival of Patients with High Risk Hematological Malignancy after Allogeneic Transplant from HLA Identical Siblings Is Comparable to that of Patients Transplanted from Haploidentical, Unmanipulated Bone Marrow Donor: Results of a Matched-Pair Analysis from the Rome Transplant Network. *ASH Annual Meeting Abstracts*, *Blood*. 2014;124(21):1223.

## Parole Chiave

Trapianto cellule staminali ematopoietiche, MUD, sangue di cordone ombelicale, donatore aploidentico

## Indirizzi per la corrispondenza

*William Arcese*  
 Università di Roma Tor Vergata, Roma  
 E-mail: [william.arcese@uniroma2.it](mailto:william.arcese@uniroma2.it)  
 Tel: (+39) 0620903227  
 Fax: (+39) 06209032

## Si ringrazia

Il Dott. Marco Andreani, il Dott. Fabio Di Piazza, la Dott.ssa Ilaria Mangione per il loro contributo nella preparazione del manoscritto. Il presente lavoro è stato possibile anche grazie al supporto dell'Associazione-Onlus Matteo Fabrizio.



# Regimi di condizionamento



Franco Aversa<sup>1</sup>, Lucia Prezioso<sup>2</sup>, Ilenia Manfra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unità di Ematologia e Centro Trapianti Midollo Osseo, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Parma

<sup>2</sup>UOC Ematologia e Centro Trapianti Midollo Osseo, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

## Introduzione

L'infusione di cellule staminali ematopoietiche (CSE), sia provenienti da midollo osseo (MO) che sangue periferico (SP) o da cordone ombelicale (CO), avviene non appena terminata la fase di condizionamento del paziente con chemioterapia, eventuale radioterapia e/o immunoterapia. I componenti del regime di condizionamento variano in funzione della patologia di base, della fase di malattia, della sorgente di CSE e della qualità del prodotto infuso. Anche le finalità del condizionamento differiscono in base al tipo di trapianto. Nel *setting* autologo, il ruolo prevalente è quello di eradicare la maggior parte della malattia neoplastica attraverso la somministrazione di dosi sovra-massimali di chemioterapia che, in base alla patologia, può essere associata alla radioterapia o ad anticorpi monoclonali diretti contro antigeni espressi sulle cellule tumorali<sup>(1-4)</sup>. Nel *setting* allogenico, oltre all'eradicazione della malattia residua, il regime di condizionamento deve creare spazio nelle nicchie midollari per facilitare l'*homing* delle CSE del donatore ed esercitare una profonda immuno-soppressione in modo da contrastare la reazione di rigetto<sup>(5-9)</sup> (Figura 1). Effetto spazio e immuno-soppressione sono importanti anche in caso di trapianto per emopatie non neoplastiche dove il rischio di rigetto può essere anche maggiore a motivo della integrità del sistema immunitario e, talora, la sensibilizzazione secondaria alle trasfusioni di prodotti del sangue<sup>(10-12)</sup>. Una volta raggiunto l'attecchimento, si verifica un potente effetto immunologico mediato dai T linfociti alloreattivi del donatore che va sotto il nome di reazione trapianto-contro-ricevente (la *Graft-versus-Host Reaction*, GvHR) che contribuisce alla definitiva eradicazione del sistema immune residuo del ricevente (attecchimento stabile con chimerismo completamente donatore) e della malattia di base (*Graft-versus-Leukemia/Tumor*, GvL/GvT) ma che può complicarsi evolvendo verso la malattia trapianto-contro-ricevente (*Graft-versus-Host Disease*, GvHD)<sup>(13-16)</sup>. Il destino del trapianto allogenico dipende quindi dalla bilancia tra la capacità antitumorale del programma trapiantologico (intensità del regime di condizionamento e effetto GvL) e la riduzione delle maggiori complicanze

del trapianto medesimo (danno d'organo, infezioni, severità e durata della GvHD). Un programma trapiantologico dovrebbe idealmente comprendere un regime di condizionamento dotato di buona attività anti-neoplastica ma scarsa o nulla tossicità sulle mucose e gli organi e un livello di immuno-soppressione adeguato a facilitare l'attecchimento delle stesse CSE. In realtà, il regime di condizionamento deve essere visto nel contesto dell'intera procedura trapiantologica in quanto non esiste il condizionamento ideale ma esiste il condizionamento che si adatta meglio di un altro a quella strategia di allo-trapianto disegnata non solo sui farmaci pre-trapianto ma soprattutto su qualità dell'inoculo e procedure di prevenzione della GvHD.

## Evoluzione dei regimi di condizionamento

Nelle ultime due decadi si è assistito a un significativo cambiamento dello scenario trapiantologico che ha portato alla declinazione di regimi di condizionamenti diversificati sulla base della malattia, dell'età del ricevente, della prevenzione della GvHD, della sorgente di CSE e del tipo di donatore. La CSE vengono attualmente raccolte non solo dal midollo osseo ma anche, e sempre più spesso, dal sangue periferico grazie alla loro mobilitazione sotto stimolazione con fattori di crescita granulocitari. La possibilità di infondere quantitativi maggiori di CSE usando il sangue periferico ha facilitato la progressiva introduzione dei regimi di condizionamento ad intensità ridotta *reduced intensity conditioning* (RIC) e di quelli non-mieloablativi (N-MAC) per trattare pazienti di età avanzata e/o con co-morbidità che rendono non eleggibile il paziente per un trapianto convenzionale. Infine, si è assistito ad un sempre maggiore impiego di donatori non familiari *matched unrelated donor* (MUD), di unità di sangue cordonale *unrelated cord blood* (UCB) e di familiari solo parzialmente compatibili (aploidentici)<sup>(7,17-25)</sup>. Tutte queste variazioni nelle procedure non possono però prescindere dal concetto che nel trapianto si realizza una competizione tra le CSE e il sistema immune del donatore con i fattori ematopoietici (CSE

normali e leucemiche) e immunologici (T linfociti) del ricevente. Variazioni nella composizione dell'inoculo richiedono in genere altrettanti cambiamenti nel regime di condizionamento del paziente e nelle strategie di immuno-soppressione post-trapianto.

I regimi mieloablativi (MAC) favoriscono, in genere, un rapido attecchimento delle CSE allogeniche e una buona eradicazione della malattia neoplastica residua, ma sono gravati da elevata tossicità e *non-relapse mortality* (NRM), essenzialmente per GvHD e infezioni <sup>(26)</sup>. Il danno tissutale indotto dai regimi MAC provoca un rilascio di citochine pro-infiammatorie che aumentano l'alloreattività dei T linfociti del donatore nei riguardi dei tessuti del ricevente con un rischio quindi più elevato di innescare la GvHD acuta <sup>(13-15, 26)</sup>. In realtà, i regimi MAC nascono nell'intento di ridurre il rischio di recidiva leucemica post-trapianto e per questi motivi negli anni sono stati disegnati regimi sempre più mieloablativi basati sulla *total body irradiation* (TBI) variamente combinata con ciclofosfamide (CY), etoposide e altri chemioterapici <sup>(7, 9, 27-31)</sup>. Nell'esperienza di Seattle, incrementi nelle dosi totali della TBI hanno ridotto la probabilità di recidiva leucemica, ma non hanno aumentato la sopravvivenza a causa di una maggiore NRM <sup>(28)</sup>. Queste problematiche hanno ristretto l'utilizzo di tali condizionamenti principalmente a pazienti giovani e privi di comorbidità importanti. Una soluzione a queste

importanti limitazioni è arrivata dalla dimostrazione della ridotta tossicità dei regimi RIC e N-MAC, decisamente più immunosoppressivi che mieloablativi <sup>(7,33)</sup>. La comprensione dei meccanismi biologici del trapianto allogenico ha insegnato che le stesse CSE e i linfociti T alloreattivi dell'inoculo creano spazio nel midollo e nel sistema immune residuo del ricevente contribuendo all'attecchimento e all'eradicazione della malattia. Queste evidenze hanno consentito di ridurre la tossicità legata ai condizionamenti e, con essa, anche l'attivazione della GvHD lasciando aperta la speranza per una dissociazione tra GvHD e effetto GvL <sup>(34)</sup>. In effetti, anche con programmi RIC/N-MAC i due maggiori obiettivi del trapianto, attecchimento e effetto GvL, possono essere garantiti attraverso l'infusione di CSE del sangue periferico che contengono un maggior numero di cellule CD34+ e di T linfociti rispetto al solo midollo osseo <sup>(35,36)</sup>. Inoltre, in caso di chimerismo misto e/o persistenza della malattia di base, è possibile spostare la bilancia immunologica a favore del donatore attraverso la successiva infusione di T linfociti del donatore (*donor lymphocyte infusion*) (DLI) per favorire il chimerismo completo e potenziare l'effetto GvL <sup>(37,38)</sup>. Purtroppo, i tempi per poter beneficiare dell'effetto alloimmune del trapianto dipendono anche dal tipo di malattia e dalla fase di questa al momento del trapianto. In pazienti con leucemia acuta è stata ampiamente

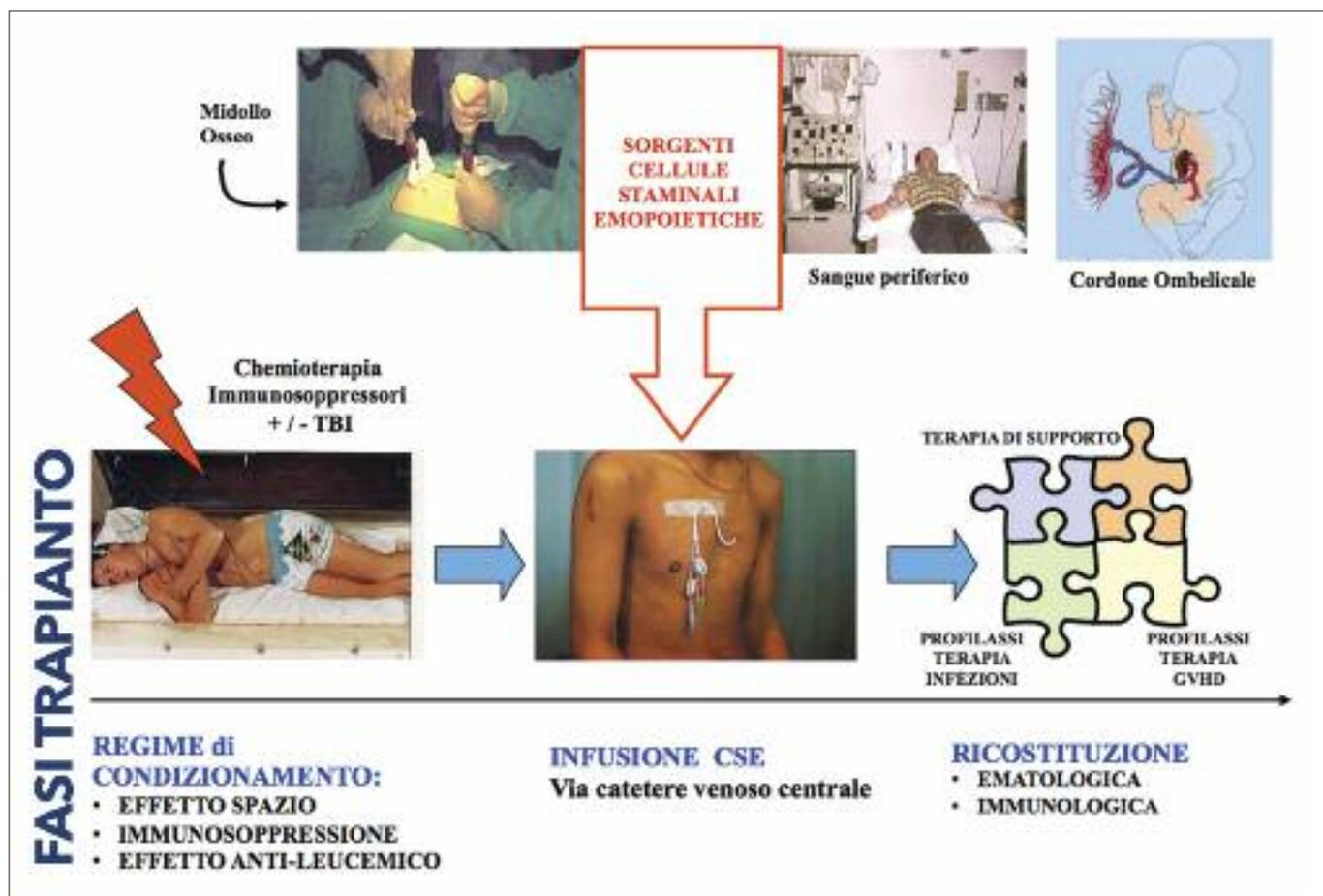


Figura 1 – Schema di trapianto allogenico

confermata la significativa riduzione della NRM ma, allo stesso tempo, è stata registrata un'umentata incidenza di recidiva<sup>(38,39)</sup>. Queste osservazioni hanno portato a una progressiva intensificazione della piattaforma dei regimi RIC/N-MAC con l'introduzione di nuovi farmaci scelti sempre nell'ottica di un buon profilo di tollerabilità ma con un maggiore effetto anti-leucemico.

In realtà, tutte queste diverse terminologie non consentono di definire, almeno sul piano clinico, l'intensità di un condizionamento anche a causa dell'ampia eterogeneità degli stessi, delle notevoli differenze nelle malattie trattate e in ultimo, la disomogenea strategia per la prevenzione della GvHD<sup>(7,33,40)</sup>. Un regime RIC è talvolta definito sulla base del semplice dimezzamento delle dosi di agenti impiegati in un regime MAC. Un altro criterio alquanto semplice ma riproducibile è quello basato sulla potenza mieloablattiva misurata attraverso la durata della citopenia e sulla necessità o meno di dover infondere CSE per il recupero ematologico. I regimi MAC si basano su più farmaci somministrati alle dosi massime tollerate, causano prolungata citopenia e richiedono sempre il *rescue* con cellule staminali pena una severa e protratta aplasia decisamente ad alto rischio di mortalità per cause emorragiche e/o infettive. I regimi N-MAC non causano citopenia severa e protratta e possono non richiedere *rescue* con cellule staminali. I regimi RIC si posizionano tra questi due gruppi e richiedono il supporto di CSE in quanto, in caso di mancato attecchimento, il recupero autologo si verificherebbe solo dopo molte settimane lasciando il paziente a rischio elevato di infezione<sup>(7,33,40)</sup>.

## Condizionamento con radioterapia

La radioterapia, erogata principalmente come irradiazione totale corporea *total body irradiation* (TBI), è stato il primo approccio terapeutico utilizzato per i trapianti allogenici in pazienti con patologie neoplastiche e viene ancora utilizzata per le sue eccellenti proprietà immunosoppressive, per la sua attività antitumorale contro un'ampia gamma di neoplasie anche chemio-resistenti e per la capacità di penetrare nei santuari (sistema nervoso centrale e gonadi) delle cellule leucemiche.

La TBI può essere somministrata in diverse modalità (dose singola, frazionata o iperfrazionata) e con differenti dosaggi (da 2 a oltre 15 Gy) e differenti *dose-rates*. La dose singola è impiegata in programmi in cui si richiede un potente effetto immuno-soppressivo, il frazionamento è preferito per una tossicità inferiore e un maggiore effetto antineoplastico legato alle dosi più elevate erogate e alla conservazione dei meccanismi di riparazione nelle cellule sane rispetto a quelle neoplastiche<sup>(41-44)</sup>. Anche la TBI si è evoluta nel tempo con l'uso di nuovi sistemi di erogazione che permettono una definizione molto accurata dei bersagli e una schermatura adeguata a limitare la dose a carico di organi sensibili, in particolare il polmone spesso destinato a ricevere dosi elevate gravate da un'alta incidenza di in-

terstizio-patia<sup>(42,44)</sup>. Dosi elevate di TBI contribuiscono a ridurre la probabilità di recidiva ma aumentano la tossicità polmonare e gastrointestinale, come pure le alterazioni nello sviluppo e nella crescita, l'insufficienza polmonare cronica e l'insorgenza di seconde neoplasie<sup>(46)</sup>. Alla TBI si sono negli anni affiancate la *total lymphoid irradiation* (TLI) e la *total marrow irradiation* (TMI)<sup>(47-49)</sup>. La prima con lo scopo di aumentare l'immuno-soppressione e la seconda la mieloablazione; entrambe però con la finalità di non indurre tossicità al di fuori delle aree raggiunte dalle radiazioni.

In generale i valori sono più alti nella TBI frazionata (da 12 a 15,75 Gy) rispetto a quella in dose singola (2-8 Gy). Uno studio del gruppo di Seattle in pazienti con leucemia acuta mieloide in prima remissione randomizzati a ricevere un dosaggio di 15,75 Gy si notava una riduzione della percentuale di recidive rispetto a pazienti che ricevevano 12 Gy. Tale vantaggio veniva contrastato dall'aumentata mortalità trapianto correlata con nessun miglioramento della sopravvivenza globale<sup>(28)</sup>. Studi di dose escalation hanno dimostrato che schemi di TBI con frazioni di 2 Gy x 2/die consentivano dosi totali di 16 Gy. Per contro, per frazioni di 2 Gy x 3/die, la dose tollerata scendeva a 14,4 Gy, indicando che un intervallo più breve tra le frazioni previene la riparazione nei tessuti normali<sup>(41,42,44)</sup>. La TBI può inoltre essere potenziata sul versante anti-leucemico attraverso la somministrazione di dosi aggiuntive (*booster*) su aree considerate santuari di malattia o interessate da grosse masse tumorali (malattia *bulky*).

Un recente studio del gruppo italiano di oncologia radiologica ha valutato l'impatto di diverse modalità di erogazione della TBI in pazienti sottoposti a trapianto allogenico per leucemia acuta in 11 centri distribuiti sul territorio nazionale<sup>(45)</sup>. Nella maggioranza dei casi (86,4%) la TBI è stata erogata in dose frazionata o iperfrazionata, anche se con differenti dosi totali e frazioni (Tabella 1). Dallo studio emerge il concetto che lo schema di TBI riflette la tipologia di trapianto. La dose singola è stata somministrata a dosi variabili da 7 a 8 Gy, prevalentemente nei trapianti aploidentici T depletati, la frazionata e l'iperfrazionata nei trapianti compatibili, inclusi quelli da donatore non correlato. L'analisi multivariata ha evidenziato che la sopravvivenza globale dipende dal tipo di trapianto con un vantaggio per quelli da familiare identico (probabilmente perché ricevono il trapianto nelle condizioni più favorevoli per disponibilità immediata del donatore) mentre la recidiva risente del tipo di malattia (maggiore nella leucemia acuta linfoblastica), dell'assenza dell'effetto GvHD/GvL e della scheda di TBI (minore dopo dose singola o iper-frazionata)<sup>(45)</sup>.

La TBI, con l'eccezione dello schema N-MAC di Seattle (2 Gy in monoterapia), viene variamente combinata con farmaci ad attività antitumorale e/o immunomodulante. Oltre alla ciclofosfamide, vari agenti, come citarabina<sup>(50)</sup>, etoposide<sup>(51)</sup>, melfalan<sup>(52)</sup> e busulfano<sup>(53)</sup> sono stati combinati con la TBI sia in dose singola che frazionata.

