

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA CLINICA E
SPERIMENTALE**

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED/15 MALATTIE DEL SANGUE

**IL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO APLOIDENTICO NELLE PATOLOGIE
ONCOEMATOLOGICHE: STUDIO CLINICO**

Presentata da: Dott. Alessandro Isidori

Coordinatore Dottorato:
Chiar.mo Prof. Stefano A Pileri

Relatore:
Dott. Pier Paolo Piccaluga

Parole chiave: cellule staminali emopoietiche CD34+, megadose, trapianto aploidentico, graft versus host disease (GVHD), sopravvivenza libera da malattia.

Esame finale anno 2008

*Ad Arianna, Gaia e Ginevra
Ai miei Genitori e mia sorella, Ludovica*

INDICE

Le Cellule Staminali Emopoietiche	pag. 4
Cellule CD34+	pag. 7
Metodiche Per La Separazione Delle Cellule CD34+	pag. 12
Metodiche Per La Mobilizzazione, La Raccolta E La Conservazione Delle Cellule CD34+ Del Sangue Periferico	pag. 13
Il Trapianto Di Cellule Staminali Aploidentiche	pag. 16
Risultati	pag. 29
Discussione	pag. 33
Conclusioni	pag. 36
Bibliografia	pag. 37
Tabelle e figure	pag. 42

LE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

Introduzione

La maggior parte delle cellule che si trovano nel sangue periferico sono destinate ad una breve esistenza per poter espletare nel miglior modo possibile le loro funzioni di difesa dalle infezioni e di trasporto dell'ossigeno ai tessuti; pertanto devono essere continuamente rimpiazzate da cellule giovani e perfettamente funzionanti, prodotte da cellule più immature che risiedono nel midollo osseo. Queste sono note come cellule staminali, e la loro conoscenza, la loro quantificazione, le loro potenziali funzioni e la loro purificazione sono tra gli obiettivi dei ricercatori da diversi anni. Le cellule staminali emopoietiche esprimono sulla propria superficie alcuni antigeni, tra cui il CD 34, e la denominazione di cellula CD34+ è diventata, anche se in modo improprio, sinonimo di cellula staminale. Studi successivi hanno permesso di identificare altri antigeni e di distinguere tra due distinte sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche umane: le cellule CD34+, HLA-DR+, CD38-, che possono differenziare in tutte le linee emopoietiche, e le cellule CD34+, HLA-DR-, CD38-, che possono differenziare in precursori emopoietici e cellule stromali, indispensabili per supportare la differenziazione dei precursori (1). Il concetto di cellula staminale emopoietica si è quindi modificato, ampliandosi notevolmente, risultando essa potenzialmente in grado di ricostituire il microambiente midollare, oltre alle cellule mieloidi e linfoidi.

L'interpretazione più diffusa è che le cellule staminali rappresentino lo 0,01% delle cellule midollari, che siano dotate della capacità di automantenersi e che possano esprimere la loro ampia potenzialità nel rigenerare il midollo con cellule della serie mieloide e linfoide.

Eritrociti, neutrofili, eosinofli, basofili e mastociti, monociti e macrofagi tissutali, comprese le loro più spinte specializzazioni, come cellule di Langerhans, osteoclasti, cellule dendritiche, cellule di Kupfer e linfociti B e T possono essere tutti prodotti da una singola cellula staminale.

Definizione di cellule staminali emopoietiche

Negli anni '70, Lajtha (2,3) e McCulloch (4) e altri autori (5) hanno descritto le proprietà delle cellule staminali emopoietiche: cellule dotate di un ampio potenziale proliferativo e della capacità di differenziare in tutte le linee emopoietiche. Negli anni successivi lo sviluppo di differenti metodiche per lo studio *in vivo* ed *in vitro* dell'emopoiesi, l'identificazione e la caratterizzazione dei fattori di regolazione dell'emopoiesi, nuove tecniche per l'espansione e l'arricchimento *in vitro* delle cellule emopoietiche hanno notevolmente ampliato le nostre conoscenze, senza però modificare il concetto di cellula staminale formulato da Lajtha e McCulloch (6). Le proprietà di automantenimento e ripopolazione midollare a lungo termine sono state analizzate in studi sull'emopoiesi murina

e nei riceventi umani di trapianto di midollo osseo, sfruttando markers retrovirali ed analisi al Southern blot (7,8), ceppi murini particolari (9), markers cromosomici, isoenzimi e varianti emoglobiniche, mostrando che la ripopolazione midollare con tutte le linee emopoietiche può essere ottenuta da una o comunque da un limitato numero di cellule staminali primitive. Tutti questi studi sostengono il concetto di una cellula staminale con la capacità di ricostituire tutte le linee in un ricevente, conservando al contempo la capacità di automantenersi.

Differenziazione e commissionamento

Il costante processo di rinnovamento cellulare assicurato quotidianamente dall'emopoiesi si fonda sulla presenza di una ristretta popolazione di cellule dotate della capacità di automantenersi e differenziare. Queste cellule sono chiamate *staminali* emopoietiche e risultano pari allo 0,005-0,01% di tutta la popolazione midollare. L'automantenimento delle cellule staminali emopoietiche è indispensabile per impedire il loro esaurimento nel tempo ed è basato sulla capacità di tali cellule di dividersi, dando origine a due cellule figlie. Di queste, l'una rimpiazza la cellula madre, l'altra va incontro a differenziazione e maturazione.

L'emopoiesi umana è dunque sostenuta da un pool di cellule multipotenti capaci sia di automantenersi, sia di differenziare in progenitori commissionati verso le varie linee emopoietiche. Il termine *differenziazione* indica il fenomeno in base al quale si ha la restrizione progressiva delle molteplici potenzialità del genoma posseduto da una cellula che porta alla comparsa di caratteristiche specifiche; *commissionamento* significa assegnazione di un programma dal quale la cellula non può più tornare indietro, che eseguirà durante il processo di maturazione, nel corso del quale acquisirà tutte le sue specifiche caratteristiche morfologiche e funzionali previste dal programma che le è stato assegnato. La combinazione della capacità proliferativa e differenziativa delle cellule staminali emopoietiche è finalizzata allo sviluppo di cellule con potenzialità differenziativa e maturativa sempre più ristretta. Questo processo porta ad una notevole produzione di cellule emopoietiche mature e funzionalmente specializzate che dal midollo osseo vengono immesse in circolo.

La cellula staminale emopoietica è, per definizione, *totipotente* ed è in grado di dare origine a tutte le cellule mature mieloidi e linfoidi. Dalla proliferazione e differenziazione di questa derivano *cellule staminali multipotenti* commissionate per la linfopoiesi T e B oppure per la mielopoiesi (CFU-GEMM), dalle quali per ulteriore restrizione differenziativa derivano i *progenitori commissionati* per lo sviluppo di una linea cellulare. Le cellule staminali e i progenitori commissionati non sono riconoscibili morfologicamente al microscopio ottico e possono essere identificate in base all'espressione di particolari antigeni di superficie e/o

alla capacità di dare origine “in vitro” a colonie cellulari appartenenti ad una o più linee differenziative. In base a questa caratteristica tali cellule vengono identificate con una sigla che ne riassume la restrizione differenziativa. Nell’ambito dell’eritropoesi esistono due classi di progenitori commissionati, BFU-E e CFU-E; sei sono le classi di progenitori commissionati note nell’ambito della mielopoiesi, CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-Eo, CFU-Bas; due sono infine le classi di progenitori commissionati note nell’ambito della megacariocitopoiesi, BFU-MK, CFU-MK. A seguito della ulteriore differenziazione dei progenitori commissionati prendono origine i precursori morfologicamente riconoscibili, dai quali attraverso ulteriori tappe differenziative origineranno le cellule mature, pronte per essere immesse nel torrente circolatorio in cui, finalmente, potranno svolgere le funzioni per le quali sono state commissionate.

Regolatori emopoietici (fattori di crescita), modulazione e trasduzione del segnale

Per quanto il commissionamento e la differenziazione delle cellule staminali possa avere una sua determinazione intrinseca, è evidente che una grande varietà di stimoli esterni può influenzare e modulare la scelta di linea e la differenziazione. Questi fattori esterni (fattori di crescita emopoietici, microambiente midollare, induttori della differenziazione) cooperano con fattori trascrizionali cellulari per attivare o reprimere l’espressione di geni responsabili della scelta di linea, del diverso fenotipo maturo, della progressione nel ciclo cellulare. Questa complessa rete di interconnessioni porta una cellula staminale indifferenziata e totipotente a diventare una cellula matura altamente specializzata e incapace di proliferare.

CELLULE CD34+

Definizione e morfologia

L'espressione dell'antigene CD34 identifica una popolazione cellulare morfologicamente ed immunologicamente eterogenea, funzionalmente caratterizzata dalla capacità di generare *in vitro* aggregati clonali derivati da progenitori più o meno ancestrali e dalla capacità *in vivo* di ricostituire il sistema linfo-mielopoietico in un ospite letalmente irradiato (10,11). Studi immunoistochimici hanno dimostrato che l'antigene CD34 è specifico per lo stadio ma non per la filiera differenziativa: infatti, indipendentemente dalla linea differenziativa, esso viene espresso solo da cellule ontologicamente immature (12) e i livelli di espressione della molecola CD34 declinano con la progressiva maturazione. Per molti anni il principale ostacolo all'identificazione morfologica della cellula staminale emopoietica è stata la difficoltà di separarla dalla sua diretta progenie. L'utilizzo dell'antigene CD34 e di altri marcatori di superficie quali, ad esempio, CD33, CD38, HLA-DR, in metodiche di separazione cellulare con immunofluorescenza o altri sistemi ha portato a notevoli progressi in questo campo. L'osservazione al microscopio ottico di preparati colorati con May-Grumwald-Giemsa ha mostrato la cellula CD34+ come elemento di medie dimensioni, dotata di ampio nucleo e di una rima citoplasmatica intensamente basofila, occasionalmente provvista di granulazioni citoplasmatiche; alcune cellule CD34+ mostrano uno o più nucleoli. Nel loro complesso, questi caratteri riflettono l'eterogeneo stato proliferativo e di sintesi proteica di questa popolazione.