	Autologo (n=128)	Famigliare HLA-identico (n=192)	Aploidentico (n=74)	Non consanguineo (n=113)	P value
<b>Dose totale (Gy)</b> 7-7,5-8 singola 9,9 frazionata 12-14,4 iperfrazionata Non riportato	0 13 115	11 54 126 1	51 1 22	6 16 91	<0,000
<b>Dose polmone (Gy)</b> 3,8-7,5 8-9,81 9,82-13 Non riportato	1 31 73 23	11 81 90 10	46 6 14 8	7 29 76 4	<0,000
<b>Booster testicolare*</b> SI NO Non riportato	23 13	33 42 2	7 17	24 39 3	0,056

\*maschi con leucemia acuta linfoblastica

Tabella 1 – Parametri TBI e tipo di trapianto <sup>(45)</sup>.

Nonostante l'estrema diversità dei vari schemi, mancano trial randomizzati che indichino la superiorità di un regime rispetto ad un altro. In malattie non neoplastiche, quali ad esempio l'anemia di Fanconi, nelle quali è in genere privilegiato l'effetto immuno-soppressivo ed è richiesto un minor rischio di NRM, l'irradiazione pre-trapianto è stata somministrata a campi circoscritti (irradiazione toraco-addominale) <sup>(54)</sup>.

## Regimi MAC

Un regime MAC è storicamente quello disegnato sulla TBI ma negli anni sono stati sviluppati regimi di condizionamento privi della TBI con l'intento di offrire il trapianto anche a pazienti già sottoposti in passato a radioterapia e a bambini/adolescenti maggiormente esposti ai danni a lungo tempo della TBI (sterilità, difetto di crescita, seconde neoplasie, etc). La TBI è gravata da una tossicità acuta diretta sul tessuto timico che si traduce in rallentato recupero immunitario post-trapianto <sup>(55,56)</sup> e, come già accennato, dal maggior rischio di indurre GvHD attraverso la creazione di un ambiente infiammatorio per danno tessutale <sup>(13-15)</sup>. L'età avanzata, la GvHD e i regimi MAC basati sulla TBI alterano la funzione timica e interferiscono con la rigenerazione timica delle cellule T naive che, in presenza di GvHD, avviene dopo molti mesi con conseguente maggiore rischio di morbidità/mortalità infettiva <sup>(56)</sup>.

La TBI è stata però per anni il cardine per i programmi di trapianto basati sulla prevenzione della GvHD mediante deplezione dei T linfociti dall'inoculo <sup>(57-59)</sup>. In effetti, la T-deplezione ha evidenziato il ruolo della bilancia immunologica nel trapianto e di conseguenza, la necessità di adottare manovre di compenso per prevenire il rischio di rigetto e di recidiva <sup>(60,61)</sup>. Il rigetto di CSE allogeneiche T-depletate è mediato da precursori linfoidi T citotossici (CTLp) del ricevente che, sopravvissuti al regime di condizionamento e non più contra-

stati dai T linfociti presenti in grande quantità in un inoculo non manipolato, sono ancora in grado di indurre il rigetto su base immunologica (competizione immunologica) <sup>(62,63)</sup>. Studi nel modello murino hanno inoltre dimostrato che il rigetto del midollo T-depletato dipende anche dalla competizione tra le cellule emopoietiche del donatore e quelle del ricevente (competizione staminale) <sup>(64)</sup>. In animali sottoposti a trapianto di cellule midollari T-depletate, un chimerismo *donor-type* è stato raggiunto in percentuale maggiore negli animali condizionati con TBI e farmaci ad elevato potere mieloablativo, quali busulfano, dimetilmyleran (DMM) o tiotepa (TT) rispetto a quelli preparati con la classica ciclofosfamide <sup>(64-66)</sup>. Ne consegue che l'infusione di CSE sottoposte ad una profonda T-deplezione, deve avvenire solo dopo aver adeguatamente modificato il regime di condizionamento. In effetti, condizionamenti convenzionali, quali TBI+CY o busulfano+ciclofosfamide (BU/CY), non garantiscono l'eradicazione del sistema immune del ricevente né della malattia leucemica residua. L'adozione di un condizionamento potenziato sul versante immuno-mielo-ablativo ha consentito di superare il problema del rigetto e della recidiva leucemica in due studi pilota condotti in USA <sup>(67)</sup> e in Italia <sup>(68)</sup>. In entrambi i centri, la sola T deplezione è stata in grado di prevenire la GvHD acuta e cronica e, con essa, la tossicità del regime MAC che vedeva la combinazione di alte dosi di TBI (14,40 Gy in 12 frazioni) con altri farmaci mielo-tossici (CY, ATG e TT). Queste esperienze hanno anche evidenziato il ruolo del siero anti-timocitario (ATG) nel regime di condizionamento al trapianto di midollo osseo sottoposto a T deplezione *ex vivo*. In effetti, per la sua lunga emivita, l'ATG esercita un addizionale effetto immuno-soppressivo nei confronti dei linfociti T residui del ricevente (azione anti-rigetto) e di quelli alloreattivi del donatore (azione anti-GvHD) <sup>(69)</sup>. Purtroppo l'ATG esercita anche un effetto di T deplezione *in vivo* che compromette la ricostituzione immu-

nologica post-attecchimento contribuendo ad aumentare il rischio infettivo. Negli anni successivi, la T-deplezione basata su metodiche immunofisiche è progressivamente uscita di scena da un lato per la laboriosità della procedura e dall'altro per la comparsa sul mercato di separatori cellulari in grado di selezionare le cellule CD34+ nel sangue periferico e di infondere inoculi ricchi in cellule CD34+ (megadose di staminali) e profondamente (4-5 log) T-depletati. La dimostrazione delle proprietà immunologiche delle cellule CD34+ selezionate dal sangue periferico (il cosiddetto effetto veto)<sup>(70,71)</sup> ha indotto a modificare il regime di condizionamento sul versante immunosoppressivo partendo dall'ipotesi che l'attecchimento potesse essere sostenuto dalla stessa megadose di CSE del sangue periferico e la prevenzione della GvHD dalla profonda T deplezione, rendendo non più indispensabile l'impiego dell'ATG per la prevenzione del rigetto e della GvHD. Inoltre, eliminando l'ATG dal condizionamento, si poteva ipotizzare una migliore ricostituzione immunologica per il mancato effetto di deplezione *in vivo*. Ancora una volta, le premesse cliniche hanno portato a disegnare un regime di condizionamento MAC senza ATG; e i risultati clinici non hanno dimostrato alcun impatto negativo su attecchimento e GvHD, ma una significativa riduzione della morbilità e mortalità infettiva per la migliore ricostituzione immunologica<sup>(72)</sup>. L'ATG rimane invece un farmaco utile nella prevenzione della GvHD in trapianti T repleti anche se c'è una certa discordanza tra i vari studi che in parte potrebbero dipendere dalle differenti dosi e tipi di ATG usati nei vari centri<sup>(73-75)</sup>. Una meta-analisi di 7 studi clinici randomizzati conferma la riduzione, nel braccio ATG, della GvHD acuta severa ma non della NRM<sup>(73)</sup>. Per contro, in un recente studio prospettico randomizzato dell'EBMT nel trapianto non manipolato da donatore compatibile familiare o non consanguineo, l'ATG inserita nel condizionamento ha ridotto la GvHD e la NRM e contribuito a migliorare la sopravvivenza globale<sup>(76)</sup>. Una panoramica dei protocolli disegnati per il trapianto è schematizzata nelle Tabelle 2 e 3.

## Dal MAC senza TBI al RIC/N-MAC

Il passaggio dalle cellule staminali emopoietiche midollari a quelle mobilizzate nel sangue periferico e il concetto dell'effetto veto delle CD34+ hanno rivoluzionato lo scenario trapiantologico degli ultimi 20 anni, consentendo di disegnare regimi a intensità variabile non essendo più rilevante il problema del rigetto<sup>(77-86)</sup>. Queste innovazioni biologiche non solo hanno ridimensionato il significato del regime MAC in caso di T deplezione ma hanno anche consentito la progressiva riduzione dell'intensità del condizionamento fino all'adozione di regimi N-MAC e RIC, anche privi di TBI, sia nel trapianto da donatore compatibile che in quello da donatore aploidentico<sup>(85-89)</sup> in passato considerato ad alto rischio di rigetto anche dopo regimi MAC includenti la TBI<sup>(79)</sup>.

Negli schemi di combinazione che potessero sostituire la TBI anche

in programmi di trapianto da donatore alternativo, i farmaci utilizzati nei condizionamenti MAC sono cambiati anche se gli agenti alchilanti rimangono i farmaci cardine per il loro favorevole profilo di tossicità (soprattutto midollare) e il loro effetto sulle cellule tumorali in fase non replicativa. Lo schema BUCY4 (busulfano 16 mg/kg dose totale e ciclofosfamide 200 mg/kg, poi ridotta a 120 mg/kg-BUCY2) è stato il primo esempio di condizionamento alternativo alla TBI+CY<sup>(90,91)</sup>. La sostituzione del busulfano orale con la formulazione endovenosa ha consentito di superare le note problematiche di farmacodinamica/farmacocinetica PD/PK di quella orale con riduzione della tossicità, in particolare epatica, quando associato alla CY<sup>(7)</sup>. Incoraggianti risultati sono emersi da studi, con casistiche limitate, in cui il busulfano (16 mg/kg) veniva associato ad un altro alchilante, il melfalan (140 mg/m<sup>2</sup>)<sup>(92,93)</sup>. Negli anni sono state esplorate altre combinazioni di busulfano e ciclofosfamide con tiotepa, o etoposide<sup>(94,95)</sup>. Un recente studio del CIBMTR ha dimostrato che il passaggio dal busulfano orale a endovenoso nello schema BUCY comporta una ridotta probabilità di recidiva e una sopravvivenza superiore a quanto ottenuto nella coorte di pazienti con leucemia acuta mieloide condizionati con TBI/CY<sup>(96)</sup>. Un contributo decisamente importante nella ricerca di nuove aggregazioni di polichemioterapia ad alta intensità mieloablativa ma bassa tossicità extra-ematologica è stato offerto dalla dimostrazione che la fludarabina, un analogo nucleosidico largamente impiegato nella terapia dei disordini linfoproliferativi cronici, possedeva marcata proprietà immunosoppressiva, effetto antineoplastico per inibizione dei meccanismi di riparazione del DNA ma minima tossicità d'organo<sup>(97)</sup>. Introdotta con successo per la prima volta nel condizionamento al trapianto aploidentico nel 1995 dal gruppo di Perugia al posto della storica CY<sup>(79,80,98)</sup>, la fludarabina è diventato il farmaco perno su cui basare i più recenti protocolli di condizionamento, in particolare a ridotta intensità<sup>(7)</sup>. Lo schema Bu(iv)-fludarabina ha confermato un ulteriore miglioramento del profilo di tossicità in particolare nei pazienti con leucemie mieloidi<sup>(99,100)</sup>, anche se, in un più recente studio randomizzato su 126 pazienti con leucemia e sindrome mielodisplastica, la combinazione BUCY è risultata migliore in termini di sopravvivenza<sup>(101)</sup>. Il busulfano endovena è stato usato con dosi e schedule di somministrazioni variabili di volta in volta adattate alla tipologia di pazienti. Il gruppo di Marsiglia ha disegnato uno schema per pazienti considerati non idonei per un trapianto MAC per età e malattie in fase avanzata. In questo schema il busulfano è stato impiegato alla dose di 100 mg/m<sup>2</sup> in singola dose giornaliera di 3 ore di infusione ripetuta per 4 giorni consecutivi ed è stato associato a fludarabina e ATG<sup>(102)</sup>. Il regime è risultato adeguatamente immunosoppressivo dal momento che tutti 30 pazienti hanno raggiunto l'attecchimento completo. Non sono state segnalate tossicità importanti e la NRM è stata del 13% ad 1 anno, simile a quanto riportato dopo condizionamento con busulfano a dose piena con o

Regimi di condizionamento MAC		
TBI		
Ref	Dose (Gy)	Chemioterapia
Brochstein JA et al, NEJM 1987 <sup>(27)</sup>	13,2	Ciclofosfamide 120 mg/kg
Riddell S et al, JCO 1988 <sup>(50)</sup>	12	Citarabina 36 g/m <sup>2</sup> ± Ciclofosfamide 60 mg/kg
Blume KG et al, Blood 1987 <sup>(51)</sup>	12-13,2	Etoposide 60 mg/kg
Jurado M et al, BBMT 2002 <sup>(128)</sup>	12	Busulfano 7 mg/kg
Bhatnagar B et al, Ann Hematol 2014 <sup>(52)</sup>	12	Melfalan 100-110 mg/m <sup>2</sup>
Zecca M et al, JCO 1999 <sup>(129)</sup>	13,8	Ciclofosfamide 120 mg/kg Tiotepa 10 mg/kg
Jillella AP et al, BMT 1999 <sup>(130)</sup>	14	Ciclofosfamide 40-50 mg/kg Citarabina 18 g/m <sup>2</sup>
Busulfano		
Ref.		Chemioterapia
Ferry C et al, Exp Hematol 2003 <sup>(31)</sup>		Busulfano 16 mg/kg (PO) Ciclofosfamide 120 mg/kg
Rambaldi A et al, Lancet Oncol 2015 <sup>(32)</sup>		Busulfano 12,8 mg/kg (EV) Fludarabina 160 mg/m <sup>2</sup>
Vey N et al, BMT 1996 <sup>(93)</sup>		Busulfano 16 mg/kg (PO) Melfalan 140 mg/m <sup>2</sup>

Regimi di condizionamento RIC/NMA		
Fludarabina		
Ref	TBI (Gy)	Chemioterapia
Gyurkocza B et al, JCO 2010 <sup>(131)</sup>	2	Fludarabina 90 mg/m <sup>2</sup>
Papllham P et al, Leukemia Research Reports 2014 <sup>(132)</sup>	/	Fludarabina 125 mg/m <sup>2</sup> Ciclofosfamide 2 gr/m <sup>2</sup>
Christopoulos P et al, BMT 2013 <sup>(133)</sup>	/	Fludarabina 90-150 mg/m <sup>2</sup> Tiotepa 15 mg/kg
Brammer JE et al, BBMT 2015 <sup>(47)</sup>	2	Fludarabina 90 mg/m <sup>2</sup> Busulfano 3,2 mg/kg (EV)
Yerushalmi R et al, BMT 2015 <sup>(111)</sup>	/	Fludarabina 150 mg/m <sup>2</sup> Treo-sulfano 36-42 g/m <sup>2</sup>
Taussig DC et al, JCO 2003 <sup>(134)</sup>	/	Fludarabina 125 mg/m <sup>2</sup> Ciclofosfamide 2 gr/m <sup>2</sup> Melfalan 140 mg/m <sup>2</sup>
Tauro S et al, JCO 2005 <sup>(135)</sup>	/	Fludarabina 150 mg/m <sup>2</sup> Melfalan 140 mg/m <sup>2</sup> Alemtuzumab 100 mg
Bryant A et al, BMT 2014 <sup>(117)</sup>	/	Fludarabina 50-60 mg/m <sup>2</sup> Melfalan 100-140 mg/m <sup>2</sup>
Giralt S et al, Blood 1997 <sup>(35)</sup>	/	Fludarabina 120 mg/m <sup>2</sup> Citarabina/AraC 8 g/m <sup>2</sup> + Melfalan 140 mg/m <sup>2</sup> o Idarubicina 36 mg/m <sup>2</sup>
Schmid C et al, JCO 2005 <sup>(37)</sup>	/	Fludarabine 120 mg/m <sup>2</sup> Citarabina 8 g/m <sup>2</sup> Amsacrina 400mg/m <sup>2</sup> 3 giorni di rest: FLAMSA-RIC TBI 4 Gy ATG 30-60 mg/kg Ciclofosfamide 80-120 mg/kg
Saure C et al, BBMT 2012 <sup>(136)</sup>	/	Fludarabine 120 mg/m <sup>2</sup> Citarabina 8 g/m <sup>2</sup> Amsacrina 400mg/m <sup>2</sup> 2-3 giorni di rest: FLAMSA-MEL ATG 30-60 mg/kg Melfalan 100-200 mg/m <sup>2</sup>
Altri regimi		
Lowsky R et al, NEJM 2005 <sup>(137)</sup>		Total Lymphoid Irradiation 8Gy ATG 7 mg/kg

Tabella 2 – Regimi di condizionamento MAC e RIC/NMA - Donatore compatibile.

Regimi di condizionamento MAC trapianto aploidentico			
TBI			
Ref	Tipologia di Trapianto	Dose (Gy)	Chemioterapia
Aversa et al, JCO 1999 <sup>(68)</sup>	T-depleto (SBA/E-rosette)	14.4	Ciclofosfamide 100 mg/kg Tiotepa 10 mg/kg ATG 25 mg/kg
Terenzi A et al, Transplant Proc 1996 <sup>(98)</sup>	T-depleto (SBA/E-rosette)	12	Fludarabina 200 mg/m <sup>2</sup> Tiotepa 10 mg/kg ATG 6-10 mg/kg Timoglobuline o 20-25 mg/kg Fresenius
Handgretinger et al, BMT 2001 <sup>(138)</sup>	T-depleto (selezione positiva CD34+)	12	Ciclofosfamide 120 mg/kg Tiotepa 10 mg/kg ATG 30 mg/kg
Mehta et al, BMT 2004 <sup>(139)</sup>	T-depleto (anti-CD3 T10B9 o OKT3)	14.4	Ciclofosfamide 100 mg/kg Etoposide 20 mg/kg Citarabina 12 g/m <sup>2</sup> ±ATG 30 mg/kg
Di Ianni et al, Blood 2011 <sup>(140)</sup>	T-depleto (selezione positiva CD34+/Tregs/T cons)	8	Fludarabina 200 mg/m <sup>2</sup> Ciclofosfamide 70 mg/kg Tiotepa 8 mg/kg
Busulfano/Treosulfano			
Ref	Tipologia di Trapianto		Chemioterapia
Raiola et al, Biol Blood Marrow Transplant 2013 <sup>(127)</sup>	T-repleto		Busulfano 9,6 mg/kg Tiotepa 10 mg/kg Fludarabina 150 mg/m <sup>2</sup>
Huang X et al, BBMT 2009 <sup>(141)</sup>	T-repleto		Busulfano 36 mg/kg (PO) Citosine Arabinoside 8 g/m <sup>2</sup> Ciclofosfamide 3,6 g/m <sup>2</sup> Semustina (Me-CCNU) 250 mg/m <sup>2</sup> (PO) ATG 10 mg/kg
Handgretinger et al, BMT 2001 <sup>(138)</sup>	T-depleto (selezione positiva CD34+)		Busulfano 16.20 mg/kg PO Ciclofosfamide 200 mg/kg Tiotepa 10 mg/kg ATG 60 mg/kg
Prezioso et al, Blood 2013 [abstract] <sup>(116)</sup>	T-depleto (deplezione TCR alfa-beta/CD19)		Treosulfano 36 g/m <sup>2</sup> Tiotepa 10 mg/kg Fludarabina 150 mg/m <sup>2</sup> ATG 6 mg/kg
Regimi di condizionamento RIC			
Fludarabina			
Ref	Tipologia di Trapianto	Dose TBI (Gy)	Chemioterapia
Rizzieri et al, JCO 2007 <sup>(142)</sup>	T-repleto	/	Fludarabina 120 mg/m <sup>2</sup> Ciclofosfamide 2 g/m <sup>2</sup> Alemtuzumab 100 mg
Kanda et al, Transpl 2005 <sup>(143)</sup>	T-repleto	±	Fludarabina 180 mg/kg Busulfano 16 mg/kg (PO) Alemtuzumab 1,2 mg/kg
Luznik et al, BBMT 2008 <sup>(144)</sup>	T repleto (CYpost-HSCT 50 mg/kg gg +3,+4)	2	Fludarabina 150 mg/m <sup>2</sup> Ciclofosfamide 29/g
Ogawa et al, BBMT 2006 <sup>(145)</sup>	T-repleto	/	Fludarabina 150 mg/m <sup>2</sup> Busulfano 8 mg/kg (PO) ATG 8 mg/kg
Handgretinger et al, Ann N Y Acad Sci 2007 <sup>(146)</sup>	T-depleto (deplezione CD3+/CD19+)	/	Fludarabina 140 mg/m <sup>2</sup> Tiotepa 10 mg/kg Melfalan 140 mg/m <sup>2</sup> OKT3 100 mg

Tabella 3 – Regimi di condizionamento MAC trapianto aploidentico.

anche senza ATG (dosi mieloablativo di busulfano i.v. di 12,8 mg/kg). Per l'ottimo profilo di tollerabilità e l'effetto sinergico antineoplastico, busulfano e fludarabina sono stati variamente associati ad altri farmaci con potente effetto mieloablativo ma ridotta tossicità quali tiotepa e treosulfano. Il tiotepa ha la più lunga e vasta esperienza essendo stato introdotto nel condizionamento al trapianto verso la fine degli anni 1980 per potenziare l'effetto antineoplastico nel trapianto T depletato<sup>(103-105)</sup>. Il tiotepa si presta a incrementi di dosi (da 7 a 15 mg/kg) senza un aumento importante della tossicità extra-ematologica, penetra nel sistema nervoso centrale e può essere combinato con altri alchilanti oltre che con la TBI. Nonostante l'associazione con la TBI, il TT alla dose di 10 mg/kg è stato generalmente ben tollerato senza un aumentato rischio di mucositi severe e/o di VOD epatica sia in trapianti compatibili che aploidentici<sup>(80,83)</sup>. In considerazione del potenziale effetto radio-sensibilizzante del TT, il farmaco è in genere utilizzato dopo la TBI<sup>(66)</sup>. Il treosulfano è efficace contro diversi tipi di cellule maligne, unisce proprietà immuno- e mielo-ablative ed ha una limitata tossicità<sup>(106-109)</sup>. La sua associazione con la fludarabina configura un regime intermedio tra un RIC e un N-MAC per il rapido e completo attecchimento, una valida attività antitumorale e un profilo di tossicità favorevole<sup>(110-113)</sup>. Lo schema TBF (tiotepa, busulfano, fludarabina) è oggi impiegato in molti centri sia in programmi di trapianto compatibile che aploidentico<sup>(114,115)</sup>. Una variante che comprende l'associazione treosulfano, tiotepa, fludarabina e ATG si è rivelata efficace in termini di immuno-soppressione, mielo-ablazione e tollerabilità anche in soggetti adulti e anziani riceventi un trapianto aploidentico dopo T deplezione delle sole sottopopolazioni alfa/beta T linfoidi e di B linfociti CD19+<sup>(116)</sup>. Altro partner della fludarabina è il melphalan che, in virtù di un effetto sinergico, ha consentito di ottenere incoraggianti risultati in pazienti con leucemia acuta o mielodisplasia ma senza un reale impatto sulla sopravvivenza globale<sup>(117, 118)</sup>. Una recente meta-analisi ha esplorato l'impatto dei regimi RIC e MAC nel trapianto allogenico per emopatie maligne. Dalla ricerca bibliografica sono emersi 1.776 records e 29 studi per un totale di 6.235 pazienti<sup>(119)</sup>. I regimi RIC si associano a minore incidenza di GvHD acuta di grado >II e NRM ma, a fronte di un'aumentata probabilità di recidiva, la sopravvivenza libera da malattia è inferiore. Un vantaggio del RIC in termini di sopravvivenza globale si vede solo ad 1 anno mentre a 2 anni non emerge alcuna differenza. Altre complicanze quali GvHD cronica e numero di riattivazioni del citomegalovirus non mostrano differenze in incidenza e severità tra i due regimi. Uno studio retrospettivo dell'EBMT<sup>(120)</sup> ha valutato l'impatto di due diversi regimi di condizionamento mieloablativi al trapianto da fratello identico o da non consanguineo in pazienti con leucemia acuta in fase di prima remissione. La popolazione includeva 121 pazienti nel braccio TT-based e 358 in quello TBI-based. Ad una mediana di 44 mesi, non è stata osservata una differenza tra

i due gruppi in termini di GvHD acuta grado II-IV, di GvHD cronica, di NRM (23,9% vs 22,4%), di recidiva (17,2% vs 23,3%) né di sopravvivenza globale a 2 anni (61,4% vs. 58%). Nella Tabella 4 sono riportati i più recenti protocolli di condizionamento diversificati per intensità immuno- e/o mielo-ablativa. Un problema ancora evidente dopo un condizionamento a ridotta intensità è il rischio di recidiva anche se l'effetto GvL dipende dal tipo e dalla fase di malattia. In 834 pazienti consecutivi condizionati con un regime a minima tossicità (2 Gy TBI isolata o associata a fludarabina), la probabilità di recidiva è risultata bassa solo in pazienti con patologie linfoproliferative (leucemia linfatica cronica, leucemia acuta linfoblastica, linfoma non Hodgkin e mieloma multiplo) in fasi non avanzate di malattia<sup>(121)</sup>.

## Conclusioni

La comprensione dei meccanismi biologici del trapianto, la disponibilità di nuovi farmaci o di nuove formulazioni di vecchi farmaci e il continuo progredire delle procedure di trapianto hanno modificato radicalmente lo scenario del trapianto allogenico ma, allo stesso tempo, hanno confermato che non esiste una reale superiorità del singolo regime di condizionamento quando non si prenda in considerazione l'intera procedura trapiantologica.

Una conferma di queste affermazioni può ritrovarsi nell'esperienza del trapianto aploidentico ritenuto, da sempre, quello gravato dalla più elevata mortalità trapiantologica per rigetto, GvHD e infezioni. In realtà, il regime di condizionamento che aveva un ruolo determinante nel trapianto aploidentico nel favorire l'attecchimento di CSE sottoposte a T deplezione *ex vivo*, ha visto ridimensionarsi il suo ruolo da quando sono state introdotte nuove modalità di selezione delle CSE periferiche T depletate<sup>(20,21,83,116,122-124)</sup> e l'impiego della CY post-trapianto nei trapianti T repleti per la prevenzione della GvHD<sup>(125-127)</sup>. La vasta esperienza maturata con questa tipologia di trapianto ha confermato che un'efficace prevenzione della GvHD contribuisce a ridurre la NRM del trapianto aploidentico indipendentemente dall'intensità del condizionamento. Per contro, i diversi condizionamenti possono influenzare la probabilità di recidiva. Un condizionamento mieloablativo MAC/RIC in assenza di GvHD può offrire maggiore garanzia di eradicazione della malattia neoplastica rispetto a un N-MAC soprattutto quando il trapianto è eseguito in pazienti con leucemia acuta ad alto rischio di recidiva.

I programmi trapianto basati su regimi a tossicità ridotta e l'utilizzo di diversi tipi di donatori hanno consentito di estendere l'opzione trapianto a un numero sempre crescente di pazienti compresi quelli di età superiore a 70 anni e con comorbidità. L'ottimizzazione delle procedure pre- e peri-trapianto unitamente all'adozione di nuove terapie di mantenimento post-attecchimento potrebbero offrire questa tipologia di trapianto anche a pazienti più giovani con la finalità di migliorare ulteriormente la loro qualità di vita.

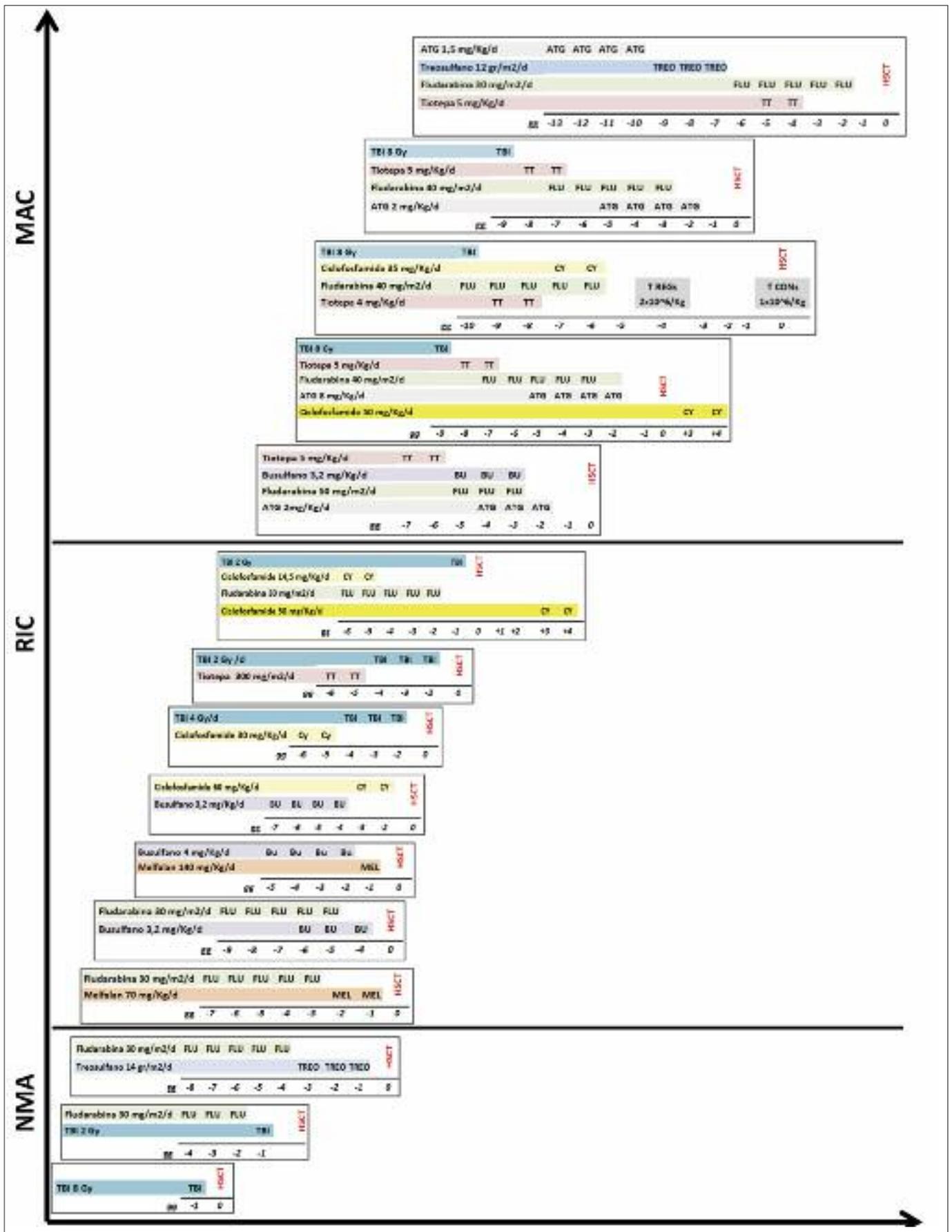


Tabella 4 – Protocolli di condizionamento diversificati per intensità immuno e/o mieloablativa.

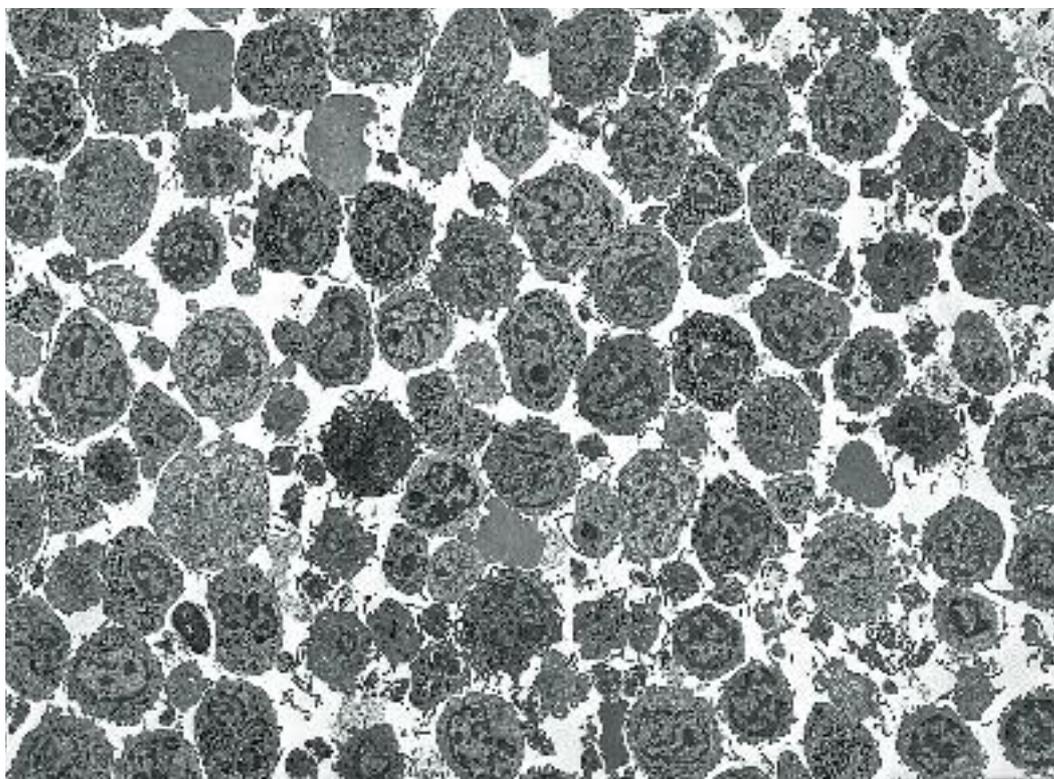
## Bibliografia

- Hübel K, de la Rubia J, Azar N, Corradini P. Current status of haematopoietic autologous stem cell transplantation in lymphoid malignancies: a European perspective. *Eur J Haematol*. 2015;94(1):12-22.
- Korbling M, Freireich E. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2011;117(24):6411-6416.
- Passweg JR, Baldomero H, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(9):1161-1167.
- Shimoni A, Zwas ST. Radioimmunotherapy and Autologous Stem-Cell Transplantation in the Treatment of B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Semin Nucl Med*. 2016;46(2):119-125.
- Gyurkocza B, Rezvani A, Storb RF. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(3):285-299.
- Gorin CN. Autologous stem cell transplantation versus alternative allogeneic donor transplants in adult acute leukemias. *Semin Hematol*. 2016;53(2):103-110.
- Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014;124(3):344-353.
- Oran B, Weisdorf DJ. Allogeneic stem cell transplantation in first complete remission. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(6):395-400.
- Visani G, Malagola M, Guiducci B, Lucesole M, Loscocco F, Gabucci E, et al. Conditioning regimens in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(4):465-479.
- Mathews V, Savani BN. Conditioning regimens in allo-SCT for thalassemia major. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(5):607-610.
- Talano JA, Cairo MS. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: state of the science. *Eur J Haematol*. 2015;94(5):391-399.
- Bacigalupo A. Bone marrow transplantation for acquired severe aplastic anemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(6):1145-1155.
- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561.
- Harris AC, Ferrara JL, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD. *Br J Haematol*. 2013;160(3):288-302.
- Maeda Y. Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. *Int J Hematol*. 2013;98(3):293-299.
- Warren EH, Deeg HJ. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens*. 2013;81(4):183-193.
- Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2012;367(16):1487-1496.
- Holtick U, Albrecht M, Chemnitz JM, Theurich S, Shimabukuro-Vornhagen A, Skoetz N, et al. Comparison of bone marrow versus peripheral blood allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in adults - a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;94(2):179-188.
- Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*. 2014;124(3):334-343.
- Kanakry CG, de Lima MJ, Luznik L. Alternative Donor Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol*. 2015;52(3):232-242.
- Reisner Y, Aversa F, Martelli MF. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: state of art. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(2):S1-S5.
- Zahid MF, Rizzieri DA. Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Expanding the Horizon for Hematologic Disorders. *Adv Hematol*. 2016;2016:1423493
- Di Stasi A, Milton DR, Poon LM, Hamdi A, Rondon G, Chen J, et al. Similar transplantation outcomes for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with haploidentical versus 10/10 human leukocyte antigen-matched unrelated and related donors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(12):1975-1981.
- Chaudhry M, Ali N. Reduced-intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation: looking forward to an international consensus. *Blood Res*. 2015;50(2):69-70.
- Sengsayadeth S, Savani BN, Blaise D, Malard F, Nagler A, Mohty M. Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia in complete remission - a review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica*. 2015;100(7):859-869.
- Nakasone H, Fukuda T, Kanda J, Mori T, Yano S, Kobayashi T, et al. Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(4):559-565.
- Brochstein JA, Kernan NA, Groshen S, Cirrincione C, Shank B, Emanuel D, et al. Allogeneic bone marrow transplantation after hyperfractionated total-body irradiation and cyclophosphamide in children with acute leukemia. *N Engl J Med*. 1987;317(26):1618-1624.
- Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, et al. Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood* 1990;76(9):1867-1871.
- Mohty M, Malard F, Savani BN. High-dose total body irradiation and myeloablative conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation: time to rethink? *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(4):620-624.
- Shi-Xia X, Xian-Hua T, Hai-Qin X, Bo F, Xiang-Feng T. Total body irradiation plus cyclophosphamide versus busulfan with cyclophosphamide as conditioning regimen for patients with leukemia undergoing allogeneic stem cell transplantation: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(1):50-60.
- Ferry C, Socié G. Busulfan-cyclophosphamide versus total body irradiation-cyclophosphamide as preparative regimen before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: what have we learned? *Exp Hematol*. 2003;31(12):1182-1186.
- Rambaldi A, Grassi A, Masciulli A, Boschini C, Micò MC, Busca A, et al. Busulfan plus cyclophosphamide versus busulfan plus fludarabine as a preparative regimen for allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(15):1525-1536.
- Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the intensity of conditioning regimens, working definitions. *Biol of Blood Marrow Transplant*, 2009;15(12):1628-1633.
- Warren EH, Deeg HJ. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens*. 2013;81(4):183-193.
- Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondón G, Anderlini P, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood*. 1997;89(12):4531-4536.
- Nagler A, Aker M, Or R, Naparstek E, Varadi G, Brautbar C, et al. Low-intensity conditioning is sufficient to ensure engraftment in matched unrelated bone marrow transplantation. *Exp Hematol*. 2001;29(3):362-370.
- 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(24):5675-5687.
- Resnick IB, Shapira MY, Slaviv S. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy for malignant and non-malignant diseases. *Transpl Immunol*. 2005;14(3-4):207-219.
- Shi-Xia X, Hai-Qin X, Xian-Hua T, Bo F, Xiang-Feng T. Comparison of reduced intensity and myeloablative conditioning regimens for stem cell transplantation in patients with malignancies: a meta-analysis. *Clin Transplant*. 2011;25(2):187-198.
- Giralt S, Ballen K, Rizzo D, Bacigalupo A, Horowitz M, Pasquini M, et al. Reduced intensity conditioning regimen workshop: defining the dose spectrum. Report of a workshop convened by the center for international blood and marrow transplant research. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(3):367-369.
- Peters LJ, Withers HR, Cundiff JH, Dicke KA. Radiobiological considerations in