L'espressione di CD34 è associata alla concomitante presenza di marcatori che possono essere classificati come marcatori linea-non-specifici (Thy1, HLA-DR, CD45RA, CD38, CD71) e come marcatori linea-specifici, comprendenti quelli della linea linfoide T (TdT, CD10, CD7, CD5, CD2), della linea linfoide B (TdT, CD10, CD19), della serie mieloide (CD33, CD13) e megacariocitaria (CD61, CD41, CD42b). L'espressione di markers linea non specifici consente alla eterogenea popolazione CD34+ di essere suddivisa in due distinte sottopopolazioni caratterizzate rispettivamente da una bassa/assente o alta espressione di Thy1, CD38, HLA-DR, CD45RA, CD71: queste due sottopopolazioni contengono progenitori emopoieticamente primitivi (cellule staminali) o progenitori orientati, rispettivamente (13, 14). In aggiunta ai marcatori immunologici convenzionalmente assegnati a specifici *cluster* di differenziazione, le cellule CD34+ esprimono recettori per numerosi fattori di crescita, come lo stem cell factor, interleuchina 3, GM-CSF, G-CSF (13,15). Nonostante tutte le cellule clonogeniche esprimano l'antigene CD34, la percentuale di cellule CD34+ con attività clonogenica oscilla tra il 10% e il 30%. Si può ipotizzare che le cellule CD34+ non clonogeniche costituiscano una popolazione non responsiva ai fattori di crescita convenzionali e che richiedano specifici ligandi (epitocyte

growth factor) in grado di attivare geni specifici della cellula staminale che le consentano di acquisire responsività ai fattori di crescita (16,17).

Caratterizzazione e funzione della molecola di superficie

Le molecole di superficie delle cellule CD34+ sono state caratterizzate dal punto di vista biochimico e sia il DNA umano che i rispettivi geni sono stati clonati e sequenziati in pochi anni (18). CD 34 corrisponde ad una glicoproteina transmembrana con un peso molecolare di 105-120 kd (18), senza omologia con altra proteina nota. La proteina contiene 354 aminoacidi, nove siti di glicosilazione in corrispondenza di un residuo di azoto e diversi punti di glicosilazione in radicali contenenti ossigeno; essa è, inoltre, molto ricca in acido sialico. Il gene per l'antigene CD34 è situato sul cromosoma 1, in stretta vicinanza con altri geni che codificano per fattori di crescita o molecole funzionali, quali CD1, CD45, TGF2, laminina.

La funzione della glicoproteina CD34 di superficie nelle cellule staminali emopoietiche è ancora oggetto di discussione; alla luce di risultati più recenti sembrerebbe giocare un ruolo rilevante nella modulazione delle cellule di adesione (19), probabilmente agendo come ligando per la L-selectina. E' stato inoltre ipotizzato un ruolo protettivo della molecola CD34 contro il danno proteolitico, grazie al suo alto numero di siti O-glicosilati.

Sottopopolazioni CD34+: analisi fenotipica e funzionale

Le popolazioni delle cellule CD34+ normali verosimilmente contiene progenitori di tutte le linee umane linfo-emopoietiche, incluse le cellule staminali capaci di ricostituire l'emopoiesi dopo un trapianto di midollo. Con la differenziazione si osserva una riduzione dei livelli dell'antigene CD34: di conseguenza, le più ancestrali cellule clonogeniche (CFU-blast, LTC-IC) esprimono i più alti livelli di CD34, mentre le cellule più differenziate (CFU-G, CFU-M, CFU-E, CFU-Meg) esprimono solo bassi livelli di CD34.

L'antigene CD34 è stato usato per identificare, isolare e classificare cellule appartenenti a differenti linee linfo-emopoietiche così come per test *in vitro* che consentano una valutazione indiretta di cellule con funzioni e capacità clonogenica diverse (20).

Precursori linfoidi

Il compartimento delle cellule CD34+ contiene tutte le cellule che esprimono l'enzima deossinucleotidiltransferasi terminale (TdT), il quale è un enzima intranucleare espresso nelle cellule linfoidi precoci che vanno incontro al riarrangiamento dei geni per le immunoglobuline o per il T-cell receptor. Studi di citofluorimetria hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule midollari TdT+ coesprimono gli antigeni CD34, CD19 e CD10 (precursori B) così come gli antigeni della differenziazione T: CD7, CD5, CD2. Una piccola

quota di cellule CD34+/TdT+ coesprime il CD 10, e potrebbe rappresentare un progenitore linfoide comune sia alla linea T che B (21); recentemente Miller et al (22) hanno riportato che le cellule CD34+ possono generare *in vitro* cellule NK.

Precursori granulocito-macrofagici

Poiché i progenitori eritroidi sono privi di uno specifico marcatore, sono di difficile individuazione: anticorpi monoclonali diretti contro la glicoforina-A riconoscono tutte le cellule dotate di emoglobina, ma questa molecola è espressa solo in una piccola quota di cellule CD34+ ed è assente nelle cellule clonogeniche(23).Alti livelli dell'antigene CD45 sono presenti sulle BFU-E, ma il passaggio allo stadio CFU-E ne determina la perdita; tuttavia , la isoforma CD45R0 è ben rappresentata sui progenitori eritroidi più precoci, mentre la isoforma CD45RA è presente sui progenitori commissionati.

L'espressione dell'antigene CD71 (recettore per la transferrina), usualmente considerato come lo specifico antigene della popolazione CD34+ eritroide, è presente ad alti livelli sui progenitori eritroidi e a livelli molto bassi su tutti gli altri progenitori (24); l'espressione dell'antigene CD71 incrementa di entità dalla cellula staminale alla BFU-E e successivamente si riduce durante la maturazione eritroide. In aggiunta a ciò, le cellule CD34+ midollari possono esprimere i recettori per interleuchina 3, GM-CSF ed eritropoietina, come conseguenza dell'azione di queste citochine sulle CFU-E.

Le cellule clonogeniche individuabili come precursori mieloidi (CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-MK) coesprimono CD34, HLA-DR, CD117 (recettore per lo stem cell factor), CD45RA, CD33 e CD13; CD15 è presente a bassi livelli sulle CFU-G, mentre CD115 (recettore per le MCFS) è specificamente espresso dalle CFU-M.

Le CFU-MK sono le uniche cellule CD34+ che esprimono le glicoproteine piastriniche identificate dagli anticorpi monoclonali CD61, CD42 e CD41 (25). Dal midollo osseo traggono origine anche le cellule dendritiche, ma le condizioni che guidano la loro crescita e la loro differenziazione sono ancora poco note: è stato recentemente riportato che le cellule CD34+ possono dare origine alle cellule dendritiche e di Langherans dopo stimolazione con GM-CSF e tumor necrosis factor- α (26).

Progenitori multipotenti e cellule staminali

Le CFU-GEMM comprendono precursori clonogenici sia della linea mieloide sia della linea eritroide ed esprimono gli antigeni CD34, HLADR, CD38, CD117 e CD45RA; inoltre esprimono in una piccola quota il CD33, m non il CD13. In un ipotetico schema di differenziazione comprendente le cellule staminali pluripotenti, il compartimento linfo-emopoietico può essere identificato *in vitro* con le CFU-blast e le LTC-IC. La mancata espressione del CD38 è la principale caratteristica di questi progenitori precoci

(identificabili) *in vitro* con le CFU-blast e le LTC-IC), che rappresentano l'1% delle cellule CD34 e meno dello 0,01% delle cellule mononucleate; l'assenza del CD38 permette la separazione dei progenitori commissionati (CD34+/CD38+) dal compartimento più ancestrale (CD34+/CD38-) con una singola combinazione di marcatori (27). Inoltre, le primissime CD34+ coesprimono bassi livelli di CD45RO e sono negative alla colorazione con rodamina fluorescente 123 a causa della presenza dell' MDR1, una proteina transmembrana che espelle dalla cellula la rodamina e verosimilmente protegge queste cellule dall'azione di farmaci tossici, e inoltre media il fenotipo della resistenza ai farmaci (28). Il ruolo dell'HLA-DR nel definire le cellule più precoci è ancora controverso: una serie di evidenze indicano che il compartimento staminale ha il fenotipo CD34+/CD38-/HLA-DR+ (14, 28), ma lavori recenti non hanno trovato l'HLA-DR sulle cellule più precoci (29); questi dati sono confermati dalla possibilità che l'espressione dell'HLA-DR possa discriminare il compartimento leucemico Ph+ (HLA-DR+) dalle cellule residue normali (HLA-DR-) nella leucemia mieloide cronica (30).

Espressione dell'antigene CD34 su cellule normali e neoplastiche

Gli anticorpi monoclonali CD34 si legano specificamente all'endotelio vascolare. La molecola CD34 ha una localizzazione ultrastrutturale sorprendente sulle cellule endoteliali: essa è concentrata principalmente sulla superficie rivolta verso il lume vascolare, in particolare su estroflessioni della membrana, molte delle quali si interdigitano con quelle delle cellule endoteliali adiacenti (31). Poiché questa regione è di cruciale importanza per l'adesione leucocitaria e il passaggio transendoteliale, è stato ipotizzato che la molecola CD34 possa essere antagonista o inibitrice della funzione adesiva dell'endotelio vascolare. Per quanto riguarda le cellule neoplastiche, la molecola CD34 è espressa da una ampia percentuale di leucemie acute (32); l'intensità di fluorescenza dell'espressione del CD34 è variabile e più elevata nelle leucemie acute linfoblastiche (LAL) che in quelle mieloidi (LAM): in questi ultimi pazienti, l'antigene CD34 è stato trovato nel 40-60% dei blasti leucemici e nella maggioranza dei casi associato con leucemie secondarie, citotipi M0, M1, M4, anomalie citogenetiche coinvolgenti i cromosomi 5 o 7, espressione della glicoproteina p170 e cattiva prognosi (32-34). Così l'antigene CD34 può essere considerato il principale fattore predittivo negativo nei pazienti con LAM, in stretta correlazione con l'intensità di espressione. Nelle LAL il CD34 è espresso mediamente nel 70% dei pazienti, in particolare in quelli con fenotipo B: in questi casi, a differenza delle LAM, la rilevanza clinica dell'espressione del CD34 è controversa; tuttavia, in accordo con i dati del Gruppo Oncologico Pediatrico (35), la sua espressione nelle LAL-B è associata ad iperdiploidia e prognosi favorevole. Infine, l'espressione di CD34 e HLA-DR può essere molto utile per discriminare tra un esiguo numero di progenitori emopoietici primitivi normali e la loro

controparte neoplastica in pazienti con leucemia mieloide cronica: è stato dimostrato che i normali progenitori cellulari sono CD34+ ed HLA-DR-, mentre le cellule neoplastiche che presentano il riarrangiamento bcr-abl ed il cromosoma Philadelphia esprimono gli antigeni HLA-DR.

METODICHE PER LA SEPARAZIONE DELLE CELLULE CD34+

Esistono diverse tecniche per la separazione delle cellule CD34+, il cui comune scopo è quello di produrre una popolazione cellulare con un ottimo grado di purificazione e vitalità, possibilmente utilizzando metodiche semplici, rapide, riproducibili e con costi contenuti. La prima tecnica di separazione utilizzata, sfruttando parametri cellulari (dimensioni e densità cellulare), è stato il gradiente di densità con Fycoll-Hypaque e Percoll. Negli ultimi tre decenni, lo sviluppo degli anticorpi monoclonali ha permesso una selezione più specifica ed accurata, utilizzando gli antigeni di superficie come target per la separazione cellulare.