- the use of total body irradiation for bone-marrow transplantation. *Radiology*. 1979;131(1):243-247.
42. Latini P, Checaglini F, Maranzano E, Panizza BM, Aristei C, Raymondi C, et al. Radiobiological considerations of total body irradiation in bone marrow transplant conditioning: hyperfractionation of dose and early results. *Rays*. 1987;12(2):81-88.
  43. Terenzi A, Aristei C, Aversa F, Pasqualucci L, Albi N, Velardi A, et al. Comparison of immunosuppressive effects of single-dose and hyperfractionated total body irradiation. *Transplant Proc*. 1994;26(6):3217.
  44. Shank B, O'Reilly RJ, Cunningham I, Kernan N, Yaholom J, Brochstein J, et al. Total body irradiation for bone marrow transplantation: the Memorial Sloan Kettering Cancer Center experience. *Radiother Oncol*. 1990;18(Suppl 1):68-81.
  45. Aristei C, Santucci A, Corvò R, Gardani G, Ricardi U, Scarzello G, et al. In haematopoietic SCT for acute leukemia TBI impacts on relapse but not survival: results of a multicentre observational study. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(7):908-914.
  46. Bhatia S, Louie AD, Bhatia R, O'Donnell MR, Fung H, Kashyap A, et al. Solid cancers after bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 2001;19(2):464-471.
  47. Brammer JE, Stentz A, Gajewski J, Curtin P, Hayes-Lattin B, Kovacsovics T, et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant for the treatment of patients with hematologic malignancies using busulfan, fludarabine, and total body irradiation conditioning is effective in an elderly and infirm population. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(1):89-96.
  48. Lee YH, Kim JY, Choi BO, Ryu MR, Chung SM. Total lymphoid irradiation based conditioning for hematopoietic stem cell transplantation in severe aplastic anemia. *Radiat Oncol J*. 2012;30(4):165-172.
  49. Springer A, Hammer J, Winkler E, Track C, Huppert R, Böhm A, et al. Total body irradiation with volumetric modulated arc therapy: Dosimetric data and first clinical experience. *Radiat Oncol*. 2016;22;11(1):46.
  50. Riddell S, Appelbaum FR, Buckner CD, Stewart P, Clift R, Sanders J, et al. High-dose cytarabine and total body irradiation with or without cyclophosphamide as a preparative regimen for marrow transplantation for acute leukemia. *J Clin Oncol*. 1988;6(4):576-582.
  51. Blume KG, Forman SJ, O'Donnell MR, Doroshow JH, Krance RA, Nademanee AP, et al. Total body irradiation and high-dose etoposide: a new preparatory regimen for bone marrow transplantation in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood*. 1987;69(4):1015-1020.
  52. Bhatnagar B, Rapoport AB, Fang HB, Ilyas C, Marangoz D, Akbulut V, et al. Single center experience with total body irradiation and melphalan (TBI-MEL) myeloablative conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation (SCT) in patients with refractory hematologic malignancies. *Ann Hematol*. 2014;93(4):653-660.
  53. Ciurea SO, Andersson BS. Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(5):523-536.
  54. Socié G, Gluckman E, Raynal B, Petit T, Landman J, Devergie A, Brison O. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia using low-dose cyclophosphamide/thoracoabdominal irradiation as conditioning regimen: chimerism study by the polymerase chain reaction. *Blood*. 1993;82(7):2249-2256.
  55. Williams KM, Mella H, Lucas PJ, Williams JA, Telford W, Gress RE. Single cell analysis of complex thymus stromal cell populations: rapid thymic epithelia preparation characterizes radiation injury. *Clin Transl Sci*. 2009;2(4):279-285.
  56. Castermans E, Hannon M, Dutrieux J, Humblet-Baron S, Seidel L, Cheynier R, et al. Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica*. 2011;96(2):298-306.
  57. Latini P, Checaglini F, Maranzano E, Aristei C, Panizza BM, Gobbi G, et al. Hyperfractionated total body irradiation for T-depleted HLA identical bone marrow transplants. *Radiother Oncol*. 1988;11(2):113-118.
  58. Novitzky N, Thomas V, Stubbings H, Hale G, Waldmann H. Radiotherapy-based conditioning is effective immunosuppression for patients undergoing transplantation with T-cell depleted stem cell grafts for severe aplasia. *Cytotherapy*. 2004;6(5):450-456.
  59. Aleya E, Neuberg D, Mauch P, Marcus K, Freedman A, Webb I, et al. Effect of total body irradiation dose escalation on outcome following T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(3):139-144
  60. Champlin RE. T-cell depletion for bone marrow transplantation: effects on graft rejection, graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and survival. *Cancer Treat Res*. 1990;50:99-111.
  61. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*. 1991;78(8):2120-2130.
  62. Reisner Y, Ben-Bassat I, Dourer D, Kaploon A, Schwartz E, Ramot B. Demonstration of clonable alloreactive host cells in a primate model for bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(11):4012-4015.
  63. Terenzi A, Aversa F, Albi N, Galandrini R, Dembech C, Velardi A, Martelli MF. Residual clonable host cell detection for predicting engraftment of T cell depleted BMTs. *Bone Marrow Transplant*. 1993;11(5):357-361.
  64. Lapidot T, Terenzi A, Singer TS, Salomon O, Reisner Y. Enhancement by dimethyl myleran of donor type chimerism in murine recipients of bone marrow allografts. *Blood*. 1989;73(7):2025-2032.
  65. Terenzi A, Aristei C, Aversa F, Pasqualucci L, Albi N, Velardi A, et al. Comparison of immune-suppressive effects of single-dose and hyper-fractionated total body irradiation. *Transplant Proc*. 1994;26(6):3217.
  66. Terenzi A, Lubin I, Lapidot T, Salomon O, Faktorowich Y, Rabi I, et al. Enhancement of T cell-depleted bone marrow allografts in mice by thiotepa. *Transplantation*. 1990;50(4):717-720.
  67. Papadopoulos EB, Carabasi MH, Castro-Malaspina H, Childs BH, Mackinnon S, Boulard F, et al. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation as postremission therapy for acute myelogenous leukemia: freedom from relapse in the absence of graft-versus-host disease. *Blood*. 1998;91(3):1083-1090
  68. Aversa F, Terenzi A, Carotti A, Felicini R, Jacucci R, Zei T, et al. Improved outcome with T-cell-depleted bone marrow transplantation for acute leukemia. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1545-1550.
  69. Waller EK, Langston AA, Lonial S, Cherry J, Somani J, Allen AJ, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9(7):460-471.
  70. Gur H, Krauthgamer R, Berrebi A, Klein T, Nagler A, Tabilio A, et al. Tolerance induction by megadose hematopoietic progenitor cells: expansion of veto cells by short-term culture of purified human CD34(+) cells. *Blood*. 2002;99(11):4174-81.
  71. Gur H, Krauthgamer R, Bachar-Lustig E, Katchman H, Arbel-Goren R, Berrebi A et al. Immune regulatory activity of CD34+ progenitor cells: evidence for a deletion-based mechanism mediated by TNF-alpha. *Blood*. 2005;105(6):2585-2593.
  72. Jakubowski AA, Small TN, Young JW, Kernan NA, Castro-Malaspina H, Hsu KC, et al. T cell depleted stem-cell transplantation for adults with hematologic malignancies: sustained engraftment of HLA-matched related donor grafts without the use of antithymocyte globulin. *Blood*. 2007;110(13):4552-4559.
  73. Kumar A, Mhaskar AR, Reljic T, Mhaskar RS, Kharfan-Dabaja MA, Anasetti C et al. Antithymocyte globulin for acute-graft-versus-host-disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review. *Leukemia*. 2012;26(4):582-588.
  74. Storek J, Mohty M, Boelens JJ. Rabbit anti-T cell globulin in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(6):959-970.
  75. Lu DP, Dong L, Wu T, Huang XJ, Zhang MJ, Han W, et al. Conditioning including antithymocyte globulin followed by unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation can achieve comparable outcomes with HLA-identical sibling transplantation. *Blood*. 2006;107(8):3065-3073.
  76. Kröger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, et al. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2016;374(1):43-53.
  77. Bachar-Lustig E, Rachamim N, Li HW, Lan F, Reisner Y. Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. *Nat Med*. 1995;1(12):1268-1273.

78. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Giannoni C, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood*. 1994;84:3948-3955.
79. Aversa F, Martelli MM, Reisner Y. Use of stem cells from mismatched related donors. *Curr Opin Hematol*. 1997;4(6):419-22.
80. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med*. 1998;339(17):1186-193.
81. Rowe JM, Lazarus HM. Genetically haploidentical stem cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27(7):669-676.
82. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Gordon P, Niethammer D. Megadose transplantation of highly purified haploidentical stem cells: current results and future prospects. *Pediatr Transplant*. 2003;7(3):51-55.
83. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3447-54.
84. Ciceri F, Labopin M, Aversa F, Rowe JM, Bunjes D, Lewalle P et al. Acute Leukemia Working Party (ALWP) of European Blood and Marrow Transplant (EBMT) Group. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. *Blood*. 2008;112(9):3574-3581.
85. Kim HJ, Min WS, Kim YJ, Kim DW, Lee JW, Kim CC. Haplotype mismatched transplantation using high doses of peripheral blood CD34+ cells together with stratified conditioning regimens for high-risk adult acute myeloid leukemia patients: a pilot study in a single Korean institution. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(10):959-964.
86. Lacerda JF, Martins C, Carmo JA, Lourenço F, Juncal C, Rodrigues A, et al. Haploidentical stem cell transplantation with purified CD34 cells after a chemotherapy-alone conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9(10):633-642.
87. Shin SH, Kim JH, Jeon YW, Yoon JH, Yahng SA, Lee SE, et al. Feasible outcomes of T cell-replete haploidentical stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in patients with myelodysplastic syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(2):342-349.
88. Raj K, Pagliuca A, Bradstock K, Noriega V, Potter V, Streetly M, et al. Peripheral blood hematopoietic stem cells for transplantation of hematological diseases from related, haploidentical donors after reduced-intensity conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(6):890-895.
89. Shabbir-Moosajee M, Lombardi L, Ciurea SO. An overview of conditioning regimens for haploidentical stem cell transplantation with post-transplantation cyclophosphamide. *Am J Hematol*. 2015;90(6):541-548.
90. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschornor WE, Bias WB, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med*. 1983;309(22):1347-1353.
91. Tutschka PJ, Copelan EA, Klein JP. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood*. 1987;70(5):1382-1388.
92. Alegre A, Lamana M, Arranz R, Fernández-Villalta MJ, Tomás JF, Figueroa A, et al. Busulfan and melphalan as conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1995;91(2):380-386.
93. Vey N, De Prijck B, Faucher C, Stoppa AM, Sainy D, Lafage M, et al. A pilot study of busulfan and melphalan as preparatory regimen prior to allogeneic bone marrow transplantation in refractory or relapsed hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18(3):495-499.
94. Dimopoulos MA, Alexanian R, Przepiorka D, Hester J, Andersson B, Giralt S, et al. Thiotepa, busulfan, and cyclophosphamide: a new preparative regimen for autologous marrow or blood stem cell transplantation in high-risk multiple myeloma. *Blood*. 1993;82(8):2324-2328.
95. Przepiorka D1, Nath R, Ippoliti C, Mehra R, Hagemester F, Diener K, et al. A phase I-II study of high-dose thiotepa, busulfan and cyclophosphamide as a preparative regimen for autologous transplantation for malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1995;17(5-6):427-433.
96. Bredeson C, LeRademacher J, Kato K, Dipersio JF, Agura E, Devine SM, et al. Prospective cohort study comparing intravenous busulfan to total body irradiation in hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2013;122(24):3871-3878.
97. Gandhi V, Plunkett W. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(2):93-103.
98. Terenzi A, Aristei C, Aversa F, Perruccio K, Chionne F, Raymondi C et al. Efficacy of fludarabine as an immunosuppressor for bone marrow transplantation conditioning: preliminary results. *Transplant Proc* 1996;28(6):3101.
99. Bornhauser M, Storer B, Slattery JT, Appelbaum FR, Deeg HJ, Hansen J, et al. Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;102(3):820-826.
100. Irvani M, Evazi MR, Mousavi SA, Shamschiri AR, Tavakoli M, Ashouri A, et al. Fludarabine and busulfan as a myeloablative conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in high- and standard-risk leukemic patients. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(2):105-110.
101. Lee JH, Joo YD, Kim H, Ryou HM, Kim MK, Lee GW, et al. Randomized trial of myeloablative conditioning regimens: busulfan plus cyclophosphamide versus busulfan plus fludarabine. *J Clin Oncol*. 2013;31(6):701-709.
102. Devillier R, Fürst S, Crocchiolo R, El-Cheikh J, Castagna L, Harbi S, et al. A conditioning platform based on fludarabine, busulfan, and 2 days of rabbit antithymocyte globulin results in promising results in patients undergoing allogeneic transplantation from both matched and mismatched unrelated donor. *Am J Hematol*. 2014;89(1):83-87.
103. Przepiorka D, Madden T, Ippoliti C, Estrov Z, Dimopoulos M. Dosing of thiotepa for myeloablative therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995;37(1-2):155-160.
104. Aversa F, Pelicci PG, Terenzi A, Carotti A, Felicini R, Mencarelli A, et al. Results of T-depleted BMT in chronic myelogenous leukemia after a conditioning regimen that included thiotepa. *Bone Marrow Transplant*. 1991;7(2):24.
105. Bacigalupo A, Raiola AM, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, Bregante S, et al. Thiotepa-based reduced intensity conditioning regimen: a 10 year follow up. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(11):1091-1093.
106. Sjöo F, Hassan Z, Abedi-Valugerdi M, Griskevicius L, Nilsson C, Remberger M, et al. Myeloablative and immunosuppressive properties of treosulfan in mice. *Exp Hematol*. 2006;34(1):115-121.
107. Casper J, Freund M. Treosulfan based conditioning for autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2004;42(11):661-662.
108. Casper J, Knauf W, Kiefer T, Wolff D, Steiner B, Hammer U, et al. Treosulfan and fludarabine: a new toxicity-reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;103(2):725-731.
109. Strocchio L, Zecca M, Comoli P, Mina T, Giorgiani G, Giraldo E, et al. Treosulfan-based conditioning regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2015;169(5):726-736.
110. Baronciani D, Depau C, Targhetta C, Derudas D, Culurgioni F, Tandurella I, et al. Treosulfan-fludarabine-thiotepa conditioning before allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients with advanced lympho-proliferative disease. A single centre study. *Hematol Oncol*. 2016;34(1):17-21.
111. Yerushalmi R, Shem-Tov N, Danylesko I, Avigdor A, Nagler A, Shimoni A. Fludarabine and treosulfan compared with other reduced-intensity conditioning regimens for allogeneic stem cell transplantation in patients with lymphoid malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(12):1526-1535.
112. Gyurkocza B, Gutman J, Nemecek ER, Bar M, Milano F, Ramakrishnan A, et al. Treosulfan, fludarabine, and 2-Gy total body irradiation followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(4):549-555.
113. Casper J, Holowiecki J, Trensche R, Wandt H, Schaefer-Eckart K, Ruutu T, et al. Allogeneic hematopoietic SCT in patients with AML following treosulfan/fludarabine conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(9):1171-1177.
114. Sanz J, Boluda JC, Martín C, González M, Ferrá C, Serrano D, et al. Single-umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in patients with hematological malignancy using busulfan, thiotepa, fludarabine and ATG as myeloablative conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(10):1287-1293.
115. Arcese W, Picardi A, Santarone S, De Angelis G, Cerretti R, Cudillo L, et al.

- Haploidentical, G-CSF-primed, unmanipulated bone marrow transplantation for patients with high-risk hematological malignancies: an update. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(2):524-530.
116. Prezioso L, Bonomini S, Sammarelli G, Schifano C, Rossetti E, Monti A et al. Haploidentical stem cell transplantation after negative depletion of T cells expressing the chain of the T-cell receptor (TCR) for adults with hematological malignancies. EBMT Annual Meeting, 2013. *Blood.* 2013;122:4609 (abstract).
  117. Bryant A, Nivison-Smith I, Pillai ES, Kennedy G, Kalf A, Ritchie D, et al. Fludarabine/Melphalan reduced-intensity conditioning allotransplantation provides similar disease control in lymphoid and myeloid malignancies: analysis of 344 patients. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(1):17-23.
  118. Lee JH, Lee JH, Kim DY, Seol M, Lee YS, Kang YA, et al. A Phase II Trial of Fludarabine/Melphalan 100 conditioning therapy followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients with lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015;15(11):655-663.
  119. Abdal Wahid SF, Ismail NA, Mohd-Idris MR, Jamaluddin FW, Tumian N, Sze-Wei EY, et al. Comparison of reduced-intensity and myeloablative conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Stem Cells Dev.* 2014;23(21):2535-2552.
  120. Eder S, Labopin M, Arcese W, Or R, Majolino I, Bacigalupo A, et al. Thiotepa-based versus total body irradiation-based myeloablative conditioning prior to allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia in first complete remission: a retrospective analysis from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Eur J Haematol.* 2016;96(1):90-97.
  121. Kahl C, Storer BE, Sandmaier BM, Mielcarek M, Maris MB, Blume KG, et al. Relapse risk in patients with malignant diseases given allogeneic hematopoietic cell transplantation after non-myeloablative conditioning. *Blood.* 2007;110(7):2744-2748.
  122. Bethge WA, Haeghele M, Faul C, Lang P, Schumm M, Bornhauser M, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity. *Exp Hematol.* 2006;34(12):1746-1752.
  123. Airoldi I, Bertaina A, Prigione I, Zorzoli A, Pagliara D, Cocco C, et al.  $\delta$ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR- $\alpha\beta$ /CD19+ lymphocytes. *Blood.* 2015;125(15):2349-2358.
  124. Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of  $\alpha\beta$  T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood.* 2014;124(5):822-826.
  125. Bashey A, Solomon SR. T-cell replete haploidentical donor transplantation using post-transplant CY: an emerging standard-of-care option for patients who lack an HLA-identical sibling donor. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(8):999-1008.
  126. Sugita J, Kawashima N, Fujisaki T, Kakihana K, Ota S, Matsuo K, et al. HLA-Haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplantation with Post-Transplant Cyclophosphamide after Busulfan-Containing Reduced-Intensity Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(9):1646-1652.
  127. Raiola AM, Dominietto A, Ghiso A, Di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(1):117-122.
  128. Jurado M, Deeg HJ, Storer B, Anasetti C, Anderson JE, Bryant E, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for advanced myelodysplastic syndrome after conditioning with busulfan and fractionated total body irradiation is associated with low relapse rate but considerable nonrelapse mortality. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(3):161-169.
  129. Zecca M, Pession A, Messina C, Bonetti F, Favre C, Prete A, et al. Total Body Irradiation, Thiotepa, and Cyclophosphamide as a conditioning regimen for children with acute lymphoblastic leukemia in first or second remission undergoing bone marrow transplantation with HLA-identical siblings. *J Clin Oncol.* 1999;17(6):1838-46.
  130. Jillella AP, Doria R, Khan K, Zelterman D, Ahmad YH, Smith BR, et al. Cyclophosphamide, cytosine arabinoside and TBI as a conditioning regimen for allogeneic bone marrow transplantation in patients with leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23(11):1095-1100.
  131. Gyurkocza B, Storb R, Storer BE, Chauncey TR, Lange T, Shizuru JA, et al. Non-myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Patients With Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28:2859-2867.
  132. Papham P, Hahn T, Dubel K, Lipka P, McCarthy PL. Fludarabine and cyclophosphamide provides a nonmyeloablative alternative conditioning regimen with low transplant-related mortality and control of high risk disease. *Leuk Res Rep* 2014;3(1):28-31.
  133. Christopoulos P, Schmoor C, Waterhouse M, Mark R, Wäsch R, Bertz H, et al. Reduced-intensity conditioning with fludarabine and thiotepa for second allogeneic transplantation of relapsed patients with AML. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(7):901-907.
  134. Taussig DC, Davies AJ, Cavenagh JD, Oakervee H, Syndercombe-Court D, Kelsey S, et al. Durable Remissions of Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia After Reduced-Intensity Allografting. *J Clin Oncol.* 2003;21(16):3060-5.
  135. Tauro S, Craddock C, Peggs K, Begum G, Mahendra P, Cook G et al. Allogeneic stem-cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen has the capacity to produce durable remissions and long-term disease-free survival in patients with high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *J Clin Oncol.* 2005;23(36):9387-9393.
  136. Saure C, Schroeder T, Zohren F, Groten A, Bruns I, Czibere A, et al. Upfront allogeneic blood stem cell transplantation for patients with high-risk myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukemia using a FLAMSA-based high-dose sequential conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(3):466-472.
  137. Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, Dejbakhsh-Jones S, Grumet FC, Shizuru JA, et al. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 2005;353(13):1321-1331.
  138. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(8):777-783.
  139. Mehta J, Singhal S, Gee AP, Chiang KY, Godder K, Rhee Fv Fv, et al. Bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched family donors for acute leukemia: single-center experience of 201 patients. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(4):389-396.
  140. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood.* 2011;117(14):3921-3928.
  141. Huang X, Liu D, Liu K, Xu L, Chen H, Han W et al. Treatment of acute leukemia with unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(2):257-265.
  142. Rizzieri DA, Koh LP, Long GD, Gasparetto C, Sullivan KM, Horwitz M, et al. Partially matched, non myeloablative allogeneic transplantation: clinical outcomes and immune reconstitution. *J Clin Oncol.* 2007;25(6):690-697.
  143. Kanda Y, Oschima K, Asano-Mori Y, Kandabashi K, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto et al. In vivo alemtuzumab enables haploidentical human leukocyte antigen-mismatched hematopoietic stem cell transplantation without ex-vivo manipulation. *Transplantation.* 2005;79(10):1351-1357.
  144. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematological malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(6):641-650.
  145. Ogawa H, Ikegami K, Yoshihara S, Kawakami M, Fujioka T, Masuda T et al. Unmanipulated HLA 2-3 antigen mismatched (haploidentical) stem cell transplantation using nonmyeloablative conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2006;12(10):1073-1084.
  146. Handgretinger R, Chen X, Pfeiffer M, Mueller I, Feuchtinger T, Hale GA et al. Feasibility and outcome of reduced intensity conditioning in haploidentical transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1106:279-289.



*Midollo emopoietico di LMC al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).*

---

#### **Parole Chiave**

Allotrapianto, mieloablazione, immunosoppressione, attecchimento, tossicità

#### **Indirizzi per la corrispondenza**

*Franco Aversa*  
Università di Parma  
UOC di Ematologia e Centro Trapianti Midollo Osseo  
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma  
Viale A. Gramsci 14, 43100 Parma  
Tel: Direzione (+39) 0521033263, Segreteria (+39) 0521033265  
E-mail: franco.aversa@unipr.it  
direzione.ematologia@unipr.it

# Profilassi e terapia della GvHD acuta

Andrea Bacigalupo, Federica Sorà

Istituto di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo, Policlinico Universitario Gemelli, Università Cattolica, Roma



## Introduzione

La malattia del trapianto verso l'ospite (*Acute graft versus host disease*, aGvHD) è una malattia immunologica complessa che si manifesta in pazienti che ricevono un trapianto allogenico di cellule staminali (HSCT). Per il manifestarsi della aGvHD è necessaria la presenza di 3 condizioni concomitanti:

- le cellule ricevute dal donatore devono essere immunocompetenti;
- il ricevente deve esprimere degli antigeni tissutali che non siano presenti nel donatore;
- il ricevente non deve essere in grado di mettere in atto una risposta immunologica in grado di distruggere le cellule trapiantate<sup>(1,2)</sup>;

La aGvHD sembrerebbe svilupparsi in 3 tappe distinte<sup>(1)</sup>:

- il danno tissutale nell'ospite dovuto al trattamento chemio e/o radioterapico con conseguente rilascio di citochine proinfiammatorie quali il TNF e l'IFN $\gamma$ <sup>(2)</sup>;
- la fase di attivazione durante la quale le cellule T alloreattive del donatore vengono attivate dagli antigeni dell'ospite, presentati dalle cellule presentanti l'antigene (APC);
- la fase con proliferazione cellulare, secrezione di citochine, formazione di cellule T citotossiche (CTL) e danno tissutale. Questa serie di eventi è chiamata il modello Ferrara<sup>(2)</sup>, che ha messo in luce la complessità di tale malattia e quindi la grave difficoltà di approntare un trattamento efficace.

## Classificazione

La prima vera classificazione della aGvHD venne proposta da Glucksberg et al nel 1974<sup>(3)</sup> e indentificava 5 categorie (*grades* 0, I, II, III, IV), sulla base delle manifestazioni (*stages*) a carico della cute, del fegato e dell'intestino (eritema cutaneo, valori della bilirubina nel siero e volume della diarrea) associate alla valutazione dello stato clinico del paziente; la somma degli *staging* dei singoli organi da un grado da 0 a IV. I criteri elaborati da Glucksberg sono stati ampiamente utilizzati per circa trenta anni dimostrando anche una buona correlazione con la mortalità legata al trapianto (TRM). In una analisi comprendente 4.174 trapianti allogenici da fratello HLA iden-

tico in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (LMC) in prima fase cronica si era infatti osservato che la sopravvivenza a breve e lungo termine era profondamente influenzata dalla severità della aGvHD, secondo i criteri proposti da Glucksberg<sup>(4)</sup>.

In seguito l'*International Bone Marrow Transplant Registry* (IBMTR) ha disegnato un nuovo sistema di stadiazione, sulla base di valutazioni eseguite su un grande numero di pazienti sottoposti a trapianto di midollo da donatore HLA identico<sup>(5)</sup>, conosciuto come indice di severità dell'IBMTR. I pazienti vengono classificati in cinque categorie (0, A, B, C, D) sulla base delle differenze per quanto riguarda la TRM con un livello di significatività dello 0,05. L'indice dell'IBMTR mostra una buona correlazione con i differenti esiti, tuttavia i classici criteri sono ancora utilizzati in molti Centri. Recentemente abbiamo dimostrato che i pazienti con aGvHD di grado II possono essere ulteriormente stratificati sulla base della loro conta piastrinica al giorno +50, in grado II-a ( $Plt > 50 \times 10^9/l$ ) e II-b ( $Plt \leq 50 \times 10^9/l$ ), con una TRM significativamente più elevata nei pazienti del gruppo IIb<sup>(6)</sup>. Quindi, nonostante le diverse limitazioni esistenti e i problemi di diagnosi differenziale, la aGvHD può essere classificata in vari gradi di severità che correlano con la TRM.

## Trattamento di prima linea

Nonostante la scoperta di molti nuovi farmaci immunosoppressori e di molti anticorpi monoclonali il trattamento cardine della aGvHD rimane ancora quello basato sui corticosteroidi. Un ampio studio sulla terapia di prima linea condotto su 443 pazienti ai quali era stato somministrato prednisone 60 mg/m<sup>2</sup> per 14 giorni seguito da una riduzione di dose nelle 8 settimane successive aveva mostrato un complessivo miglioramento nel 55% dei pazienti e una completa e duratura ( $\geq 28$  giorni) risposta nel 35%<sup>(7)</sup>. La sopravvivenza a 1 anno dall'inizio era del 53%: i fattori che predisponavano ad una sopravvivenza migliore erano la giovane età, l'aver un fratello HLA identico come donatore e aver ricevuto una profilassi per la aGvHD differente dalla deplezione *ex vivo* delle cellule T<sup>(7)</sup>. Lo studio suggerisce che il trattamento con gli steroidi sia un efficace, ma non

ottimale trattamento per la aGvHD specialmente nei pazienti con aGvHD di grado severo, e ribadisce la necessità di uno schema più efficace di profilassi nei trapianti da donatore non familiare o non HLA-identico<sup>(7)</sup>. Purtroppo non ci sono evidenze che uno schema di terapia di prima linea più aggressivo sia più vantaggioso: il Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO) ha infatti dimostrato che il trattamento in prima linea con 2mg/kg/die o 10 mg/kg/die di metilprednisolone ha ottenuto risultati equivalenti in termini di percentuali di risposta, mortalità correlate al trapianto e sopravvivenza<sup>(8)</sup>.

Uno studio randomizzato che paragonava il trattamento con ATG+steroidi verso solo steroidi è giunto alla stessa conclusione<sup>(9)</sup>. Un recente studio del CIBMTR ha confrontato gli steroidi con 4 diversi agenti: micofenolato (MMF), etanercept, denileukin, e pentostatina<sup>(10)</sup>. La combinazione migliore in termini di risposta, sopravvivenza e bassa incidenza di complicanze infettive si è dimostrata steroidi +micofenolato<sup>(10)</sup>. Lo studio successivo ha quindi confrontato steroidi+ micofenolato (n=116) verso solo steroidi (n=119)<sup>(11)</sup>: la percentuale di successo (vivi al giorno +56 dall'inizio della terapia, senza GvHD acuta o cronica) era del 57% nel gruppo MMF vs 50% nel gruppo placebo; la sopravvivenza ad un anno è stata del 57% per MMF e del 64% per solo steroidi. La conclusione di questo importante studio randomizzato è la seguente: l'aggiunta di MMF non migliora la sopravvivenza libera da GvHD rispetto a soli steroidi<sup>(11)</sup>. Quindi, il trattamento di prima linea della GvHD resta Mpred 2 mg/kg/die per 5 giorni: se il paziente risponde si può ridurre la dose. Un sondaggio dell'IBMTR conferma che un trattamento di 5 giorni è sufficiente per identificare una aGvHD refrattaria<sup>(12)</sup>. I pazienti non responsivi sono eleggibili ad un trattamento di seconda linea.

## Trattamento di seconda linea

Le timoglobuline (ATG) sono una delle opzioni terapeutiche per i pazienti con refrattarietà al trattamento con steroidi e ci sono risultati incoraggianti provenienti da studi di fase II<sup>(13,14)</sup>. Tuttavia, in un recente studio prospettico randomizzato il GITMO non è riuscito a confermare l'efficacia della terapia con ATG come seconda linea nei pazienti con aGvHD refrattaria agli steroidi<sup>(15)</sup>: a un mese dalla randomizzazione il 26 % dei pazienti mostrava una risposta completa, il 25% una risposta parziale, il 33% una GvHD stabile, il 10% un peggioramento e l'8% era deceduto. Non vi era nessuna differenza significativa in termini di risposta, TRM e sopravvivenza tra il gruppo che aveva ricevuto ATG+steroidi, rispetto al gruppo che aveva ricevuto solo steroidi<sup>(15)</sup>. La curva attuariale a cinque anni mostrava un 36% e un 34% di sopravvivenza rispettivamente per i controlli e per i pazienti trattati con ATG.

Sebbene dunque l'ATG possa indurre una risposta significativa nei pazienti con aGvHD la sopravvivenza non si modifica se paragonata a quella dei pazienti che non ricevono ATG, e questo è dovuto al

fatto che la risposta clinica della aGvHD non implica un aumento della sopravvivenza e che anche i responsivi possono morire di infezioni o di altre complicanze, come suggerito da una esauriente revisione della letteratura<sup>(16)</sup>.

Altri anticorpi monoclonali contro il recettore dell'interleuchina 2 come denileukin difitox (ontac), inolinomab (leukotac), basiliximab (simulect), daclizumab (zenapax), hanno mostrato una certa efficacia nel trattamento della aGvHD resistente allo steroide<sup>(16)</sup>, sebbene non abbiano ridotto la TRM. Tutto questo è dovuto al fatto che le infezioni rimangono un serio problema anche quando gli anticorpi vengono usati come prima scelta. Risultati simili sono stati ottenuti con anticorpi monoclonali anti-CD-147<sup>(17)</sup>.

Infine dobbiamo considerare il TNE, una importante citochina infiammatoria implicata nella aGvHD, i cui livelli possono essere ridotti dagli steroidi, la pentossifillina, il *transforming growth factor beta* (TGFB) e la IL4. Anticorpi contro il TNF (infliximab) o contro il suo recettore (etanercept) sono stati sviluppati e utilizzati nel trattamento della aGvHD sia in prima che in seconda linea<sup>(18)</sup>. Uno studio recente condotto dal gruppo di Ferrara<sup>(18)</sup> ha ottenuto risultati promettenti nell'utilizzo di etanercept in prima linea insieme agli steroidi: va però detto che etanercept, nello studio prospettico randomizzato in prima linea<sup>(10)</sup>, è risultato inferiore a MMF e questo a sua volta non è risultato superiore a solo steroidi. Non a caso le linee guida dell'EBMT<sup>(19)</sup> per la terapia di seconda linea della aGvHD steroide-refrattaria, riportano: è possibile aggiungere altri agenti agli steroidi come seconda linea, ma non c'è nessuna evidenza che questo porti ad un vantaggio.

Alcuni articoli recentemente riportano i risultati dell'uso della fotoferesi (ECP) per il trattamento della aGvHD: tale procedura è invasiva, richiede una squadra di specialisti dedicata e le risposte si possono registrare non prima di 12 settimane, richiedendo quindi una lunga terapia di supporto<sup>(20)</sup>. Tuttavia, visti gli scarsi risultati che otteniamo attualmente con la terapia di seconda linea, aspettare 12 settimane per ottenere una risposta non sembra il problema maggiore. Greinix et al.<sup>(21)</sup> riportano una percentuale di risposta completa nell'82% dei pazienti con aGvHD severa trattata con ECP e steroidi. È stato attivato anche uno studio randomizzato che confronti prednisone+ ECP vs prednisone da solo.

## Cellule staminali mesenchimali

Fino a qualche anno fa c'è stato un grande interesse nell'uso delle MSC per il trattamento della aGvHD: uno studio del gruppo cooperativo delle EBMT ha pubblicato i risultati in 50 pazienti affetti da aGvHD steroide-resistente<sup>(22)</sup>. Il tasso di risposta globale era il 54% e la sopravvivenza il 38%. Comunque 2 grandi studi randomizzati che hanno paragonato cellule staminali mesenchimali (MSC) +steroidi vs steroidi da soli in prima e seconda linea hanno fallito nel raggiungimento dell'obiettivo primario cioè l'aumento della sopravvivenza<sup>(23)</sup>.

Lo sponsor dei *trial* annunciava in data 8 settembre 2008 che il trattamento della aGvHD con MSC non era più efficace del placebo con gravi conseguenze sulla ricerca associata.

## Prevenzione

Visti i risultati così scadenti della terapia di prima linea, e soprattutto di seconda linea della aGvHD, per non parlare dell'insuccesso terapeutico per la forma cronica, viene spontaneo domandarsi se non possiamo fare di più nella prevenzione. Due studi randomizzati usciti da pochi mesi confermano che l'utilizzo di ATG nel condizionamento è in grado di ridurre la aGvHD e in modo molto significativo la GvHD cronica<sup>(24,25)</sup>, senza compromettere l'efficacia antileucemica, e quindi lasciando la sopravvivenza inalterata. Uno studio è stato condotto in trapianti da fratello HLA identico, utilizzando un condizionamento mieloablativo e cellule da sangue periferico (PB) come sorgente<sup>(24)</sup>, mentre il secondo è stato condotto in trapianti da donatore non consanguineo utilizzando sia PB che midollo come sorgente<sup>(25)</sup>. Quindi con sorgenti diverse, con donatori diversi, ATG è in grado di prevenire la aGvHD, e dovrebbe essere utilizzato in tutti i trapianti allogenici. Ultima novità nel campo della profilassi è l'utilizzo di ciclofosfamide post-trapianto ad alte dosi, in grado di prevenire in modo assai convincente sia la aGvHD che quella cronica, in trapianti da

donatore familiare aploidentico<sup>(26)</sup>, ma è in fase di valutazione anche per trapianti da donatore non consanguineo e HLA identico.

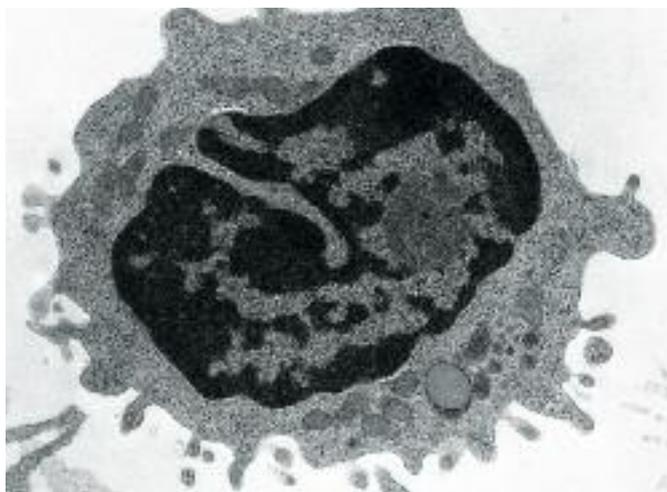
## Conclusioni

Il trattamento di prima linea della aGvHD con metilprednisolone 2 mg/kg/die, è efficace in circa il 50% dei pazienti, ma produce una risposta duratura solo in 1/3 dei pazienti. La aGvHD refrattaria agli steroidi o la aGvHD steroide-dipendente<sup>(27)</sup>, viene trattata con una seconda linea terapeutica basata sull'associazione di più agenti immunosoppressivi: tale strategia terapeutica risulta tuttavia molto insoddisfacente poiché produce una sopravvivenza ad un anno di circa il 30% nella maggior parte degli studi. È necessario dunque esplorare nuove strategie tra le quali l'infusione di MSC espanse e nuovi farmaci: uno di questi è attualmente in fase di sperimentazione, ovvero un anticorpo anti-CD26, che ha come *target* la modulazione del traffico linfocitario ai tessuti bersaglio, e non la lisi dei linfociti stessi. Vedremo se in uno studio prospettico multinazionale, placebo controllato, l'anticorpo anti-CD26 risulterà vantaggioso in termini di risposta e mortalità da trapianto, rispetto al controllo. Infine non dimentichiamo la prevenzione, come dimostrato dai due recenti studi randomizzati, uno dei quali fortemente voluto dall'attuale presidente del GITMO.