Le più comuni metodiche di separazione cellulare sono:

- FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter);
- Marcatura delle cellule con anticorpi monoclonali;
- Separazione con biglie immunomagnetiche;
- Cromatografia ad alta affinità basata sulla interazione avidina-biotina.

In associazione a tali tecniche, può essere utilizzata l'espansione *in vitro* dei precursori periferici emopoietici arricchiti in CD34+, per ridurre i tempi di raccolta, il numero di prelievi di cellule emopoietiche e la dose di cellule da reinfondere per ottenere la ricostituzione emopoietica dopo trapianto di cellule staminali.

Una trattazione più approfondita dell'argomento esula dagli scopi di quest'opera.

METODICHE PER LA MOBILIZZAZIONE, LA RACCOLTA E LA CONSERVAZIONE DELLE CELLULE CD34+ DEL SANGUE PERIFERICO

Mobilizzazione e raccolta

Il midollo osseo ed il sangue periferico, oltre al sangue di cordone ombelicale, sono le uniche sorgenti di precursori emopoietici immaturi identificati come cellule CD34+. Esistono diversi approcci per la mobilizzazione delle cellule staminali periferiche: fattori di crescita, chemioterapia, chemioterapia seguita dalla somministrazione di fattori di crescita. Il meccanismo responsabile della dismissione in circolo delle cellule progenitrici emopoietiche dal midollo osseo nel sangue periferico non è stato ancora chiarito.

Al momento attuale, G-CSF e GM-CSF sono i fattori di crescita più comunemente utilizzati per scopi clinici, fin dall'inizio è stato osservato che la somministrazione di G-CSF o GM-CSF è associata ad un incremento dei progenitori emopoietici circolanti (36). In particolare, il GM-CSF somministrato a dosaggi progressivamente crescenti induceva un aumento delle CFU-GM di 18 volte, e di 8 volte la quantità dei progenitori eritroidi, riducendo anche il numero delle aferesi richieste per ottenere un numero di cellule staminali adeguato alla rapida ricostituzione dell'emopoiesi normale. Al contrario, G-CSF utilizzato a dosi variabili di 12 o 16 µg/kg/die sottocute per 4-6 giorni comportava un incremento di CFU-GM e BFU-E di 58 e 24 volte rispettivamente in confronto al valore basale (37), con una media di 3 leucoafesi; studi sulla cinetica dei progenitori emopoietici circolanti dopo stimolazione con fattori di crescita (38) hanno che il G-CSF stesso abbia la capacità di mobilizzare le cellule staminali e di espandere la loro quota nel sangue periferico, probabilmente mediante uno stimolo proliferativo sui monociti, che verrebbero indotti a produrre citochine tra cui l'interleuchina 6.

Uno studio comparativo non randomizzato in pazienti con tumori solidi trattati con regimi mieloablativi ha evidenziato la superiorità delle cellule staminali mobilizzate con G-CSF, rispetto a quelle ottenute con GM-CSF, nel migliorare il recupero ematologico, i parametri clinici ed il risparmio di risorse economiche. Sono ancora in fase di studio combinazioni di più fattori di crescita.

Anche la chemioterapia che produce moderata o severa citopenia si è dimostrata in grado di mobilizzare efficacemente cellule staminali nel sangue periferico: il maggior numero di progenitori emopoietici circolanti è stato ritrovato durante l'iniziale periodo di recupero ematologico successivo alla temporanea aplasia midollare. E' stato confermato che una mobilizzazione massiva di cellule CD34+ è spesso ottenuta quando il fattore di crescita viene somministrato dopo dosi alte o intermedie di ciclofosfamide (4-7g/m²): la chemioterapia che è in grado di indurre leucopenia è fondamentale per una ottima mobilizzazione (39,40). Parecchi altri schemi chemioterapici sono stati impiegati per la

mobilizzazione delle cellule CD34+, comprendenti etoposide, citosina arabinoside, antracicline, mitoxantrone, utilizzati singolarmente o in associazione tra loro o con ciclofosfamide (39, 41).

Più tardi è stato dimostrato che questo fenomeno può essere amplificato in modo riproducibile combinando la somministrazione di fattori emopoietici con chemioterapici ad alte dosi (39, 42). In realtà, durante il recupero emopoietico successivo alla chemioterapia ad alte dosi combinata con la somministrazione di fattori di crescita, i progenitori emopoietici sono mobilizzati nel sangue periferico in modo massivo, ma transitorio. Una tale abbondanza di cellule emopoietiche ne consente un facile riconoscimento con tecniche di separazione cellulare che facciano uso di anticorpi monoclonali anti-CD34. In condizioni ottimali, la proporzione delle cellule CD34+ può raggiungere valori pari al 20-30% dei leucociti totali, mentre, in condizioni di *steady state*, le cellule CD34+ non superano lo 0,4% della popolazione midollare totale e non sono neppure quantificabili con tecniche di separazione cellulare nel sangue periferico. La combinazione di chemioterapia e fattori di crescita non si limita ad indurre solamente un rilascio delle cellule emopoietiche immature, ma il loro numero assoluto è incrementato parecchie volte rispetto alle condizioni di base: questo consente la raccolta di un sufficiente numero di progenitori emopoietici per eseguire autotrapianti mediante poche procedure di leucoaferesi.

Tuttavia, la mobilizzazione delle cellule staminali periferiche previa chemioterapia è riservata unicamente ai pazienti indirizzati alla raccolta delle stesse per uso autologo: va da sé che tale procedura non è ipotizzabile per la raccolta di cellule staminali emopoietiche nei donatori allogenici.

Un valore di $10-20 \times 10^4$ CFU-GM/kg rappresenta la dose minima per consentire l'attecchimento, utilizzando progenitori periferici (43); infatti una quantità ben maggiore di progenitori circolanti può essere raccolta utilizzando appropriate metodiche di mobilizzazione. In condizioni ottimali il picco delle cellule CD34+ circolanti può oscillare tra 50 e 200/ μ l nel giorno di massima mobilizzazione. Solitamente, almeno 8×10^6 cellule CD34+/kg o anche più possono essere raccolte con un numero di leucoaferesi compreso tra 1 e 3(44). Il numero minimo di cellule CD34+/kg per procedere con il trapianto di midollo osseo aploidentico è pari a 10×10^6 per kilogrammo di peso corporeo del ricevente.

I protocolli di mobilizzazione e raccolta per il donatore allogenico prevedono la somministrazione giornaliera, per via sottocutanea, di fattore di crescita granulocitario (G-CSF) per 3 giorni consecutivi al dosaggio di 10-15 μ g/kg di peso corporeo. La raccolta dei progenitori emopoietici inizia nel momento in cui viene documentata la mobilizzazione dei progenitori stessi, e la procedura di leucoaferesi inizia quando il numero di cellule CD34+ nel sangue periferico è superiore ad almeno 20/ μ l. Numerosi parametri sono stati considerati come indicatori indiretti della mobilizzazione dei progenitori emopoietici, compresi la conta

leucocitaria, il numero assoluto dei monociti, dei basofili o delle piastrine (38): tuttavia la quantificazione diretta delle cellule CD34+ rimane indispensabile per una definizione accurata dell'entità della mobilizzazione (45). Il numero di cellule CD34+ presenti nel sangue periferico viene monitorato giornalmente a partire dal IV giorno di somministrazione del fattore di crescita granulocitario, ma la determinazione della presenza di cellule CD34+ circolanti non è motivo sufficiente per procedere alla raccolta con leucaferesi: per una raccolta sicura e proficua di cellule progenitrici circolanti è richiesto un numero adeguato di cellule CD34+ ($>20-50/\mu\text{l}$), di leucociti ($>1.0 \times 10^9/\text{l}$) e di piastrine ($>30 \times 10^9/\text{l}$) (44). Le procedure di leucaferesi sono realizzate utilizzando separatori cellulari a flusso continuo; una procedura di leucaferesi generalmente richiede 2-3 ore e il volume totale di sangue processato oscilla tra 6 e 10 l (44).

IL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO APLOIDENTICO

Razionale

Il trapianto di midollo osseo allogenico rappresenta, al momento attuale, la migliore terapia per alcuni pazienti selezionati (alto rischio alla diagnosi e/o resistenti) affetti da emopatie maligne, in particolare leucemie acute, leucemia mieloide cronica, linfomi e mielomi.

Purtroppo solo il 25% circa dei pazienti candidati per il trapianto di midollo allogenico ha un donatore familiare HLA identico e la probabilità di trovare un donatore compatibile nell'ambito dei registri di donatori volontari varia dal 50-60% per i caucasici a meno per le etnie minori (46-48). C'è poi il problema della ricerca che, per i pazienti con leucemia acuta diventa spesso inconciliabile con le necessità di urgenza terapeutica del paziente. Ne consegue che oltre la metà dei pazienti con emopatie maligne di fatto non dispone di un donatore compatibile nell'ambito familiare o da banca (MUD). Per contro, spesso sono disponibili familiari (genitori, fratelli, figli) incompatibili per due-tre loci che possono essere immediatamente utilizzati come donatori.

In passato, i tentativi di utilizzare, in pazienti leucemici, il midollo osseo di donatori aploidentici (2-3 loci incompatibili) sono stati non sempre soddisfacenti, a causa dell'elevata incidenza di graft versus host disease (GVHD) severa dopo infusione di midollo osseo non manipolato o di rigetti dopo infusione di cellule midollari preventivamente depletate in T-linfociti per prevenire la GVHD (49-52).

Il rigetto del midollo incompatibile T-depletato è stato per anni imputato all'inadeguatezza della immunosoppressione del paziente con i convenzionali regimi di condizionamento. Nonostante l'impiego di regimi di condizionamento più aggressivi di quelli convenzionali, il problema del rigetto del trapianto incompatibile T-depletato è comunque rimasto un ostacolo importante.

Di fondamentale importanza nel superare la barriera dell'istocompatibilità sono stati gli studi nel modello murino che hanno dimostrato che l'infusione di una elevata dose (poi chiamata megadose) di cellule midollari (anche 10 volte superiore al convenzionale) T-depletate, inoltre, prima dell'infusione, consentiva l'attecchimento con ricostituzione ematopoietica full-donor nella quasi totalità degli animali trattati (49-52). La disponibilità di fattori di crescita emopoietici e l'esperienza acquisita nel trapianto autologo con l'impiego delle cellule staminali del sangue periferico mobilizzate dopo chemioterapia ad alte dosi seguita dalla stimolazione con G-CSF hanno reso possibile, anche nell'uomo, l'infusione di megadosi di cellule emopoietiche allogeniche che avevano consentito, nell'animale, il superamento della barriera dell'istocompatibilità.