## Bibliografia

1. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 1966;67:62-21-78.
2. Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft-versus-host Disease. *N Engl J Med* 1991;324(10):667-674.
3. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18(4):295-304.
4. Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Biezen Av A, Bandini G, Devergie A, et al. Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2002;100(12):3877-86.
5. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol.* 1997;97(4):855-64.
6. Dominietto A, Raiola AM, van Lint MT, Lamparelli T, Gualandi F, Berisso G, et al. Factors influencing haematological recovery after allogeneic haemopoietic stem cell transplants: graft-versus-host disease, donor type, cytomegalovirus infections and cell dose. *Br J Haematol.* 2001;112(1):219-27.
7. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, Detor TE, Bruns LJ, Ramsay NK, et al. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute GvHD: comparison of grading systems. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2002;8(7):387-394.
8. Van Lint MT, Uderzo C, Locasciulli A, Majolino I, Scimé R, Locatelli F, et al. Early treatment of acute graft-versus-host disease with high- or low-dose 6-methylprednisolone: a multicenter randomized trial from the Italian Group for Bone Marrow Transplant. *Blood.* 1998;92(7):2288-93.
9. Cragg L, Blazar BR, Defor T, Kolatker N, Miller W, Kersey J, et al. A randomized trial comparing prednisone with antithymocyte globulin/prednisone as an initial systemic therapy for moderately severe acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6(4A): 441-447.
10. Alousi AM, Weisdorf DJ, Logan BR, Bolaños-Meade J, Carter S, Difronzo N, et al. Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Blood.* 2009;114(3):511-7.
11. Bolaños-Meade J, Logan BR, Alousi AM, Antin JH, Barowski K, Carter SL, et al. Phase 3 clinical trial of steroids/mycophenolate mofetil vs steroids/placebo as therapy for acute GVHD: BMT CTN 0802. *Blood.* 2014;124(22):3221-7.
12. Hsu B, May R, Carrum G, Krance R, Przepiorka D. The criteria for steroid-refractory acute graft-versus host disease: an international practice survey. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(10):945-50.
13. Roy J, McGlave PB, Filipovich AH, Miller WJ, Blazar BR, Ramsay NK, et al. Acute graft versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation: failure of conventional therapy. *Bone Marrow Transplant* 1992;10(1):77-82.
14. Aschan J: Treatment of moderate to severe acute GvHD: a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(4):601-607.
15. Van Lint MT, Milone G, Leotta S, Uderzo C, Scime R, Dallorso S, et al. Treatment of acute graft-versus-host disease with prednisolone: significant survival advantage for day +5 responders and no advantage for non responders receiving anti-thymocyte globulin. *Blood.* 2006;107(10):4177-81.
16. Antin JH, Chen AR, Couriel DR, Ho VT, Nash RA, Weisdorf D. Novel approaches to the therapy of steroid resistant acute graft versus host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10(10):655-668.
17. Deeg HJ, Blazar BR, Bolwell BJ, Long GD, Schuening F, Cunningham J, et al. Treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease with anti-CD147 monoclonal antibody ABX-CBL. *Blood* 2001;98(7):2052-2058.
18. Levine JE, Paczesny S, Mineishi S, Braun T, Choi SW, Hutchinson RJ, et al. Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2008;111(4):2470-5.
19. Ruutu T, Gratwohl A, de Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, et al.

- Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(2):168-73.
20. Garban F, Drillat P, Makowski C, Jacob MC, Richard MJ, Favrot M, et al. Extracorporeal chemophototherapy for the treatment of graft-versus-host disease: hematologic consequences of short-term, intensive courses. *Haematologica*. 2005;90(8):1096-101.
  21. Greinix HT, Knobler RM, Worel N, Schneider B, Schneeberger A, Hoecker P, et al. The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2006;91(3):405-8.
  22. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-86.
  23. Nature News : 9 September 2009 | Nature | doi:10.1038/news.2009.894
  24. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, et al. ATG-Fresenius Trial Group. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(9):855-64.
  25. Kröger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, et al. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2016;374(1):43-53.
  26. Luznik L, O'Donnel PV, Simons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-Haploidentical bone marrow transplantation for hematological malignancies using nonmyeloablative conditioning regimen and high dose, posttransplantation cyclo-phosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):641-50.
  27. Anasetti C. Glucocorticoid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplant* 2010;16(11):1504-1518.



*Sangue periferico di LLC-T: cellula linfoide al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).*



*Sangue periferico di LLC-T: rosetta spontanea eritrocitaria (da G.Lambertenghi Delilieri: N.Engl. J. Med. 1994; 330:323)*

## Parole Chiave

aGvHD, trapianto allogenico, classificazione

## Indirizzi per la corrispondenza

*Andrea Bacigalupo*

Istituto di Ematologia e Unità Trapianto di Midollo Osseo,  
Fondazione Policlinico Universitario Gemelli,  
Università Cattolica del Sacro Cuore  
Largo Agostino Gemelli - 00168 Roma  
Tel: (+39) 06 30154180  
E-mail: andrea.bacigalupo@unicatt.it

# Profilassi e terapia della recidiva post-trapianto



Federico Lussana, Orietta Spinelli, Paola Stefanoni, Manuela Tosi, Roberta Cavagna, Maria Guinea Montalvo, Alessandro Rambaldi

Hematology and Bone Marrow Transplant Unit, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

## Introduzione

La recidiva di malattia dopo trapianto allogenico è un problema clinico molto rilevante se consideriamo che può interessare dal 25 al 50% dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. La frequenza di recidiva può arrivare al 30% nelle leucemie mieloidi acute (LMA) e al 40% nelle leucemie linfoblastiche acute (LLA). Nel mieloma multiplo (MM), nella malattia di Hodgkin e nel linfoma non Hodgkin diffuso a grandi cellule (LNH DLBCL) tale probabilità è anche superiore, dovuta allo stadio avanzato di malattia a cui generalmente questi pazienti arrivano prima di essere candidati al trapianto allogenico. La probabilità di recidiva post-trapianto può variare notevolmente secondo diversi fattori di rischio, quali l'età del paziente, il tipo di malattia, lo stadio clinico al trapianto, il tipo di donatore, la sorgente di cellule staminali e l'intensità del regime di condizionamento. Se da una parte lo sviluppo di regimi di condizionamento ad intensità ridotta, riducendo la mortalità da trattamento <sup>(1)</sup>, ha notevolmente ampliato la possibilità di offrire un trapianto allogenico anche a pazienti di età fino a 70 anni, dall'altra questi condizionamenti si caratterizzano per una minor attività antineoplastica. La ridotta attività antineoplastica di un condizionamento ad intensità ridotta può essere ulteriormente aggravata dall'impiego di strategie anti-rigetto, quali la deplezione *in vivo* di linfociti T, basata sull'uso di anticorpi policlonali o monoclonali, che possono eliminare l'importante effetto antineoplastico dei linfociti T del donatore. Per esempio, nei pazienti affetti da LMA e sindromi mielodisplastiche (SMD), la recidiva occorre più frequentemente tra coloro che hanno ricevuto trapianti impoveriti di cellule T raggiungendo una frequenza circa del 30 -50% <sup>(2)</sup>. La tabella 1 riassume i principali fattori di rischio noti per la recidiva post-trapianto. Complessivamente, a fronte di una significativa riduzione della mortalità trapiantologica, non è corrisposta una similare significativa riduzione del rischio di recidiva della malattia, che rimane la causa più comune di fallimento del trapianto.

Da un punto di vista fisiopatologico, la recidiva di malattia dopo trapianto allogenico dipende dal mancato controllo immunologico

sulla malattia residua *Graft versus Leukemia* (GvL), da parte del sistema immunitario del donatore. Ne consegue che l'applicazione di strategie di intervento con farmaci e cellule quando la malattia persiste dopo il trapianto in quantità minima rappresenta il mezzo potenzialmente più efficace e utile di prevenzione di una franca e poco controllabile recidiva ematologica di malattia. In quest'ottica, le nuove tecnologie, basate sulla citometria a flusso, o sulla genetica molecolare, possono rivelarsi di grande aiuto consentendo di identificare precocemente la presenza di malattia minima e permettono una più accurata previsione dell'imminente recidiva nonché una migliore impostazione di una strategia terapeutica. Al miglioramento delle tecniche diagnostiche oggi si aggiunge anche la disponibilità di terapie innovative, tumore-specifiche, che hanno la potenzialità di eliminare la malattia minima residua e quindi di ridurre il rischio di recidiva post-trapianto. Per questi motivi, riconoscendo la recidiva come uno dei grandi problemi irrisolti del trapianto, nel 2009 il *National Cancer Institute* ha lanciato uno sforzo scientifico internazionale per studiare la biologia, la prevenzione e il trattamento delle recidive dopo alloHSCT <sup>(3)</sup>.

In quest'articolo passeremo brevemente in rassegna gli approcci più recenti, basati su farmaci e terapie cellulari, per prevenire la recidiva della malattia dopo trapianto allogenico (Tabella 2).

Pre-trapianto	Peri-trapianto	Post-trapianto
Tipo di malattia	Deplezione T linfocitaria	Tipo di profilassi per GvHD
Stadio di malattia	Intensità del regime di condizionamento	Assenza di GvHD
Caratteristiche genetiche e molecolari della malattia	Sorgente di CSE e grado di compatibilità	

Tabella 1 – Fattori di rischio per la recidiva di malattia prima e dopo trapianto allogenico.

## Profilassi con DLI

L'uso profilattico di infusioni di linfociti del donatore (DLI) per prevenire la recidiva post-trapianto è stato impiegato nei pazienti con linfoma non Hodgkin (LNH) a basso grado, soprattutto nel contesto di trapianti a intensità ridotta di condizionamento. In 82 pazienti consecutivi, affetti da LNH follicolare, sottoposti a trapianto allogenico da donatori familiari o non familiari, HLA identici o non completamente identici, condizionati con fludarabina, melphalan e alemtuzumab, una terapia profilattica con DLI veniva utilizzata per

correggere un chimerismo misto dopo i primi 6 mesi dal trapianto. Quest'approccio è risultato tollerato con una modesta incidenza di *graft versus host disease* (GvHD) e *non relapse mortality* (NRM) <sup>(4)</sup>. Nei pazienti affetti da LMA refrattaria o recidivata risultati promettenti sono stati riportati utilizzando una strategia di trattamento sequenziale. Dopo una chemioterapia che induceva aplasia composta da fludarabina, citarabina, e amsacrina (FLAMSA) e tre giorni di riposo veniva eseguito un trapianto a intensità ridotta di condizionamento con 4 Gy d'irradiazione *total-body* (TBI), globulina antilinfocitaria (Grafalon, Neovi) e ciclofosfamide (dosaggio da 80

	Patologia	Meccanismo di azione	Fase di sviluppo	Principali limiti
<i>Terapia cellulare</i>				
<b>DLI non manipolate</b>	LMA/LNH	Effetto GvL	Pratica clinica	GvHD
<b>Cellule NK</b>	LMA	Effetto GvL	In corso	GvHD?
<i>Combinazione di terapia cellulare e nuovi farmaci</i>				
<b>DLI e TKIs</b>	LMC/LLA Ph+	Sinergia nell'attività anti-tumorale	Pratica clinica	GvHD
<b>DLI e 5-Aza</b>	SMD	Aumenta attività GvL; riduce il rischio di GvHD; effetto citotossico diretto	In corso	GvHD?
<i>Nuovi farmaci</i>				
<b>TKIs</b>	LMC/LLA Ph+	Attività anti-tumorale	Pratica clinica	Cute, cardiovascolare, versamento pleurico
<b>Lenalidomide</b>	SMD/MM	Immunomodulazione e attività antitumorale	Fase II	GvHD
<b>Bortezomib</b>	MM	Attività anti-mieloma	Fase II	Neuropatia periferica
<b>5-Aza</b>	SMD	Effetto citotossico e induzione di tolleranza immunologica	Fase II	Nessuna
<b>Blinatumomab</b>	LLA dei precursori B	Immunoterapia antiCD19+	Da valutare	Tossicità neurologica

Tabella 2 – Strategie di prevenzione della recidiva dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche.

a 120 mg/kg). Dopo il trapianto, in assenza di manifestazioni significative di GvHD, veniva iniziata precocemente una profilassi con DLI (al giorno +120 dal trapianto, oppure 30 giorni dopo l'interruzione della terapia immunosoppressiva). La dose di linfociti variava da 1 a  $5 \times 10^6$  cellule CD3+ /kg di peso corporeo del ricevente e poteva essere ripetuta fino a tre volte ad intervalli di 4-6 settimane. Con questo programma di trattamento, in una coorte di pazienti affetti da LMA ad alto rischio, gli autori hanno riportato una sopravvivenza globale e libera da malattia a 2 anni del 42% e del 40%, rispettivamente <sup>(5)</sup>. Un successivo studio di fase II in pazienti con LMA ad alto rischio citogenetico o con malattia refrattaria ha confermato i risultati interessanti sopra riportati, documentando una sopravvivenza a 4 anni dal trapianto allogenico del 61%<sup>(6)</sup>. Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando il busulfano al posto della TBI in trapianti a intensità ridotta di condizionamento sempre dopo FLAMSA <sup>(7)</sup>. Ad oggi è difficile ipotizzare se questi risultati incoraggianti in pazienti ad alto rischio di recidiva dopo il trapianto possano essere spiegati principalmente dal corso intensivo di chemioterapia con l'obiettivo di ridurre la quantità di malattia prima del trapianto, o piuttosto dal rafforzamento dell'effetto immunologico del trapianto contro la leucemia (GvL) indotto dall'utilizzo precoce della terapia adottiva con linfociti. A tale riguardo, saranno necessari suc-

cessivi studi per meglio definire l'equilibrio ottimale tra i meccanismi di attività antileucemica e di riduzione degli effetti tossici dannosi della chemioterapia e dei linfociti stessi. In ambito pediatrico è stata realizzata un'esperienza simile sempre nelle LMA, confermando che l'immunoterapia preventiva può migliorare il risultato anche in pazienti ad alto rischio di recidiva post-trapianto. Rettinger et al. <sup>(8)</sup> hanno mostrato che il trattamento con DLI di pazienti con chimerismo misto dopo il trapianto era in grado di ripristinare un chimerismo del donatore in circa il 50% dei pazienti senza tossicità e che questi pazienti rimanevano in remissione a lungo termine, a differenza dei pazienti che non raggiungevano un chimerismo completo, che inesorabilmente recidivavano <sup>(8)</sup>.

### Profilassi con DLI con o senza inibitori delle tirosin-chinasi

Con l'introduzione degli inibitori delle tirosin-chinasi (TKIs), lo scenario terapeutico della leucemia mieloide cronica (LMC) è cambiato radicalmente <sup>(9-11)</sup> e il trapianto allogenico di midollo non rappresenta più la prima scelta terapeutica come, invece, lo era negli anni 90. Nonostante il notevole progresso terapeutico ottenuto con l'impiego dei TKIs, il trapianto allogenico resta una soluzione di trattamento potenzialmente curativo e deve essere considerato e

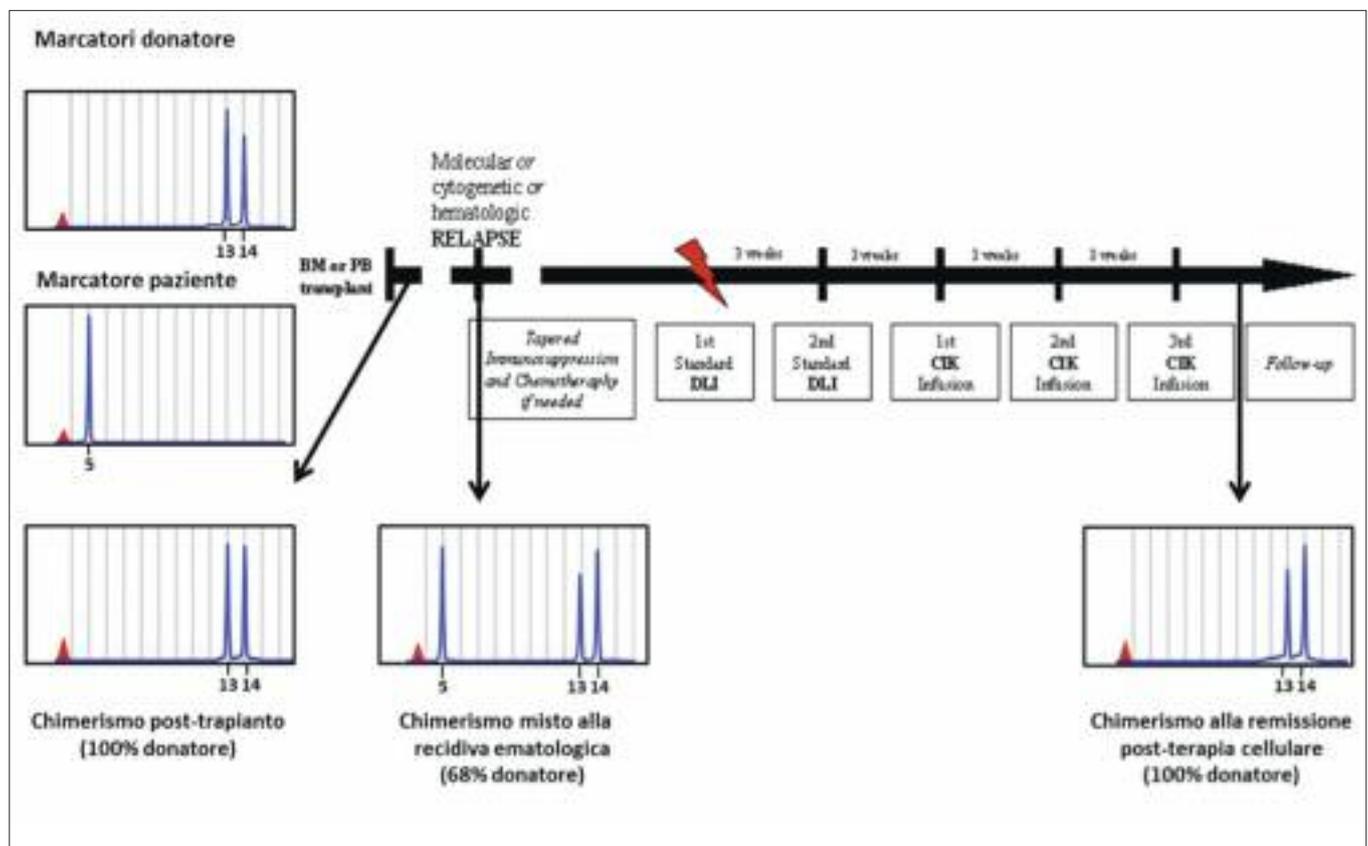


Figura 1 – Schema di trattamento protocollo CIK e analisi del chimerismo emopoietico post-trapianto. L'analisi molecolare del chimerismo emopoietico dopo trattamento con cellule CIK (pannello in basso a destra) evidenzia la presenza di emopoiesi di derivazione del donatore e scomparsa dell'emopoiesi del paziente.

consigliato in specifiche circostanze. I pazienti affetti da LMC candidati a trapianto allogenico sono quelli con una documentata resistenza ai TKIs di prima e seconda generazione, o che si trovano in una fase più avanzata di malattia, o in entrambe le condizioni. L'impiego delle DLI dopo trapianto allogenico per ripristinare una remissione ematologica e molecolare è ben noto nei pazienti affetti da LMC recidivanti<sup>(12)</sup>. Recentemente, è stato osservato che l'impiego post-trapianto di TKI in combinazione con DLI induce una remissione rapida e durevole anche nei pazienti con LMC in fase avanzata recidivati dopo allotrapianto<sup>(13)</sup>. Inoltre, è stato valutato se l'utilizzo di imatinib, come singola terapia, fosse in grado di ritardare la recidiva e la necessità di utilizzare le DLI in pazienti con LMC sottoposti ad allotrapianto dopo un regime di condizionamento a ridotta intensità. L'imatinib veniva cominciato a partire dal giorno + 35 e continuato fino ad 1 anno dal trapianto. La terapia con imatinib post-trapianto risultava ben tollerata e annullava il rischio di recidiva durante il periodo di trattamento. Nei pazienti che recidivavano dopo la sospensione del farmaco, le DLI rimanevano una terapia molto efficace nell'indurre una nuova remissione molecolare<sup>(14)</sup>.