Tale "megadose" di progenitori emopoietici viene, il più delle volte, raggiunta mediante la somma delle CD34+ raccolte in selezione positiva dalle aferesi del donatore sano aggiunte

al midollo osseo espianato e reinfuso a fresco dopo la T-deplezione eseguita in selezione negativa. Esiste però anche la possibilità, nel caso di riceventi con peso modesto, di potere ottenere un attecchimento persistente con una dose elevata di cellule a provenienza solo midollare. Numerosi studi, che analizzeremo nel dettaglio, sono stati eseguiti negli ultimi 20 anni, dapprima nel modello murino e poi nell'uomo. Di seguito verranno analizzati i principali studi riportati in letteratura, ed un accento particolare verrà posto sull'esperienza pionieristica del gruppo del Prof. Martelli di Perugia.

Risultati in letteratura

Come accennato sopra, la maggior parte dei pazienti che possono beneficiare di un trapianto da donatore allogenico, ma che non hanno un donatore compatibile, dispongono almeno di un potenziale donatore tra i familiari HLA aploidentici incompatibili per tre loci. Simili coppie donatori-riceventi sono usualmente incompatibili in ambedue le direzioni "host versus graft" e "graft versus host". Queste alloreazioni sono in gran parte mediate in vivo dai linfociti T, ma anche l'alloreattività delle cellule Natural Killer (NK) può avere un ruolo nell'esito clinico dei trapianti incompatibili per un intero aplotipo (49). In particolare, nel contesto di un trapianto incompatibile per tre loci, le cellule NK del donatore e/o del ricevente possono essere responsabili di tre situazioni:

1. un potenziale effetto "graft versus host" quando il ricevente non esprime gli alleli MHC riconoscibili dai recettori inibitori (KIR) delle cellule NK del donatore;
2. un potenziale effetto "host versus graft" mediato dalle cellule NK, quando il donatore non esprime gli alleli MHC riconoscibili dai KIR delle cellule NK del ricevente;
3. nessuna alloreattività NK quando gli alleli mismatched del donatore e del ricevente sono riconosciuti dai KIR sia del donatore che del ricevente.

Nel corso degli anni '80, tutti i tentativi clinici di effettuare trapianti da donatore incompatibile per tre loci dettero esito negativo a causa dell'elevatissima incidenza di GvHD severa nei trapianti non manipolati (T-repleti) (50,51) e, per converso, di rigetto dei trapianti il cui inoculo era stato sottoposto ex vivo ad intensa T deplezione (52,53). Attorno alla fine degli anni '80, risultava evidente che, nei modelli sperimentali, il trapianto incompatibile T depleto poteva essere effettuato con successo, attraverso opportune modificazioni del regime di condizionamento e/o della composizione dell'inoculo.

Ad esempio, si dimostrò che la risposta del sistema immunologico residuo dell'ospite era superabile tramite l'impiego, accanto alla TBI, di agenti anti cellule T a bassa tossicità extramidollare, quali l'ATG, gli anticorpi monoclonali anti-T (54) e la Fludarabina (55). L'attecchimento di un trapianto T depleto incompatibile poteva, poi, essere migliorato aggiungendo alla TBI farmaci mieloablativi come il Busulfano, il Dimetilmyleran (56) e il Tiotepa (57).

Per quanto riguarda la composizione dell'inoculo e' merito precipuo di Yair Reisner l'aver dimostrato nel modello sperimentale murino che l'impiego di megadosi di cellule staminali incompatibili T-depletate consentiva di ottenere l'attecchimento nella maggior parte dei riceventi anche in condizioni sperimentali particolarmente difficili, ad esempio in topi presensibilizzati con linfociti del donatore, o in animali il cui sistema immune era parzialmente ricostituito prima del trapianto tramite l'aggiunta di un certo numero di timociti maturi dell'ospite (58) e infine in topi irradiati con dosi subletali (6.5 Gy) in cui un numero rilevante di T linfociti sopravviveva dopo l'irradiazione (59).

Nel 1993, il gruppo di Perugia, sulla base delle conoscenze derivanti dai modelli sperimentali, ha disegnato un regime di condizionamento in cui, successivamente all'irradiazione corporea totale (8 Gy in un'unica frazione ad alto dose rate), venivano impiegati Tiotepa (10 mg/Kg), Ciclofosfamide (60 mg/Kg/die per due giorni), ATG (5 mg/die per 5 giorni) con lo scopo di potenziare l'effetto mieloablativo e immunosoppressivo (60). Inoltre, poiché nei modelli sperimentali una dose elevata di cellule staminali si era rivelata come uno dei fattori più importanti nel promuovere l'attecchimento di un trapianto incompatibile T-depleto, venne impiegato un inoculo contenente un elevatissimo numero di cellule CD34+ (circa 10×10^6 /Kg). Per raggiungere questo livello, furono impiegati, accanto al midollo osseo, progenitori ematici circolanti raccolti dal sangue periferico dopo stimolo con G-CSF. Sia il midollo osseo che le cellule mononucleate periferiche erano depletate dei T-linfociti con la metodica della E rosettazione e agglutinazione con la lectina soybean. L'inoculo conteneva in media un quantitativo di cellule CD3+ pari a 2×10^5 /Kg di ricevente. Questo primo studio pilota, effettuato tra il 1993 e il 1995, comprendeva 36 pazienti affetti da Leucemia Acuta Mieloide (LAM) e Linfoide (LAL), con età mediana di 23 anni. La stragrande maggioranza dei casi era ad alto rischio, o per recidiva leucemica post-trapianto o per mortalità trapianto-relata. L'ottanta per cento dei pazienti raggiunse un attecchimento primario e stabile. Nonostante che non fosse impiegata alcuna terapia immunosoppressiva post trapianto, l'incidenza della GvHD (20%) era molto ridotta a confronto di un trapianto incompatibile non manipolato. Un importante punto da sottolineare è che in un precedente gruppo di pazienti sottoposti allo stesso regime di condizionamento, ma che erano stati infusi con una dose convenzionale di cellule staminali midollari incompatibili T-depletate, si verificò il rigetto in tutti i riceventi (dati non pubblicati).

In sintesi, questo studio pionieristico condotto dal gruppo del Prof. Martelli di Perugia dimostrò per la prima volta che nell'uomo, come nel topo, una megadose di inoculo rappresenta un fattore cruciale nel consentire il superamento della barriera di istocompatibilità.

Negli anni successivi, sempre lo stesso gruppo di scienziati perugini ha tentato di ridurre la tossicità extra-ematologica del regime di condizionamento, sostituendo la Ciclofosfamide

con la Fludarabina, nella dose di 40 mg/m²/die per 5 giorni. L'impiego della Fludarabina fa seguito a studi nel modello murino in cui fu dimostrato che Fludarabina + TBI determinava un'azione immunosoppressiva analoga a quella della Ciclofosfamide + TBI (55).

Allo scopo di eliminare completamente la GvHD, si decise di ridurre il numero dei T-linfociti nell'inoculo midollare a 3 x10⁴/Kg, quantitativo inferiore di un log a quello utilizzato nello studio pilota precedente (2 x 10⁵/Kg). Per la T-deplezione ex vivo delle cellule mononucleate del sangue periferico venne impiegata la E-rosettazione seguita da immunoselezione delle cellule CD34+, con il sistema Ceprate.

Il secondo studio pilota, condotto sempre dall'Equipe di Perugia tra il 1995 e il 1997, comprendeva 43 pazienti con età media di 22 anni, affetti da LAM e LAL, la maggior parte dei quali ad alto rischio per mortalità trapianto-relata e per recidiva leucemica. Otto dei 43 pazienti avevano recidivato dopo un trapianto autologo (61).

Per quanto concerne l'inoculo, in 28 pazienti furono infusi sia il midollo osseo che i progenitori circolanti: l'inoculo finale conteneva una mediana di 10 milioni di cellule CD34+ e di 3.5 x10⁴ cellule CD3+/Kg. Quindici pazienti ricevettero solo progenitori da sangue periferico con una composizione dell'inoculo affatto simile in termini di cellule CD34+ e CD3+.

La stragrande maggioranza (95%) dei pazienti raggiunse un attecchimento primario e stabile, con una ricostituzione emopoietica molto veloce sia in termini di granulociti neutrofili che di piastrine. Un'analisi in PCR del DNA polimorfismo evidenziò un completo chimerismo del donatore nel sangue periferico e nel midollo osseo di tutti i pazienti. In due casi di rigetto un trattamento immunosoppressivo addizionale con Ciclofosfamide e ATG, seguito da un trapianto T-depleto da un differente membro della famiglia, consentì di ottenere un attecchimento stabile. Nessun caso di GvHD sia acuta che cronica complicò il decorso di questi trapianti da donatori incompatibili per tre loci, nonostante che non venisse praticata alcuna terapia immunosoppressiva post trapianto. Infine la tossicità extraematologica del regime di condizionamento si rivelò oltremodo modesta (nessun caso di VOD; 5% di incidenza di mucosite severa e di distress respiratorio acuto), ove si consideri che la stragrande maggioranza dei pazienti era stata pesantemente pre-trattata.

In sintesi questi risultati testimoniano del pieno raggiungimento di tutti gli obiettivi originari dello studio:

- a. alta incidenza di attecchimenti in pazienti trattati con un regime di condizionamento a bassa tossicità extraematologica;
- b. completa prevenzione della GvHD in pazienti che non erano stati sottoposti ad alcuna profilassi immunosoppressiva post trapianto.

Diciotto pazienti furono trapiantati solo con cellule staminali da sangue periferico. A paragone dei soggetti che avevano ricevuto midollo osseo e cellule staminali periferiche,

sia l'incidenza di attecchimento che la velocità di ricostituzione emopoietica rimasero invariate, il che indica come l'aggiunta di midollo osseo alle cellule staminali periferiche non sia essenziale per l'attecchimento.

Un'altra riflessione emergente da questi dati fu che cellule CD34 positive altamente purificate, quando somministrate a dosi estremamente elevate e senza l'ausilio di altre cellule facilitanti, contribuiscono a promuovere il loro stesso attecchimento. In seguito a questa ipotesi, e a riprova di questo concetto, Yair Reisner e coll. hanno dimostrato che cellule umane CD34+ purificate con la stessa metodologia impiegata nel setting clinico determinano in una cultura mista linfocitaria una riduzione specifica della frequenza di precursori citolitici diretti contro i loro antigeni di istocompatibilità, ma non contro cellule stimolatorie di una terza parte (62). In altri termini, le cellule CD34+ sono in grado di indurre una tolleranza specifica, come altre cellule veto o facilitanti. Una possibile spiegazione per questo effetto veto può essere costituita dal loro peculiare fenotipo che presenta antigeni MHC di classe I e II, in assenza delle molecole di costimolazione B7, il che renderebbe le cellule T anergiche alle molecole MHC di classe I e II.

Un altro aspetto degno di menzione è che i fattori che hanno condizionato l'alta percentuale di attecchimento, in assenza di GvHD, vale a dire il regime di condizionamento ed i numeri di cellule CD34+ e CD3+ nell'inoculo, sono tra loro strettamente legati, nel senso che variazioni nell'uno implicano di conseguenza anche variazioni negli altri. Un esempio di ciò può essere rappresentato dal recente studio clinico condotto da R. Handgretinger e coll. in Germania. In bambini affetti da Leucemia Acuta, trapiantati da donatori aploidentici, furono riportati un'alta incidenza di attecchimenti e nessun caso di GvHD (62). Il regime di condizionamento, basato esclusivamente sulla chemioterapia (Tiotepa, Busulfano, Ciclofosfamide e ATG) e' sicuramente meno immunosoppressivo di un condizionamento quale quello utilizzato dal gruppo di Perugia e caratterizzato dalla presenza di TBI in unica frazione ad alto dose rate. D'altro canto, l'inoculo conteneva circa il doppio di cellule CD34+ (20 milioni/Kg contro 10 milioni/Kg) di quanto utilizzato nello studio condotto da Aversa et al, poichè i pazienti della casistica tedesca, essendo bambini, avevano un basso peso corporeo.

Un altro esempio può essere costituito dal numero di T-linfociti nell'inoculo che rappresenta la dose soglia per la GvHD. Nella esperienza perugina l'impiego di un quantitativo di T-linfociti pari a 3×10^4 /Kg non e' stato seguito da nessun caso di GvHD. Si deve però sottolineare la presenza dell'ATG nel regime di condizionamento. Poiché l'emivita plasmatica dell'ATG e' di sei giorni, il farmaco può aver contribuito a ridurre l'incidenza della GvHD, esercitando un'azione di deplezione in vivo dei T-linfociti presenti nell'inoculo midollare.

E' ampiamente noto come i problemi maggiori della T-deplezione siano rappresentati dall'aumentata incidenza di recidive leucemiche post-trapianto, (dovuta alla mancanza di un effetto GvL, GvHD-relato) e dal deficit immunologico post-trapianto con relativa aumentata incidenza di infezioni.

Nello studio del gruppo di Perugia, la maggior parte delle recidive sono state osservate nei pazienti con LAL, particolarmente in quelli in recidiva, al momento del trapianto, fenomeno questo più che atteso in un simile gruppo di soggetti ad alto rischio. Per contro, nei 32 pazienti con LAM trapiantati nel corso del primo e del secondo studio, tra il 1993 e il 1997, la probabilità a sei anni di recidiva leucemica fu del 22%, un valore molto basso ove si consideri che circa la metà dei pazienti erano in recidiva al momento del trapianto, la maggior parte dei quali in recidiva chemioresistente. Questi dati indicano un effetto GvL specifico nei riguardi della LAM.

Recentemente, Andrea Velardi e Loredana Ruggeri, sempre a Perugia, hanno suggerito che l'alloreattività NK possa avere un ruolo nell'azione GvL (49). Come già sottolineato, in molte coppie donatore-ricevente i recettori inibitori (KIR) per l'MHC delle cellule NK del donatore non riconoscono come self gli alleli di classe I del ricevente. Di conseguenza le cellule NK del donatore sono capaci di lisare le cellule linfemopoietiche del ricevente. In questi casi si è dimostrato che la ricostituzione del repertorio NK nel ricevente - per almeno 3-4 mesi dopo il trapianto - è caratterizzata dalla presenza di un quantitativo significativo di cloni NK alloreattivi nei riguardi del paziente. Questi cloni sono in grado di lisare in maniera molto efficace cellule di LAM e di LMC prelevate dai pazienti e criopreservate prima del trapianto. Per contro l'azione litica non si esplica nei riguardi delle cellule della più parte dei casi di LAL. I livelli di espressione di LFA-1 -una molecola di adesione essenziale per la formazione del coniugato cellula effettrice -cellula target e per l'attivazione delle cellule effettrici - sembrano indicare il grado di suscettibilità alla lisi NK (alta espressione nelle cellule sensibili della LAM e della LMC, bassa espressione nella maggior parte dei pazienti con LAL). A riprova di questa ipotesi, va sottolineato come sino al momento attuale non si sia osservata alcuna recidiva nei pazienti con LAM o con LMC trapiantati da donatori potenzialmente NK alloreattivi. I cloni alloreattivi NK lisano con la stessa efficienza anche le cellule linfemopoietiche normali (linfociti stimolati con PHA, linee linfoblastoidi B) del ricevente, criopreservate prima del trapianto, per cui è ipotizzabile che l'alloreattività NK abbia un ruolo anche nella prevenzione del rigetto, contribuendo ad eliminare il sistema immune residuo dopo il condizionamento.

Nessuno dei pazienti sviluppò segni clinici di GvHD acuta o cronica, pur presentando in circolo un significativo numero di cellule NK alloreattive. Questa osservazione non deve destare sorpresa poiché lo stesso fenomeno, seppur in senso opposto, è stato descritto nel cosiddetto modello murino di resistenza ibrida, dove le cellule NK di un ricevente F1 sono

in grado di rigettare il trapianto di midollo osseo dei genitori, ma non trapianti di cute o altri organi (63).

Il maggior problema clinico, nei pazienti adulti, ma non nei bambini, è rappresentato dalla lentezza con cui avviene il ripristino di un'efficiente immunità contro virus, batteri e funghi, dovuta ad un ritardo nella ricostituzione del sistema T-immune.

Nonostante una profilassi antivirale e antifungina, il 71% delle morti non-leucemiche (quindi il 70% della mortalità trapianto-relata che è pari al 49%) è dovuto ad infezioni batteriche e fungine. Questa incidenza di infezioni fatali può sembrare alta, ma è necessario prendere in considerazione che la maggior parte dei pazienti dello studio del gruppo di Perugia aveva una lunga storia di malattia ed era stata pesantemente pre-trattata, con conseguente alta incidenza di colonizzazioni batteriche e fungine prima del trapianto. Ad esempio, vi è una differenza notevole nell'incidenza di infezioni letali tra pazienti con pregresse storie di severe infezioni batteriche e/o fungine prima del trapianto e pazienti a minor rischio : nei pazienti non colonizzati la mortalità dovuta ad infezioni era pari al 13%.

Inoltre, va posto l'accento sul fatto che questa relativa immuno-incompetenza non sia una caratteristica unica dei trapianti incompatibili per tre loci. Ad esempio, simili condizioni di immunodeficienza e gli stessi tipi (e incidenza) di infezioni sono stati del tutto recentemente riportati in soggetti adulti che avevano ricevuto un trapianto di midollo osseo T-depleto da donatori HLA-compatibili non correlati geneticamente (64). Comunque, analoghi problemi contraddistinguono il decorso di pazienti con GvHD sottoposti a trapianto convenzionale (T-repleto) da donatori non correlati. E' ampiamente noto che, nei primi 6-8 mesi dopo il trapianto, la ripopolazione T linfoide di un paziente adulto è essenzialmente sostenuta dall'espansione di T-linfociti maturi del donatore presenti nell'inoculo midollare. Anche nei trapianti convenzionali compatibili, il repertorio delle cellule T rimane piu' o meno severamente compromesso sino all'avvento di cellule CD4+, CD45RA+RO- che verosimilmente rappresentano il prodotto della maturazione intra-timica. E' ovvio che nei trapianti intensamente T-depletati, come quelli che forzatamente devono essere effettuati nel caso di donatori incompatibili, il ritardo della ricostituzione dei livelli e delle funzioni dei linfociti T è ancora più accentuato.

L'ostacolo potrebbe essere superato trasferendo, dopo il trapianto, cellule T mature del donatore, previa deplezione ex vivo delle cellule T alloreattive. Questi linfociti T non alloreattivi possono essere diretti contro specifiche sorgenti di infezione (ad esempio Candida, Aspergillo, Cytomegalovirus e Toxoplasma). Al momento attuale, il recupero delle funzioni immunitarie appare tuttavia più rapido di quanto pubblicato da Aversa e collaboratori nel 1998. Vari fattori potrebbero aver contribuito a tale fenomeno: in particolare, con il sistema di purificazione delle cellule staminali esprimenti l'antigene CD 34 Miltenyi è possibile trapiantare un numero maggiore di cellule CD34+ (e,

verosimilmente, anche più funzionali data la relativa rapidità della procedura di purificazione). A questo riguardo, è stato proposto come l'infusione di alti numeri di cellule CD34+ possa promuovere un più rapido recupero di cellule T (62).

Un altro aspetto interessante è che, dato che è stato dimostrato (Roncarolo MG et al, dati non pubblicati) che il G-CSF induce la produzione, da parte delle cellule presentanti l'antigene, della citochina immunosoppressiva IL10, che è in grado a sua volta di impedire la presentazione antigenica e l'attivazione delle risposte immuni, il G-CSF non viene più somministrato ai pazienti dopo la reinfusione delle cellule CD34 aploidentiche altamente purificate, se non su reale necessità clinica, il che, del resto, non sembra aver prodotto conseguenze negative nell'attecchimento, come dimostrato da Aversa e collaboratori. Gli effetti immunoregolatori connessi a tale decisione terapeutica sono attualmente in fase di studio. Infine, mentre è possibile che vari fattori ne siano responsabili, una chiara indicazione di un più rapido ed efficace recupero delle funzioni immuni post-trapianto è fornita anche dal fatto che le complicanze infettive sono, al momento attuale, in diminuzione.

Nonostante i problemi sovraesposti, nei 32 pazienti affetti da LAM, trapiantati tra il 1993 e il 1997 a Perugia, si è osservata una probabilità di sopravvivenza libera da eventi a sei anni pari al 33%. Ove si consideri che 14 dei 32 soggetti erano in recidiva al momento del trapianto, è evidente come simili risultati non potrebbero essere raggiunti da nessun'altra forma di trattamento ora disponibile. La probabilità di sopravvivenza dei pazienti con LAL è inferiore, essenzialmente per una più elevata incidenza di recidiva, caratteristica di questi pazienti adulti ad altissimo rischio. In conclusione, i risultati in termini di mortalità da trapianto e di sopravvivenza libera da eventi non appaiono dissimili da quelli riportati in pazienti affetti da Leucosi Acuta, in analogo stato di malattia, sottoposti a trapianto convenzionale (o T- depletato) da donatori geneticamente non correlati. Pertanto il trapianto da donatore familiare aploidentico incompatibile per tre loci deve essere oramai considerato una realtà clinica, da impiegare nel trattamento della maggior parte dei pazienti con patologie oncoematologiche ad alto rischio di recidiva, che non dispongono di un donatore compatibile o che necessitano di un trapianto urgente. Per contro, questa strategia non può essere raccomandata nei pazienti con una storia clinica recente di severe infezioni batteriche e/o fungine. Infine, la possibilità di prevenire pressoché totalmente due importanti complicanze quali la GvHD e il rigetto rappresenta un'importante tappa per future applicazioni del trapianto da familiare incompatibile in pazienti di età avanzata affetti da patologie oncoematologiche e nel trattamento di affezioni ematologiche non neoplastiche.