La probabilità di recidiva post-trapianto è particolarmente elevata nei pazienti sottoposti a trapianto per leucemia linfoblastica acuta Philadelphia positiva (LLA Ph+). In uno studio multicentrico randomizzato, è stata valutata efficacia e tollerabilità della somministrazione di imatinib post-trapianto in profilassi primaria o in base ai valori di malattia minima residua (MRD). In questo studio l'utilizzo di imatinib in profilassi primaria riduceva significativamente l'incidenza di recidiva post-trapianto rispetto al braccio trattato secondo i valori di MRD, anche se la sopravvivenza globale risultava elevata in entrambi i bracci di trattamento (80% *vs* 75%)<sup>(15)</sup>. Più recentemente, Shimoni et al.<sup>(16)</sup> hanno valutato l'utilizzo di nilotinib post-trapianto per prevenire la recidiva in pazienti trapiantati per LMC in fase avanzata e LLA Ph+. I pazienti dello studio ricevevano un mantenimento con nilotinib post-trapianto, che era iniziato dopo una mediana di 38 giorni dal trapianto. Sebbene il trattamento sia risultato gravato da una significativa tossicità gastrointestinale ed epatica, per cui un rilevante numero di pazienti ha sospeso il trattamento, la maggior parte dei pazienti acquisiva o manteneva una risposta molecolare completa e solo 1 paziente è recidivato. Nei pazienti che avevano ricevuto nilotinib come mantenimento, dopo un follow up mediano di 46 mesi, la sopravvivenza globale e libera da progressione a 2 anni erano rispettivamente 69 e 56%<sup>(16)</sup>. Gli studi discussi sopra evidenziano una grande efficacia dei TKIs nel prevenire la recidiva post-trapianto.

## Tossicità delle DLI

L'infusione delle DLI rimane una delle principali opzioni terapeutiche per il salvataggio dei pazienti in recidiva molecolare dopo il tra-

pianto o con un chimerismo T linfocitario misto. Per questo motivo viene utilizzata frequentemente dopo un trapianto a ridotta intensità di condizionamento. L'uso di linfociti T del donatore è potenzialmente efficace sia per indurre una remissione molecolare che per ristabilire un chimerismo linfocitario completo del donatore<sup>(17)</sup>. Il principale limite di questo trattamento è il significativo rischio di sviluppare una GvHD conseguente al trattamento stesso, che può interessare fino al 50-70% dei pazienti che hanno ricevuto tale terapia cellulare<sup>(18)</sup>. Il rischio di sviluppare una GvHD post-infusione di DLI dipende dalla dose di DLI e dal tipo di donatore, mentre non vi è alcuna correlazione con la malattia ematologica per cui il paziente è stato trapiantato. Peggs et al.<sup>(19)</sup> hanno dimostrato in una coorte di pazienti trattati con infusioni di DLI (per un chimerismo incompleto, o per una malattia minima persistente o in progressione dopo trapianto allogenico a intensità ridotta) che la GvHD occorreva più frequentemente e in forma più grave nei pazienti trapiantati da donatori non familiari rispetto a quelli da donatori familiari, nonostante l'impiego di dosaggi minori di T linfociti<sup>(19)</sup>. Il rischio di GvHD secondario all'impiego di DLI è risultato significativamente associato a differenti dosi di linfociti e al tipo di donatore<sup>(20)</sup>. Un recente studio retrospettivo di 225 pazienti che avevano ricevuto un trapianto da donatori familiari e non familiari per LMC recidivata o altre neoplasie ematologiche recidivate, ha dimostrato, in analisi multivariata, che la dose iniziale di DLI > 10x10<sup>7</sup> CD3+/kg si associava con un aumentato rischio di GvHD. Infatti, l'incidenza cumulativa di GvHD era più del 50% dopo una dose di DLI maggiore di 10x10<sup>7</sup> CD3+/kg, mentre era circa del 20% quando veniva impiegata una dose inferiore a 1x10<sup>7</sup> CD3+/kg. Inoltre, una dose iniziale di CD3+ uguale o maggiore a 10x10<sup>7</sup>/kg non riduceva il rischio di recidiva e non aumentava la sopravvivenza dei pazienti<sup>(21)</sup>. In generale, questi risultati suggeriscono l'utilizzo di una dose di linfociti inferiore a 10x10<sup>7</sup>/kg come dose iniziale di terapia cellulare nel trattamento della recidiva dopo trapianto allogenico.

Un'altra rilevante potenziale complicanza in seguito alla somministrazione di linfociti è l'aplasia midollare che è stata descritta fino nel 40% dei pazienti<sup>(22)</sup>. Il principale fattore che predice lo sviluppo di aplasia post-infusione di linfociti è la presenza di un'insufficiente ematopoiesi del donatore prima dell'infusione di linfociti<sup>(23)</sup>. Casi di aplasia sono stati registrati più frequentemente in pazienti che avevano ricevuto linfociti del donatore per recidiva ematologica di LMC rispetto ai pazienti con recidiva di LMA. Nei pazienti con emopoiesi residua del donatore assente, una spontanea risoluzione dell'aplasia post-infusione di linfociti del donatore è improbabile e una nuova infusione di cellule staminali sembra necessaria per evitare l'elevata mortalità e morbilità dovute alla condizione di aplasia prolungata. Ne consegue che una valutazione della emopoiesi residua del donatore, tramite chimerismo, prima di procedere ad un'eventuale terapia cellulare con linfociti T è assolutamente raccomandabile.

## Cellule *Natural Killer* e T-regolatorie

Le cellule *natural killer* (NK) sono in grado di esercitare un potente effetto allo-reattivo contro le cellule neoplastiche quando i *killing inhibitory receptors* (KIR) sulla superficie delle cellule NK del donatore non sono già impegnate dai rispettivi ligandi (KIRL) rappresentati da antigeni HLA di classe I<sup>(24)</sup>. Numerosi studi clinici hanno suggerito una relazione tra questo riconoscimento allo-reattivo da parte delle cellule NK e l'outcome del trapianto allogenico, particolarmente nel contesto aploidentico<sup>(25)</sup>. In conformità ad alcune esperienze preliminari di sicurezza, che documentavano la possibilità di infondere cellule NK anche in un contesto di incompatibilità HLA senza causare GvHD<sup>(26-28)</sup>, è stata testata la sicurezza e l'attecchimento della somministrazione di cellule NK aploidentiche dopo una terapia immunosoppressiva in un piccolo studio di 10 pazienti pediatriche affette da LMA che avevano completato un programma di chemioterapia ed erano in 1<sup>a</sup> remissione completa. Dopo deplezione *in vivo* dei linfociti con ciclofosfamida e fludarabina, le cellule NK *mismatched* venivano infuse, poi veniva fatta seguire un'infusione di IL-2. In tutti i pazienti si è osservato un transitorio attecchimento dopo un tempo mediano di 10 giorni e una significativa espansione delle cellule NK KIR *mismatched*. La tossicità extra-ematologica era limitata, senza casi di GvHD acuta. Tutti i pazienti rimanevano in remissione e la sopravvivenza libera da eventi a 2 anni era del 100%<sup>(29)</sup>.

In una successiva serie di 30 pazienti che avevano ricevuto dopo un trapianto a ridotta intensità di infusioni di linfociti arricchiti in cellule NK e con HLA con differenza antigenica fino a un massimo di 3/6, coloro che ottenevano una risposta a lungo termine evidenziano anche un significativo miglioramento in termini di durata della risposta e di sopravvivenza globale<sup>(30)</sup>. In uno studio di fase II che ha incluso 16 pazienti con leucemia ad alto rischio o altri tumori pluri-recidivati, le cellule NK altamente purificate erano somministrate nei giorni +3, +40 e +100 dopo un trapianto aploidentico T depleto. La quantità mediana di cellule NK utilizzata era di  $1,2 \times 10^7$ /kg contenenti  $0,003 \times 10^7$ /Kg linfociti T. In questo studio, 4 pazienti hanno sviluppato una GvHD acuta di grado  $\geq 2$ , che è risultata fatale in 3 su 4 pazienti. La GvHD acuta era correlata con le sole dosi cumulative di cellule T infuse, ma non con le dosi cumulative di cellule NK<sup>(31)</sup>. Nonostante vi sia evidenza che le infusioni di cellule NK possano aumentare l'effetto GvL del trapianto, senza un significativo incremento della GvHD, la breve emivita delle cellule NK infuse nel contesto di un'immunoterapia adottiva e l'impegnativo e costoso lavoro di laboratorio necessario per implementare questa tecnica, potrebbero limitarne il loro utilizzo nella pratica clinica. Nell'ambito del trapianto aploidentico, un altro interessante campo di ricerca di base e clinica è l'immunoterapia adottiva utilizzando l'infusione di cellule T regolatorie (T-regs) selezionate. Il primo obiettivo di questo tipo di intervento consiste nel manipolare

il trapianto per ridurre l'incidenza e la gravità della GvHD acuta, così come aumentare la velocità e la qualità della ricostituzione immunologica post-trapianto<sup>(32)</sup>. In un gruppo di pazienti affetti da LMA ad alto rischio sottoposti a trapianto aploidentico T depleto *in vivo*, una precoce infusione post-trapianto di cellule T-regs si è dimostrata efficace non solo nel migliorare la ricostituzione immunologica post-trapianto dei pazienti, ma anche nel ridurre l'incidenza di recidiva di leucemia<sup>(33)</sup>.

## 5-Azacidina

Nei pazienti affetti da SMD o LMA, la recidiva generalmente avviene nei primi 6-12 mesi dopo il trapianto<sup>(34,35)</sup> ed è influenzata principalmente dalle caratteristiche della malattia all'esordio, valutate secondo *score* di rischio validati a livello internazionale<sup>(36-39)</sup> e secondo categorie di rischio citogenetico e molecolare della malattia<sup>(40-43)</sup>. Diversi approcci preventivi di terapia farmacologica o immunologica sono teoricamente possibili, quali l'utilizzo di farmaci ipometilanti e immunomodulanti, o la sospensione precoce della terapia immunosoppressiva, o l'impiego delle DLI. In mancanza di studi clinici che confrontino le possibili diverse strategie, vi è incertezza a riguardo del possibile migliore trattamento. Comunque, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso gli agenti ipometilanti, soprattutto in considerazione del buon profilo di tollerabilità e della possibilità di essere somministrati ambulatorialmente. Uno studio di *dose-finding* ha dimostrato la sicurezza (nessun incremento del rischio di GvHD) e l'efficacia dell'azacidina a basso dosaggio (32 mg/m<sup>2</sup> al giorno per 5 giorni consecutivi) nel prevenire la recidiva dopo allotrapianto<sup>(44)</sup>. È importante notare che da un punto di vista biologico la 5-azacidina, oltre a un effetto citotossico, sembra accelerare la ricostituzione dei linfociti T-regolatori ed indurre una risposta dei T linfociti CD8+ contro possibili antigeni tumorali, aumentando quindi l'effetto GvL e riducendo quello GvHD<sup>(45-47)</sup>. Considerando queste proprietà della 5-azacidina, sono in corso studi per valutare l'efficacia e sicurezza della combinazione azacidina e DLI in prevenzione della recidiva di LMA e SMD post trapianto (NCT01541280), similmente a quanto già sperimentato in pazienti recidivati dopo trapianto, in cui in una percentuale variabile tra il 30 e 60% si otteneva una risposta con una buona durata di questa remissione che spesso non richiedeva la necessità di ulteriori trattamenti o di ricevere un secondo trapianto allogenico<sup>(48,49)</sup>. Tra questi studi va segnalato il più recente che ha valutato retrospettivamente in 181 pazienti recidivati dopo trapianto (116 affetti da LMA e 65 da SMD) la tollerabilità e l'efficacia dell'azacidina da sola o in combinazione con DLI. Il 25% dei pazienti ha ottenuto una risposta e tra i pazienti che ottenevano una risposta completa la sopravvivenza a 2 anni era del 48% *versus* il 12% dell'intera coorte di pazienti<sup>(50)</sup>.

Recentemente uno studio pilota ha valutato la sicurezza ed efficacia

della combinazione 5-azacitidina, somministrata al dosaggio di 30 mg/m<sup>2</sup> per via endovenosa nei giorni 1-7, e gemtuzumab ozogamicin al dosaggio di 3 mg/m<sup>2</sup> al giorno 8 come terapia di mantenimento dopo allotrapianto. Il trattamento era ripetuto ogni 4 settimane. Dieci pazienti affetti da LMA ad alto rischio con un'età mediana di 49 anni sono stati trattati in questo studio. In questo contesto di trattamento post-trapianto, la terapia viene ben tollerata con risultati potenzialmente efficaci nel prolungare la sopravvivenza di pazienti con LMA ad alto rischio <sup>(51)</sup>. Sulla base dell'esperienza accumulata fino ad oggi, si può concludere che un trattamento precoce quando il numero di blasti è basso o è presente solo una recidiva citogenetica rappresenta la condizione ideale per ottenere con maggiore probabilità una RC e un controllo della malattia a lungo termine <sup>(49)</sup>.

In conclusione, considerando che nei pazienti affetti da LMA e SMD la recidiva avviene prevalentemente entro il primo anno dopo l'allograpianto, una terapia di mantenimento iniziata precocemente è ipoteticamente la migliore strategia, anche se questo approccio implica esporre un certo numero di pazienti potenzialmente già curati ai rischi e costi di nuovi trattamenti. Per superare questo importante limite occorre identificare i pazienti a più elevato rischio di recidiva, attraverso il monitoraggio della MRD. In assenza di marcatori specifici di malattia, come spesso accade nelle SMD, la MRD potrebbe essere monitorata valutando il chimerismo, utilizzando le più recenti metodiche di biologia molecolare disponibili, che sono altamente sensibili. Utilizzando questo tipo di approccio, Platzbecker et al. <sup>(52)</sup> hanno condotto uno studio clinico che valutava l'efficacia del trattamento con azacitidina post-trapianto che veniva intrapreso sulla base dei valori di chimerismo del donatore. I risultati di questo studio mostravano una risposta iniziale nell'80% dei pazienti trattati, con un 20% di pazienti che ha mantenuto una continua negatività di MRD (chimerismo *full donor*) dopo la somministrazione di un numero limitato di cicli con azacitidina.

## Bortezomib

Il bortezomib ha una spiccata attività anti-mieloma sia nelle forme all'esordio sia in quelle refrattarie/recidivate ad altri tipi di terapia. Un limite del farmaco è rappresentato dagli effetti collaterali, in particolare la neuropatia, che potrebbe renderne difficile l'impiego nel periodo post-trapianto. Kroger et al. <sup>(56)</sup> hanno descritto l'effetto dell'infusione di DLI come singolo trattamento, oppure in combinazione con i nuovi farmaci anti-mieloma, quali talidomide, bortezomib e lenalidomide, in 32 pazienti con MM che avevano ottenuto solo una remissione parziale dopo il trapianto di midollo osseo allogenico. I risultati dello studio mostrano che il 59% dei pazienti ottiene una RC e che questa RC aveva una rilevanza clinica perché si associava ad un significativo miglioramento della sopravvivenza libera da malattia a 5 anni. Uno studio di fase II è in corso

per valutare se la somministrazione di bortezomib dopo un trapianto ad intensità ridotta in pazienti affetti da MM ad alto rischio possa migliorare l'outcome di questi pazienti (*clinicaltrials.gov identifier*: 02308280). Un altro studio di fase II, multicentrico, non-randomizzato è in corso per valutare il ruolo di MLN9708, un potente inibitore orale reversibile del proteasoma 20S, che risulta ben tollerato con una minima neuropatia periferica <sup>(57)</sup>, come mantenimento dopo allotrapianto nei pazienti affetti da MM ad alto rischio (*clinicaltrials.gov identifier*: 02168101).

## Anticorpi bispecifici, Cellule T modificate e linfociti T attivati *in vitro*

Il ruolo importante della valutazione MRD è stato documentato inizialmente nelle LLA. Numerosi studi eseguiti in ambito pediatrico <sup>(58, 59)</sup> e adulto <sup>(60-62)</sup> hanno chiaramente dimostrato che i valori di MRD rappresentano un fattore prognostico indipendente di outcome. I pazienti con valori di MRD persistentemente positivi durante l'induzione e il consolidamento del trattamento di 1° linea, o che divengono positivi dopo la fine del trattamento, hanno una ridotta sopravvivenza libera da leucemia. Studi recenti mostrano che anche i pazienti che vengono sottoposti ad allotrapianto con valori misurabili di MRD hanno un outcome inferiore a causa di un aumentato rischio di recidiva della leucemia <sup>(63, 64)</sup>. Anche negli studi condotti nel gruppo italiano NILG vi è evidenza di una relazione inversa tra livelli di MRD prima del trapianto e outcome dopo il trapianto <sup>(65-67)</sup>. Queste evidenze implicano che, per prevenire la recidiva, i pazienti candidati a trapianto allogenico dovrebbero essere valutati per ricevere nuove terapie sperimentali in grado di ottenere la remissione completa molecolare. Tra i farmaci innovativi attualmente a disposizione, il blinatumomab, un anticorpo bispecifico anti-CD3/CD19 (*Bispecific T-Cell Engager (BiTE) antibodies*) ha mostrato risultati molto promettenti in termini di elevata frequenza di risposta molecolare, soprattutto quando i pazienti venivano trattati per malattia minima residua <sup>(68, 69)</sup>. Infatti, nel primo studio pilota condotto nella LLA MRD+ si è ottenuta una negativizzazione del segnale molecolare nell'80% dei pazienti. Nove di 20 pazienti ricevevano un allotrapianto dopo il blinatumomab e 65% di loro rimaneva in remissione ematologica dopo un follow up mediano di 33 mesi. Sulla base di questi incoraggianti risultati ottenuti con un profilo di tossicità gestibile <sup>(70)</sup> e i dati che indicano che una positività molecolare presente prima del trapianto si associa ad un aumentato rischio di recidiva <sup>(71)</sup>, un breve trattamento prima del trapianto con blinatumomab (*bridging strategy*) potrebbe permettere di ottenere una convincente remissione molecolare e, quindi, favorire un miglior tasso di guarigione dopo il trapianto. Questa ipotesi di trattamento richiede di essere dimostrata in studi clinici disegnati ad hoc.

Il concetto che la persistenza o il divenire MRD positivi dopo il

trapianto precedono una franca recidiva ematologica è stato chiaramente documentato<sup>(58-60, 72-74)</sup>. Perciò, un attento monitoraggio dei valori di MRD post-trapianto è molto importante e potrebbe permettere un rapido intervento preventivo prima della recidiva ematologica della malattia. A questo proposito, l'impiego di blinatumomab sembra più interessante rispetto ai trattamenti convenzionali, quali la riduzione e/o la sospensione della terapia immunosoppressiva o l'uso delle DLI sempre potenzialmente pericoloso per il rischio di indurre GvHD.