Disegno dello studio

Il presente studio è monocentrico, prospettico di fase II.

L'obiettivo primario del presente studio è stato quello di valutare l'applicabilità clinica e la tollerabilità (a seguito di positive esperienze preliminari in casi compassionevoli già eseguiti presso il nostro Centro) del trapianto di cellule staminali aploidentiche altamente purificate in base all'espressione dell'antigene di superficie CD 34 in pazienti affetti da emopatie maligne recidivate o resistenti ad almeno due linee terapeutiche di chemioterapia convenzionale per i quali non era stato possibile un donatore HLA identico familiare o non correlato.

I **criteri di inclusione** erano i seguenti:

- Età compresa tra 1 e 70 anni.
- Non disponibilità nell'ambito familiare di fratelli HLA identici.
- Non disponibilità di donatori MUD.
- Diagnosi di emopatia maligna (leucemia mieloblastica acuta, leucemia linfoblastica acuta, leucemia mieloide cronica, leucemia linfatica cronica, linfoma non Hodgkin, linfoma di Hodgkin, mieloma multiplo e mielodisplasie recidivate o resistenti ad almeno due linee terapeutiche di chemioterapia convenzionale.
- PS (WHO) < 2 all'ingresso nello studio.
- Consenso informato scritto.

I **criteri di esclusione** erano i seguenti:

- Patologie cardiache significative.
- Funzionalità epatica alterata (transaminasi e bilirubina > a 3 volte alla norma) non correlata alla patologia di base.
- Funzionalità renale alterata (creatinina > 2) non correlata alla patologia di base.
- Infezioni opportunistiche in atto.
- HIV positività.
- Gravidanza.
- Mancato consenso informato scritto.

Il disegno dello studio prevedeva i seguenti passaggi:

A) Preparazione del donatore sano

Il donatore sano doveva eseguire visita ematologica, esami ematochimici di legge, test di conferma, diagnostica per immagini (Rx torace, ECG, e quanti altri accertamenti si rendessero necessari dalla raccolta accurata dell'anamnesi), consulenza anestesiologicala,

visita c/o Centro Trasfusionale sia per conferma idoneità all'afèresi sia per il predeposito di emazie concentrate autologhe da reinfondere il giorno dell'espianto di midollo osseo eseguito mediante prelievi multipli.

Il donatore doveva effettuare il colloquio per raccolta del consenso informato scritto riguardante sia il donatore, sia il ricevente. per il donatore, in particolare, era prevista firma del consenso alla donazione di PBSC e del consenso all'espianto di midollo osseo.

La conta delle CD34+ dal sangue periferico del donatore sano veniva effettuata dal quarto giorno di stimolazione con G-CSF al dosaggio di 10 microgrammi/Kg, suddiviso in due somministrazioni giornaliere.

Il candidato alla donazione era inviato a raccolta aferetica quando la valutazione del numero delle cellule staminali emopoietiche CD 34+ nel sangue periferico risultava superiore o uguale a 20 cellule CD34+/ μ l.

B) Preparazione del prodotto aferetico

La raccolta di cellule staminali emopoietiche mobilizzate nel sangue periferico veniva eseguita giornalmente mediante leucoafèresi con processazione di 6-10 litri di sangue fino al raggiungimento di una dose target di 15×10^6 CD34+/Kg in totale o di una dose minima di 10×10^6 CD34+/Kg.

Il prodotto leucaferetico veniva inviato dal Centro Trasfusionale al laboratorio Ematologia per la processazione su colonna ad alta affinità, effettuata mediante selezione positiva di cellule CD34+ utilizzando il sistema CliniMACS; le cellule CD34+ venivano poi criopreservate e, a seguito, reinfuse assieme al midollo espantato a fresco.

C) Raccolta del midollo osseo

Tutti i pazienti hanno eseguito, prima di sottoporsi al trapianto aploidentico, raccolta di midollo osseo autologo di back-up mediante prelievi multipli di midollo osseo dalle creste iliache postero-superiori in regime di anestesia epidurale, in modo da avere a disposizione un numero di cellule CD34+ autologhe non inferiore a 1×10^6 /kg, da reinfondere in caso di mancato engraftment al +30 dal trapianto aploidentico.

Le cellule staminali midollari del paziente e le cellule staminali periferiche da afèresi ottenute dal donatore dopo manipolazione venivano poi addizionate lentamente e in bagno freddo con plasma omogruppo miscelato con dimetilsolfossido (DMSO) al 10% rispetto al volume finale, con aggiunta di 1000 U di eparina per ogni raccolta aferetica di cellule staminali periferiche. Le sospensioni cellulari, aliquotate in fiale o sacche apposite per criopreservazione, venivano poi congelate con un programma ideale di discesa della temperatura e conservate in azoto liquido a -196 °C. Lo scongelamento veniva eseguito rapidamente con immersione del prodotto in bagnomaria a 37 °C e il midollo osseo era

infuso al paziente attraverso catetere venoso periferico mediante set dotato di filtro. Una piccola aliquota veniva utilizzata per i saggi microbiologici e clonogenici e per la valutazione della vitalità.

D) Preparazione del midollo espianato ed infuso a fresco e DLI

Il giorno del prelievo multiplo del midollo del donatore sano (corrispondente al giorno della reinfusione al paziente) il midollo osseo, dopo la raccolta, veniva inviato al laboratorio di ematologia ove veniva eseguita la selezione negativa dopo incubazione con anticorpo anti CD3. Una piccola quota di T linfociti veniva mantenuta nell' inoculo in modo da non perdere completamente il potenziale effetto GVL espletato dai linfociti T alloreattivi del donatore.

Criteri di valutazione ematologici e statistici

La condizione di remissione completa, per i pazienti affetti da leucemia acuta mieloide o linfoide o da leucemia mieloide cronica in crisi blastica, è definita secondo i criteri convenzionalmente in uso (66):

- il midollo osseo normocellulare deve contenere una quota pari o inferiore al 5% di cellule blastiche;
- il sangue periferico non deve mostrare elementi blastici ed i suoi componenti cellulari devono essere nei limiti della norma;
- non devono essere presenti infiltrati di cellule leucemiche né a livello cutaneo, né in altre sedi;
- sia il midollo osseo che il sangue devono mantenersi nella norma per almeno un mese.

La remissione parziale è caratterizzata da un midollo osseo contenente dal 5 al 25% di cellule blastiche e da una situazione periferica normale. Una remissione completa di durata inferiore ad un mese deve essere considerata come una remissione parziale.

La resistenza è caratterizzata da una quota di blasti midollari superiore al 25%, e ridotta di meno del 50% dalla fase pre-terapia, ancora presente tre settimane dopo il termine dell'induzione.

La ricaduta è definita come un incremento di blasti midollari superiore al 10%, in due aspirati midollari successivi, distanziati almeno di 15 giorni.

I dati di sopravvivenza globale e libera da malattia sono stati calcolati con il metodo di Kaplan-Meier (67); il confronto tra le curve di sopravvivenza libera da malattia è stato condotto con il log-rank test di Peto et al (68). L'analisi è stata eseguita nel gennaio 2008 utilizzando *BMDP Statistical Software 1990 Edition*.

Regimi di consolidamento e terapia di supporto

Il condizionamento era costituito da un condizionamento classico (gold standard) a base di busulfano e ciclofosfamide: questa associazione è la più usata in assoluto nei trapianti di midollo osseo. Considerate le caratteristiche dei pazienti, affetti da malattia altamente resistente, il condizionamento veniva potenziato sia sul versante antineoplastico, che sul versante immunosoppressivo.

Lo schema prevedeva l'infusione in associazione di fludarabina 30 mg/kg/die (dal giorno -15 al giorno -11); busulfano 14 mg/kg (3,5 mg/kg/die dal giorno -10 al giorno -7); thiotepa 10 mg/kg al giorno -6; ciclofosfamide 160 mg/kg (40 mg/kg/die dal giorno -5 al giorno -2). Le dosi dei farmaci (ciclofosfamide, busulfano e fludarabina) potevano essere adeguatamente ridotte in base alle condizioni cliniche del paziente, all'età, ai carichi terapeutici precedenti. Per la profilassi della malattia da trapianto contro l'ospite è stata somministrata timoglobulina antilinfocitaria (ATG) di coniglio (Thymoglobuline) al dosaggio complessivo di 12.5 mg/kg (2,5 mg/kg/die dal giorno -8 al giorno -3), short course metotrexate (+1, +3 e +11), cortisone e ciclosporina inizialmente a 3 mg/kg/die con tapering precoce dal +60.

I pazienti ricevevano la terapia di condizionamento previo posizionamento di catetere venoso centrale in vena succlavia o giugulare con punta in atrio destro. L'infusione delle cellule staminali emopoietiche aploidentiche periferiche e midollari avveniva al giorno 0. Inoltre, piccole infusioni di midollo del donatore, a dosaggi crescenti (DLI), venivano effettuate a partire, in base alle condizioni cliniche post-trapianto, da 30-45 giorni dopo il trapianto fino ai 4 mesi dopo il trapianto, per favorire l'effetto Graft versus Leukemia.

Tutti i pazienti sono stati ricoverati in camera singola a pressione positiva senza flusso di aria laminare e alimentati dapprima per con nutrizione parenterale totale e poi con cibi cotti fino al giorno della dimissione ospedaliera. I pazienti sono inoltre stati posti in regime di isolamento preventivo dal giorno 0 fino ad avvenuto attecchimento.

I pazienti hanno ricevuto una profilassi antimicrobica consistente di nistatina, ciprofloxacina (500 mg x2/die) e fluconazolo (200 mg/die) somministrati dapprima *per os* e poi per via endovenosa. In caso di febbre superiore a 38,5 °C in corso di neutropenia severa, è stata prontamente attuata terapia antibiotica ad ampio spettro con l'aggiunta, in caso di febbre persistente, di Amfotericina B liposomiale. È stato eseguito un monitoraggio giornaliero dei parametri ematologici e bisettimanale dei parametri biochimici. L'emoglobina è stata mantenuta a valori superiori a 8 g/dl con unità di globuli rossi concentrati omogruppo (gruppo del ricevente fino ad attecchimento avvenuto, poi gruppo del donatore in caso di trapianto AB0 incompatibile), e le piastrine sono state mantenute a valori superiori a $20 \times 10^9/l$ con concentrati piastrinici o aferesi da singolo donatore, sottoposte a filtrazione ed irradiazione con ^{60}Co 2000 cGy. In casi di mucosite severa (grado WHO ≤ 3), i pazienti

sono stati alimentati con nutrizione parenterale totale fino alla risoluzione del problema. Non sono stati somministrati fattori di crescita emopoietici. Come profilassi della polmonite *Pneumocystis carinii* (PCP) è stato somministrato cotrimossazolo (960 mg due volte al giorno, due o tre volte a settimana) dal giorno +28. La profilassi della PCP è stata effettuata routinariamente per 6–12 mesi per tutti i pazienti, ed è stata proseguita anche più a lungo nei pazienti affetti da GVHD cronica.

Per la profilassi dell'infezione da cytomegalovirus in pazienti con donatore e/o ricevente sieropositivi per il cytomegalovirus è stato eseguito Ganciclovir 10mg/kg/die dal giorno -10 al giorno -2, nessuna terapia dal -1 al +10, e Foscavir 30 mg/kg due volte a settimana dal +11 al +100.

RISULTATI

Caratteristiche dei pazienti

Le caratteristiche dei pazienti sono riportate nella tabella 1.

In breve, sono stati arruolati nel periodo compreso tra il 1 gennaio 2005 ed il 31 dicembre 2006 dieci pazienti affetti da leucemia acuta mieloide (6 pazienti), da leucemia acuta linfoblastica (3 pazienti) o da leucemia mieloide cronica in crisi blastica linfoide (1 paziente). Tutti i pazienti suddetti erano in condizione di malattia resistente ad almeno 2 cicli di chemioterapia o recidivata dopo chemioterapia convenzionale. L'età mediana dei pazienti era di 19 anni, con un range compreso tra 5 e 60 anni. Le caratteristiche citogenetiche e lo stato di malattia all'arruolamento sono riportati in tabella 1.

Gli schemi di polichemioterapia utilizzati per riportare i pazienti in remissione parziale o completa prima del trapianto sono stati i seguenti: FLAIE (fludarabina, citosina arabinoside, idarubicina, etoposide); FLAN (fludarabina, citosina arabinoside, novantrone); Mylotarg (Gentuzumab ozogamicina) + citosina arabinoside; Memorial (idarubicina ad alta dose, citosina arabinoside); FLANG (fludarabina, citosina arabinoside, novantrone, G-CSF); LAL rescue (idarubicina, citosina arabinoside).

Lo status dei pazienti prima di iniziare la chemioterapia di condizionamento al trapianto era il seguente: 1 paziente affetto da LAM si presentava in aplasia midollare dopo terapia di III linea, senza aver mai ottenuto la remissione completa; 2 pazienti affetti da LAM hanno iniziato la terapia di condizionamento al trapianto con malattia attiva; 2 pazienti affetti da LAM hanno iniziato la terapia di condizionamento al trapianto in II remissione completa; 1 paziente affetto da LAM ha iniziato la terapia di condizionamento al trapianto in IV remissione completa; 1 paziente affetto da LMC in crisi blastica linfoide ha iniziato la terapia di condizionamento al trapianto in II fase cronica; 1 paziente affetto da LAL ha iniziato la terapia di condizionamento al trapianto in II recidiva precoce; 2 pazienti affetti da LAL hanno iniziato la terapia di condizionamento al trapianto con malattia attiva.

Pertanto, al momento dell'inizio della terapia di condizionamento, soltanto 3/10 pazienti erano in una condizione remissione completa successiva alla prima, configurando una popolazione di pazienti ad altissimo rischio di recidiva con altissimo rischio di mortalità peri e post-trapiantologica.

Prima del trapianto è stata effettuata la valutazione dello status del CMV nelle coppie di pazienti donatore/ricevente. In 3/10 coppie sia il donatore che il ricevente risultavano sieropositivi, in 6/10 o il ricevente o il donatore risultavano sieropositivi, mentre in 1/10 sia il ricevente che il donatore risultavano sieronegativi.

Tossicità correlata alla terapia sovramassimale

La tossicità extra-ematologica di questo regime di condizionamento è stata minima anche in questi pazienti in stadio avanzato e già pesantemente trattati. Non ci sono stati casi di VOD epatica e solo il 25% dei pazienti ha sviluppato una mucosite severa del cavo orale. Un paziente è deceduto per insufficienza multiorgano acuta su base tossica, dopo che il midollo del ricevente aveva attecchito. Un paziente è deceduto per causa infettiva durante il periodo di aplasia midollare post-chemioterapia.

Attecchimento e ricostituzione ematologica

I pazienti hanno reinfuso una megadose di cellule CD34⁺ mediana pari a $12.8 \times 10^6/\text{kg}$ (range 11.23- 18.34) ed un numero mediano di cellule CD3⁺ pari a $1.8 \times 10^3/\text{kg}$ (range 1.2-2.5). Otto pazienti sono valutabili per l'attecchimento; per questi pazienti il tempo mediano a 500 PMN/mm³, a $20 \times 10^9/\text{l}$ e a $50 \times 10^9/\text{l}$ piastrine è stato rispettivamente di 17,20 e 21giorni. Due pazienti non sono valutabili a causa di rigetto (1/3) o morte precoce durante l'aplasia midollare (1/3). Tale dato è sovrapponibile a quelli riportati in letteratura (59-63).

Malattia da trapianto contro l'ospite (GvHD) acuta e cronica

Quattro pazienti su 8 (50%) hanno sviluppato una Graft versus Host Disease (GvHD) acuta di grado I-II, mentre soltanto 1/7 ha sviluppato una GvHD cronica. Due pazienti su 4 hanno sviluppato una GvHD acuta cutanea e intestinale di grado I, 1/4 ha sviluppato una GvHD cutanea di grado I e 1/4 una GVHD intestinale di grado II. Per tutti questi pazienti è stata intrapresa terapia steroidea (1 mg/kg) che ha prontamente portato alla risoluzione del quadro clinico, con spegnimento delle lesioni cutanee e riduzione del volume fecale in 3 pazienti su 4. Un paziente con GvHD cutanea di grado I, dopo un'iniziale spegnimento, ha sviluppato una GVHD cutanea cronica di grado I.

Riattivazioni del Cytomegalovirus e complicanze infettive post-trapianto

Otto pazienti su 10 sono valutabili per quel che riguarda le complicanze infettive post-trapianto. Cinque pazienti su 8 (62%) hanno presentato una riattivazione del Cytomegalovirus (CMV). Per i pazienti che hanno presentato una riattivazione del CMV è stata eseguita in prima battuta terapia con Ganciclovir a dose terapeutica (5mg/kg due volte al giorno) e in seconda battuta, in caso di presenza di un alto numero di copie di DNA virale nonostante la terapia con Ganciclovir, Foscavir a dose terapeutica (90 mg/kg due volte al giorno). Non si sono verificate polmoniti da CMV o altre forme di malattia citomegalica. Un paziente ha sviluppato una riattivazione del virus di Epstein-Barr a distanza di 5 mesi dal trapianto. Tale complicanza è stata trattata interrompendo la terapia immunosoppressiva in atto. Tale presidio terapeutico ha portato alla risoluzione dell'evento con scomparsa del DNA virale a 14 giorni di distanza dalla discontinuazione dell'immunosoppressione.

Due pazienti hanno sviluppato una cistite emorragica post-trapianto. In uno dei due pazienti la cistite era sostenuta da infezione da BK virus, documentata mediante riscontro di replicazione virale nelle urine. Il paziente, che al momento della cistite emorragica presentava una condizione di insufficienza renale acuta, è stato trattato con infusione di Cidofovir intra-vescicale (4 dosi) che ha portato alla risoluzione del quadro con scomparsa del DNA virale dalle urine.

Non si sono verificate riattivazioni di Adenovirus.

Outcome dei pazienti e sopravvivenza

Sette pazienti su 10 trapiantati hanno ottenuto una remissione completa successivamente al trapianto. Per quel che riguarda i 3 pazienti che non hanno ottenuto la remissione completa, 1/3 è morto per una complicanza infettiva insorta durante la fase di aplasia midollare, 1/3 è morto per tossicità da condizionamento e il restante paziente è morto in malattia dopo aver rigettato il midollo del donatore.

I pazienti in remissione completa dopo il trapianto erano candidabili ad un programma di immunoterapia post-trapianto basato sull'infusione di linfociti del donatore (DLI) da eseguire precocemente post-trapianto (1 mese dopo l'attecchimento), partendo dalla reinfusione di un numero di CD3/kg pari a 1×10^4

da incrementare progressivamente fino a 50×10^5 . Tre pazienti su 7 hanno effettivamente ricevuto almeno una dose di linfociti del donatore in seguito a trapianto di cellule staminali aploidentiche. La dose massima di cellule CD3/kg infusa ad un paziente è stata pari a 1×10^5 . Un paziente ha ricevuto soltanto 1 dose di linfociti del donatore, un paziente ne ha ricevute 2 e l'altro ne ha ricevute 4. Tutti e tre i pazienti hanno presentato una recidiva di malattia a distanza di 1,2 e 8 mesi dalla reinfusione delle cellule staminali aploidentiche. Il motivo per non procedere ulteriormente con la somministrazione dei linfociti del donatore è stato, in tutti e tre i casi, la ripresa della malattia ematologica.

Dei sette pazienti che hanno ottenuto la remissione completa, 2 sono vivi in remissione completa a distanza di 62 e 32 mesi dal trapianto. Quattro pazienti su 5 sono recidivati a distanza rispettivamente di 1, 2, 8 e 10 mesi dal trapianto aploidentico e successivamente deceduti. Un paziente è deceduto per una complicanza epatica mentre era in remissione completa.

Un'ultima considerazione riguardo alla sopravvivenza deve essere fatta analizzando il mismatch per i recettori KIR tra le coppie donatore-ricevente. Dei 7 pazienti affetti da leucemia acuta mieloide o leucemia mieloide cronica in fase cronica, 5/7 risultavano essere KIR-mismatched. Di questi, 2/5 (40%) sono vivi in remissione completa ematologica, e 1/5 (20) è morto in remissione completa per causa extra-ematologica. Entrambe i pazienti che non presentavano KIR-mismatch sono deceduti. dei tre pazienti affetti da leucemia acuta linfoblastica, 2/3 erano KIR-mismatched. Tutti e tre i pazienti affetti da leucemia acuta linfoblastica sono deceduti, 2/3 dopo aver ottenuto una iniziale risposta completa ematologica. Questi dati, seppur ottenuti da una casistica di piccole dimensioni, sembrano confermare un vantaggio di sopravvivenza legato all'effetto *graft versus leukemia* delle cellule NK nelle coppie donatore/ricevente KIR-mismatched.

DISCUSSIONE

Nonostante il trapianto di midollo osseo sia stato utilizzato con successo per trattare la leucemia acuta nelle ultime tre decadi, una più vasta applicazione di questa procedura è stata limitata dalla mancanza di donatori compatibili (46). Recentemente, l'attenzione si è spostata sui donatori alternativi, per esempio donatori fenotipicamente compatibili non familiari (46-48) e donatori familiari parzialmente compatibili (46-48).