Un altro ambito di ricerca è rappresentato dall'impiego di cellule T modificate (CAR-T) che hanno dimostrato risultati impressionanti in popolazioni di pazienti altamente refrattari ai trattamenti convenzionali<sup>(75,76)</sup>. L'impiego di queste cellule come terapia preventiva della recidiva dopo trapianto, deve, però, tenere in considerazione i costi e la complessità tecnica per la preparazione di cellule geneticamente modificate, nonché gli importanti livelli di tossicità principalmente connessi al rilascio massivo di citochine seguenti l'infusione *in vivo*<sup>(75,76)</sup>. Sulla base del successo ottenuto con queste cellule (CAR-T) nella LLA a cellule B e nella leucemia linfatica cronica-B, approcci simili sono attualmente in fase di studio con la speranza di colpire anche le neoplasie mieloidi. Tra gli altri antigeni potenzialmente oggetto della costruzione di recettori chimerici vanno ricordati il CD33 e il CD123, che è la catena  $\alpha$  del recettore dell'interleuchina-3, iper-espresso nelle LMA rispetto alle normali cellule staminali ematopoietiche. Cellule CAR-T ridirette contro il CD123 sembrano mediare una potente attività contro le cellule leucemiche CD123+<sup>(77, 78)</sup>. La possibilità di sviluppare un approccio clinico utilizzando queste cellule è attualmente in fase di valutazione<sup>(79)</sup>.

Infine, l'impiego di linfociti T attivati *in vitro*, (*Cytokine Induced Killer Cells* CIK) potrebbe essere un'alternativa capace di migliorare i risultati ottenuti con le DLI nel trattamento delle recidive post-trapianto. Infatti, se l'infusione di DLI è particolarmente efficace nei pazienti con recidiva di LMC, in altre neoplasie ematologiche il loro utilizzo è efficace in circa il 10% dei casi ed è gravato da un significativo rischio di GvHD. Presso il nostro Centro abbiamo studiato in 2 studi di fase I e II la sicurezza e l'efficacia della somministrazione di cellule CIK derivate da sangue periferico del donatore in pazienti recidivati dopo un trapianto allogenico per neoplasia ematologica (eccetto le LMC) documentando che l'infusione di cellule CIK è ben tollerata e in taluni casi può ottimizzare l'efficacia del controllo immunologico della malattia<sup>(80,81)</sup>.

Un esempio dello schema di trattamento dello studio con cellule CIK in un paziente affetto da LMA recidivata dopo trapianto allogenico è riportato nella Figura 1.

## Conclusioni

Per anni, l'unica strategia terapeutica per la recidiva leucemica post-trapianto è stata limitata all'impiego della chemioterapia e all'infusione di linfociti non manipolati del donatore. Recentemente si stanno sperimentando nuove strategie terapeutiche, rappresentate dall'impiego preventivo di farmaci tumori specifici e/o di terapie cellulari manipolate per rafforzare l'effetto immunologico del trapianto contro la leucemia (GvL). Entrambe le strategie, che devono divenire parte integrante delle future strategie trapiantologiche, mirano a ridurre il rischio di recidiva post-trapianto attraverso 2 diversi approcci:

- ridurre la quantità di malattia minima prima del trapianto, ed esempio paradigmatico di questo approccio è l'utilizzo del blinatumomab nelle neoplasie linfoidi B;
- ritardare la recidiva o progressione di malattia nei primi mesi dopo il trapianto quando la necessaria competenza immunologica dell'emopoiesi del donatore non è ancora sviluppata e non è in grado di svolgere un sufficiente effetto contro la neoplasia. Esempio di questo è l'impiego nelle LLA Philadelphia positive dei TKIs nei primi mesi post-trapianto, o l'impiego precoce di terapia cellulare.

Comunque, al fine di non esporre pazienti potenzialmente già guariti ai rischi di tossicità da trattamenti preventivi non necessari e non aumentare i costi generali della cura, è necessario prevedere l'impiego di tali terapie innovative nei soli pazienti a maggior rischio di recidiva. Pertanto, gli sforzi futuri dovranno concentrarsi anche sulla possibilità di identificare il più precocemente possibile i pazienti ad elevato rischio di recidiva. Il miglioramento delle tecniche molecolari e le aumentate conoscenze genetiche delle malattie offrono l'opportunità di poter monitorare la malattia residua nella maggior parte delle emopatie. Lo studio della malattia minima residua durante il follow up post-trapianto deve pertanto divenire uno standard clinico e guidare le scelte terapeutiche, che potranno risultare personalizzate per ogni singolo paziente. Con questi obiettivi e pianificando studi clinici randomizzati per testare rigorosamente efficacia e tollerabilità dei nuovi trattamenti di prevenzione della recidiva è ipotizzabile nei prossimi anni un ulteriore significativo miglioramento dei risultati del trapianto.

## Bibliografia

1. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2010;363(22):2091-101.
2. Krishnamurthy P, Potter VT, Barber LD, Kulasekararaj AG, Lim ZY, Pearce RM, et al. Outcome of donor lymphocyte infusion after T cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(4):562-8.
3. Alyea EP, DeAngelo DJ, Moldrem J, Pagel JM, Przepiorka D, Sadelin M, et al. NCI First International Workshop on The Biology, Prevention and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: report from the committee on prevention of relapse following allogeneic cell transplantation for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(8):1037-69.
4. Thomson KJ, Morris EC, Milligan D, Parker AN, Hunter AE, Cook G, et al. T-cell-depleted reduced-intensity transplantation followed by donor leukocyte infusions to promote graft-versus-lymphoma activity results in excellent long-term survival in patients with multiply relapsed follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(23):3695-700.
5. 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(24):5675-87.
6. Schmid C, Schleuning M, Tischer J, Holler E, Haude KH, Braess J, et al. Early allo-SCT for AML with a complex aberrant karyotype--results from a prospective pilot study. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(1):46-53.
7. Kroger N, Zabelina T, Wolschke C, Lellek H, Stubig T, Lestin M, et al. Induction Chemotherapy Followed Immediately by Busulfan-Based Reduced Conditioning and Allografting in Elderly Patients with Advanced MDS or sAML. *ASH Annual Meeting Abstracts 2009*;114(22):3387.
8. Rettinger E, Willasch AM, Kreyenberg H, Borkhardt A, Holter W, Kremens B, et al. Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients showing evidence of mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;118(20):5681-8.
9. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2408-17.
10. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2260-70.
11. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;362(24):2251-9.
12. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112(12):4371-83.
13. Savani BN, Montero A, Kurlander R, Childs R, Hensel N, Barrett AJ. Imatinib synergizes with donor lymphocyte infusions to achieve rapid molecular remission of CML relapsing after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36(11):1009-15.
14. Olavarria E, Siddique S, Griffiths MJ, Avery S, Byrne JL, Piper KP, et al. Posttransplantation imatinib as a strategy to postpone the requirement for immunotherapy in patients undergoing reduced-intensity allografts for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(13):4614-7.
15. Pfeifer H, Wassmann B, Bethge W, Dengler J, Bornhauser M, Stadler M, et al. Randomized comparison of prophylactic and minimal residual disease-triggered imatinib after allogeneic stem cell transplantation for BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(6):1254-62.
16. Shimoni A, Volchek Y, Koren-Michowitz M, Varda-Bloom N, Somech R, Shem-Tov N, et al. Phase 1/2 study of nilotinib prophylaxis after allogeneic stem cell transplantation in patients with advanced chronic myeloid leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2015;121(6): 863-71.
17. Massenkeil G, Nagy M, Lawang M, Rosen O, Genvresse I, Geserick G, 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(5):339-45.
18. Marks DI, Lush R, Cavenagh J, Milligan DW, Schey S, Parker A, et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2002;100(9):3108-14.
19. Peggs KS, Thomson K, Hart DP, Geary J, Morris EC, Yong K, et al. Dose-escalated donor lymphocyte infusions following reduced intensity transplantation: toxicity, chimerism, and disease responses. *Blood*. 2004;103(4):1548-56.
20. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NC, Kaeda J, Chase A, 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(1):67-71.
21. Bar M, Sandmaier BM, Inamoto Y, Bruno B, Hari P, Chauncey T, et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed hematological malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation: prognostic relevance of the initial CD3+ T cell dose. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(6):949-57.
22. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev*. 2010;36(7):528-38.
23. Keil F, Haas OA, Fritsch G, Kalhs P, Lechner K, Mannhalter C, et al. Donor leukocyte infusion for leukemic relapse after allogeneic marrow transplantation: lack of residual donor hematopoiesis predicts aplasia. *Blood*. 1997;89(9):3113-7.
24. Moretta L, Pietra G, Montaldo E, Vacca P, Pende D, Falco M, et al. Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors. *Front Immunol*. 2014;5:87.
25. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999;94(1):333-9.
26. Koehl U, Sorensen J, Esser R, Zimmermann S, Gruttner HP, Tonn T, et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;33(3):261-6.
27. Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, Heim D, Stern M, Kuhne T, et al. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004;18(11):1835-8.
28. Nguyen S, Beziat V, Norol F, Uzunov M, Trebeden-Negre H, Azar N, et al. Infusion of allogeneic natural killer cells in a patient with acute myeloid leukemia in relapse after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion*. 2011;51(8):1769-78.
29. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(6):955-9.
30. Rizzieri DA, Storms R, Chen DF, Long G, Yang Y, Nikcevic DA, et al. Natural killer cell-enriched donor lymphocyte infusions from A 3-6/6 HLA matched family member following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(8):1107-14.
31. Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, et al. Preemptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant*. 2012;48(3):433-8.
32. Ganguly S, Ross DB, Panoskatsis-Mortari A, Kanakry CG, Blazar BR, Levy RB, et al. Donor CD4+ Foxp3+ regulatory T cells are necessary for posttransplantation cyclophosphamide-mediated protection against GVHD in mice. *Blood*. 2014;124(13):2131-41.
33. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921-8.
34. Schroeder T, Frobel J, Cadeddu RP, Czibere A, Dienst A, Platzbecker U, et al. Salvage therapy with azacitidine increases regulatory T cells in peripheral blood of patients with AML or MDS and early relapse after allogeneic blood stem cell

- transplantation. *Leukemia*. 2013;27(9):1910-3.
35. Pollyea DA, Artz AS, Stock W, Daugherty C, Godley L, Odenike OM, et al. Outcomes of patients with AML and MDS who relapse or progress after reduced intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(11):1027-32.
  36. Alessandrino EP, Della Porta MG, Bacigalupo A, Malcovati L, Angelucci E, Van Lint MT, et al. Prognostic impact of pre-transplantation transfusion history and secondary iron overload in patients with myelodysplastic syndrome undergoing allogeneic stem cell transplantation: a GITMO study. *Haematologica*. 2010;95(3):476-84.
  37. Alessandrino EP, Della Porta MG, Bacigalupo A, Van Lint MT, Falda M, Onida F, et al. WHO classification and WPSS predict posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome: a study from the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2008;112(3):895-902.
  38. Alessandrino EP, Della Porta MG, Pascutto C, Bacigalupo A, Rambaldi A. Should cytoreductive treatment be performed before transplantation in patients with high-risk myelodysplastic syndrome? *J Clin Oncol*. 2013;31(21):2761-2.
  39. Della Porta MG, Alessandrino EP, Bacigalupo A, van Lint MT, Malcovati L, Pascutto C, et al. Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R. *Blood*. 2014;123(15):2333-42.
  40. Deeg HJ, Scott BL, Fang M, Shulman HM, Gyurkocza B, Myerson D, et al. Five-group cytogenetic risk classification, monosomal karyotype, and outcome after hematopoietic cell transplantation for MDS or acute leukemia evolving from MDS. *Blood*. 2012;120(7):1398-408.
  41. Cornelissen JJ, Breems D, van Putten WL, Gratwohl AA, Passweg JR, Pabst T, et al. Comparative analysis of the value of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in acute myeloid leukemia with monosomal karyotype versus other cytogenetic risk categories. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2140-6.
  42. Chevallier P, Labopin M, Milpied N, Cornelissen JJ, Blaise D, Petersen E, et al. Impact of cytogenetics risk on outcome after reduced intensity conditioning allo-SCT from an HLA-identical sibling for patients with AML in first CR: a report from the acute leukemia working party of EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(11):1442-7.
  43. Brunet S, Labopin M, Esteve J, Cornelissen J, Socie G, Iori AP, et al. Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. *J Clin Oncol*. 2012;30(7):735-41.
  44. de Lima M, Giral S, Thall PF, de Padua Silva L, Jones RB, Komanduri K, et al. Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome: a dose and schedule finding study. *Cancer*. 2010;116(23):5420-31.
  45. Choi J, Ritchey J, Prior JL, Holt M, Shannon WD, Deych E, et al. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versus-leukemia. *Blood*. 2010;116(1):129-39.
  46. Sanchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaria C, Caballero-Velazquez T, Blanco B, Herrero-Sanchez C, et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood*. 2010;115(1):107-21.
  47. Goodyear OC, Dennis M, Jilani NY, Loke J, Siddique S, Ryan G, et al. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2012;119(14):3361-9.
  48. Schroeder T, Czibere A, Platzbecker U, Bug G, Uharek L, Luft T, et al. Azacitidine and donor lymphocyte infusions as first salvage therapy for relapse of AML or MDS after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2013;27(6):1229-35.
  49. Schroeder T, Rachlis E, Bug G, Stelljes M, Klein S, Steckel NK, et al. Treatment of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome relapse after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine and donor lymphocyte infusions—a retrospective multicenter analysis from the German Cooperative Transplant Study Group. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(4):653-60.
  50. Craddock C, Labopin M, Robin M, Finke J, Chevallier P, Yakoub-Agha I, et al. Clinical activity of azacitidine in patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016;101(7):879-83.
  51. Oshikawa G, Kakihana K, Saito M, Aoki J, Najima Y, Kobayashi T, et al. Post-transplant maintenance therapy with azacitidine and gemtuzumab ozogamicin for high-risk acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2015;169(5):756-9.
  52. Platzbecker U, Wermke M, Radke J, Oelschlaegel U, Seltmann F, Kiani A, et al. Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia*. 2012;26(3):381-9.
  53. Chang DH, Liu N, Klimek V, Hassoun H, Mazumder A, Nimer SD, et al. Enhancement of ligand-dependent activation of human natural killer T cells by lenalidomide: therapeutic implications. *Blood*. 2006;108(2):618-21.
  54. Sockel K, Bornhaeuser M, Mischak-Weissinger E, Trensche R, Wermke M, Unzicker C, et al. Lenalidomide maintenance after allogeneic HSCT seems to trigger acute graft-versus-host disease in patients with high-risk myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and del(5q): results of the LENAMAINT trial. *Haematologica*. 2012;97(9):e34-5.
  55. Kneppers E, van der Holt B, Kersten MJ, Zweegman S, Meijer E, Huls G, et al. Lenalidomide maintenance after nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma is not feasible: results of the HOVON 76 Trial. *Blood*. 2011;118(9):2413-9.
  56. Kroger N, Badbaran A, Lioznov M, Schwarz S, Zeschke S, Hildebrand Y, et al. Post-transplant immunotherapy with donor-lymphocyte infusion and novel agents to upgrade partial into complete and molecular remission in allografted patients with multiple myeloma. *Exp Hematol*. 2009;37(7):791-8.
  57. Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orlowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*. 2012;120(5):947-59.
  58. Cave H, van der Werfften Bosch J, Suci S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer—Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 1998;339(9):591-8.
  59. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998;352(9142):1731-8.
  60. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2009;113(18):4153-62.
  61. Gokbuget N, Kneba M, Raff T, Trautmann H, Bartram CR, Arnold R, et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012;120(9):1868-76.
  62. Ribera JM, Oriol A, Morgades M, Montesinos P, Sarra J, Gonzalez-Campos J, et al. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. *J Clin Oncol*. 2014;32(15):1595-604.
  63. Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, Krejci O, Sedlacek P, Formankova R, et al. Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(1):93-100.
  64. Bar M, Wood BL, Radich JP, Doney KC, Woolfrey AE, Delaney C, et al. Impact of minimal residual disease, detected by flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res Treatment*. 2014;2014(421723):1-9.
  65. Spinelli O, Peruta B, Tosi M, Guerini V, Salvi A, Zanotti MC, et al. Clearance of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation and the prediction of the clinical outcome of adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2007;92(5):612-8.
  66. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Different

- molecular levels of post-induction minimal residual disease may predict hematopoietic stem cell transplantation outcome in adult Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4:e225.
67. Lussana F, Intermesoli T, Gianni F, Boschini C, Masciulli A, Spinelli O, et al. Levels of Minimal Residual Disease Prior to Transplant Influence Outcome of Adult Patients with Philadelphia Chromosome Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2015;126(23):4374-4374.
  68. Topp MS, Kufer P, Gokbuget N, Goebeler M, Klingler M, Neumann S, et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol*. 2011;29(18):2493-8.
  69. Topp MS, Gokbuget N, Zugmaier G, Degenhard E, Goebeler ME, Klingler M, et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood*. 2012;120(26):5185-7.
  70. Topp MS, Gokbuget N, Stein AS, Zugmaier G, O'Brien S, Bargou RC, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2015;16(1):57-66.
  71. Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, Eckert C, Reising M, Willasch A, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27(3):377-84.
  72. Holowiecki J, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, Jagoda K, Stella-Holowiecka B, Piatkowska-Jakubas B, et al. Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Ph-negative adult acute lymphoblastic leukaemia. The Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD Study. *Br J Haematol*. 2008;142(2):227-37.
  73. Bruggemann M, Raff T, Flohr T, Gokbuget N, Nakao M, Droese J, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;107(3):1116-23.
  74. Patel B, Rai L, Buck G, Richards SM, Mortuza Y, Mitchell W, et al. Minimal residual disease is a significant predictor of treatment failure in non T-lineage adult acute lymphoblastic leukaemia: final results of the international trial UKALL XII/ECOG2993. *Br J Haematol*. 2010;148(1):80-9.
  75. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-17.
  76. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2015;385(9967):517-28.
  77. Tettamanti S, Marin V, Pizzitola I, Magnani CF, Giordano Attianese GM, Cribioli E, et al. Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor. *Br J Haematol*. 2013;161(3):389-401.
  78. Pizzitola I, Anjos-Afonso F, Rouault-Pierre K, Lassailly F, Tettamanti S, Spinelli O, et al. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Leukemia*. 2014;28(8):1596-605.
  79. Rambaldi A, Biagi E, Bonini C, Biondi A, Introna M. Cell-based strategies to manage leukemia relapse: efficacy and feasibility of immunotherapy approaches. *Leukemia*. 2015;29(1):1-10.
  80. Introna M, Borleri G, Conti E, Franceschetti M, Barbui AM, Broady R, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study. *Haematologica*. 2007;92(7):952-9.
  81. Introna M, Pievani A, Borleri G, Capelli C, Algarotti A, Mico C, et al. Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with CIK cells after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(11):1603-7.

## Parole Chiave

Trapianto allogenico, recidiva, immunoterapia, graft versus leukemia (GvL), graft versus host disease (GvHD)

## Indirizzi per la corrispondenza

*Alessandro Rambaldi*

Università degli Studi di Milano, Milano, Italy,  
USC Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo  
A.O. Ospedale Papa Giovanni XXIII Bergamo  
Piazza OMS, 1 - 24127 Bergamo, Italy  
E-mail: arambaldi@asst-pg23.it





*La rivista è consultabile anche sui siti web:*

Società Italiana di Ematologia (SIE)

[\*\*www.siematologia.it\*\*](http://www.siematologia.it)

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)

[\*\*www.siesonline.it\*\*](http://www.siesonline.it)

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini

[\*\*www.beat-leukemia.com\*\*](http://www.beat-leukemia.com)

*Nel prossimo numero: Anno 3 - Numero 3 - 2016*

## **Terapia di supporto in oncoematologia**

Profilassi e terapia delle complicanze gastroenterologiche

Il controllo del dolore

Fattori di crescita

Handbook per il supporto trasfusionale

Profilassi e terapia del sovraccarico di ferro

*Con il supporto non condizionato di*