Le probabilità di trovare un donatore non familiare compatibile nei Registri varia con la razza del paziente e va da circa il 60-70% per i Caucasici a meno del 10% per le etnie minori (46). Inoltre, spesso sono necessari mesi per identificare il donatore nella lista dei candidati potenziali, valutarne l'eleggibilità ed espiantare il midollo osseo. Si deve anche tener conto del fatto che l'età è un fattore di limitazione per i pazienti che ricorrono ad un donatore non familiare dal momento che il rischio di mortalità e di morbidità aumenta con l'età in questo tipo di trapianto. Tuttavia, con lo sviluppo dei sistemi di analisi molecolare, la tipizzazione è diventata molto più accurata nel corso degli anni proprio al fine di ridurre il rischio di rigetto e di malattia da trapianto contro l'ospite (GvHD), limitando in questo modo la possibilità di trovare un donatore compatibile disponibile. Per tutti questi motivi, il trapianto allogenico non è fattibile per circa la metà dei candidati. D'altro canto, tutti i pazienti hanno un familiare che è prontamente disponibile e con cui condividono un solo aplotipo. In altre parole, sono aploidentici incompatibili per i 3 loci maggiori del sistema HLA (A,B e DR).

Ricorrere a donatori familiari incompatibili per l'intero aplotipo offre numerosi vantaggi: 1) la disponibilità immediata del donatore per tutti i candidati al trapianto, 2) la possibilità di scegliere il migliore tra i vari familiari disponibili in base all'età, allo stato infettivologico e, come più recentemente suggerito, all'alloreattività delle cellule NK, 3) la possibilità di controllare il prelievo e la composizione dell'inoculo, 4) l'accesso immediato a terapie cellulari dopo il trapianto. Tuttavia, per molti anni, il trapianto di midollo osseo da un donatore familiare incompatibile per un aplotipo è stato un grosso insuccesso nei pazienti affetti da leucemia a causa dell'elevata incidenza di GvHD severa nei trapianti non manipolati e del rigetto nei trapianti Tdepletati in maniera estensiva.

Partendo da questi presupposti, abbiamo disegnato un protocollo pilota esplorativo di applicazione e di studio del trapianto di cellule staminali aplo-

identiche in pazienti affetti da emopatie maligne ricaduti o resistenti per i quali non fosse disponibile né un donatore familiare HLA-identico né un donatore unrelated (MUD).

I dati prodotti dalla nostra esperienza, confermano che il trapianto di cellule staminali aploidentiche è una procedura fattibile e sicura, in grado di garantire un'alta percentuale di attecchimento primario.

Il regime di condizionamento altamente immunosoppressivo e mieloablativo si è dimostrato essere ben tollerato ed in grado di garantire l'attecchimento delle cellule CD34+ altamente purificate nella grande maggioranza dei pazienti. Nella nostra casistica si è infatti verificato soltanto un caso di morte da tossicità correlata al condizionamento. La megadose di cellule staminali periferiche CD 34+ altamente purificata ($>10 \times 10^6$ CD34+/kg) è stata ottenuta in tutti i pazienti, ed è stata in grado di garantire l'attecchimento primario in 9 pazienti su 10 (90%). Riguardo all'uso delle cellule staminali da sangue periferico al posto delle cellule midollari nei trapianti da donatore HLA-identico, va sottolineato che tale impiego è ancora un argomento dibattuto, ma bisogna sottolineare il fatto che il trapianto incompatibile T-depletato è fattibile solo quando viene somministrata una megadose di cellule staminali e ciò è possibile solo attraverso la mobilitazione delle cellule staminali da sangue periferico.

D'altro canto, come ampiamente dimostrato in modelli preclinici da Reisner e collaboratori, le cellule CD34 positive altamente purificate, quando somministrate a dosi estremamente elevate e senza l'ausilio di altre cellule facilitanti, contribuiscono a promuovere il loro stesso attecchimento inducendo una tolleranza specifica ed agendo come cellule veto o facilitanti.

Tutti questi fattori, cioè il regime di condizionamento altamente immunosoppressivo e mieloablativo ed il numero di cellule CD34+ e CD3+ presenti nell'inoculo, sono tra di loro connessi in modo inestricabile. Le variazioni di uno implica modifiche anche negli altri. Uno studio riportato recentemente da Handgretinger et al. (69) ne è un buon esempio. In bambini affetti da leucemia acuta, l'infusione di una media di 20×10^6 CD34+/kg compensava la probabile minore efficacia immunosoppressiva di un condizionamento solo chemioterapico. In effetti, anche in questi casi si è avuta un'elevata percentuale di attecchimento e nessuna GvHD (69).

L'incidenza di complicanze tossiche ed infettive da noi riportate è paragonabile a quella del trapianto di midollo osseo allogenico da donatore non familiare

eseguito in condizione di remissione successiva alla prima. Inoltre, un solo paziente è deceduto a causa di una complicanza infettiva insorta durante il periodo di aplasia midollare post-chemioterapia. L'incidenza di riattivazioni del CMV è del tutto sovrapponibile a quella riportata in trapianti che utilizzano timoglobulina antilinfocitaria come profilassi della malattia da trapianto contro l'ospite. L'incidenza di altre infezioni virali (EBV, adenovirus, BK) non è differente da quella riportata in altre casistiche di pazienti sottoposti a trapianto aploidentico (60-61).

I dati di sopravvivenza da noi sopra riportati evidenziano che il 20% di una popolazione di pazienti ad alto rischio può essere guarito dal trapianto di cellule staminali aploidentiche, a fronte di un'alta percentuale di pazienti condannata a recidivare. Tale dato deve comunque essere interpretato come un dato positivo, poiché le prospettive di guarigione di pazienti leucemici pluritrattati plurirecidivati sono pressoché nulle, anche considerando l'eventuale impiego di terapie sperimentali.

I nostri risultati confermano che il trapianto aploidentico di cellule staminali emopoietiche ha vantaggi reali per i pazienti ad alto rischio, e che vista l'ottima tolleranza ed il profilo di sicurezza dimostrato in un setting di pazienti estremamente delicato come quello oggetto del presente studio, esso andrebbe probabilmente proposto come alternativa terapeutica precoce a quei pazienti che non hanno un donatore familiare e che hanno scarse probabilità di trovare un donatore compatibile da registro.

CONCLUSIONI

Molti progressi sono stati fatti dal punto di vista tecnologico, clinico e biologico per quanto riguarda i trapianti incompatibili per un intero aplotipo T-depletati come trattamento della leucemia acuta. La nostra esperienza dimostra che un'alta percentuale di attecchimento può essere raggiunta in assenza di GvHD severa e con una tossicità e morbidità correlate al regime di condizionamento veramente scarse. Il ritardo nella ricostituzione immunologica, che è inevitabilmente associato alla marcata T-deplezione, può essere in parte ridotto.

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche T-depletate da donatori familiari incompatibili per un intero aplotipo è ora una strategia terapeutica fattibile in pazienti con leucemia acuta ad alto rischio. Questo tipo di trapianto può oggi essere offerto con prospettiva di cura a pazienti che necessitano di un trapianto ma che non dispongono di un donatore, familiare o non, compatibile.

Dalla nostra esperienza si desume che il 20% dei pazienti con emopatia maligna ad altissimo rischio di recidiva di malattia e ad altissimo rischio di complicanze, anche fatali, peri e post trapiantologiche può diventare lungo sopravvivevole dopo trapianto aploidentico di midollo osseo. Inoltre, se noi teniamo in considerazione il ben documentato effetto trapianto-vs-AML esercitato dalle cellule NK alloreattive del donatore, il trapianto incompatibile può essere proposto anche a pazienti con AML refrattaria alla terapia di induzione o in fase precoce di recidiva.

In conclusione, riteniamo che il trapianto di midollo osseo aploidentico costituisca una valida opzione terapeutica per quei pazienti affetti da patologie oncoematologiche non rispondenti alle cure convenzionali e che non hanno un donatore familiare e/o da banca. Il nostro studio suggerisce che tale procedura è sicura e fattibile, con una transplant related mortality accettabile e una sopravvivenza libera da malattia del 20% a 3 anni, dato degno di nota in considerazione delle caratteristiche della popolazione oggetto di studio, per la quale non esistono reali alternative terapeutiche in grado di offrire tale opportunità di divenire lungo sopravvivevoli.

BIBLIOGRAFIA

1. Dexter M and Allen T. Multi-talented stem cells? Nature 1992, 360:709.
2. Lajtha LG. Stem cell kinetics. In Gordon AS (ed): Regulation of Hematopoiesis (vol.1). New York NY, Appleton 1970, 111.
3. Lajtha LG. Hemapoietic stem cells. Br J Haematol 1975, 29:259.
4. McCulloch EA. Control of hematopoiesis at the cellular level. In Gordon AS (ed): Regulation of Hematopietisis (vol.1). New York NY, Appleton 1970, 33.
5. Harrison DE, Jordan CT, Zhong RK, Astle CM. Primitive hematopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. Exp Hematol 1993, 21:206.
6. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lesson for and from the crypt. Development 1990, 110:1001.
7. Lemischka IR, Raulet DH, Mulligan RC. Developmental potential and dynamic behaviour of hematopoietic stem cells. Cell 1986, 45:917.
8. Fraser CC, Eaves CJ, Szilvassy SJ, Humphries RK. Expansion *in vitro* of retrovirally marked totipotent hematopoietic stem cells, Blood 1990, 76:1071.
9. Gardner RV, Astle CM, Harrison DE. The decrease in long-term marrow repopulating capacity seen after transplantation is not the result of irradiation-induced stromal injury. Exp Hematol 1988, 16:49.
10. Sutherland RD, Keating A. The Cd34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. J Hematother 1992, 1:115.
11. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in human can be distinguished from colony-forming cells by expression of CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. J Exp Med 1989, 169:1721.
12. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Monoclonal antibody 12.8 recognises a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony forming cells and their precursors. Blood 1986, 67:842.
13. Baum CM, Weissman IL Tsukamoto AS, Bucke AM. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89:2804.
14. Huang S, Terstappen LWMM. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR-, CD38- hematopoietic stem cells. Blood 1994, 83:1515.
15. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. J Hematother 1993, 2:137.
16. Kmiecik TE, Keller JE, Rosen E et al. Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic cells. Blood 1992, 80 : 2454.
17. Mc Coullouch EA. Stem cells in normal and leukemic hematopoiesis. (Henry Stratton

- lecture, 1982). *Blood* 1983, 62 : 1.
18. Greaves MF, Brown J, Molgaard HV et al. Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia* 1992, 6 : 31.
 19. Lanza F, Bi S, Castoldi GL, Goldman JM. Abnormal expression of N-CAM (CD56) adhesion molecule on myeloid and progenitor cells from Chronic Myeloid leukemia. *Leukemia* 1993, 7 : 1570.
 20. Carlo Stella C, Mangoni L, Piovani G et al. Identification of Philadelphia-negative granulocyte-macrophage colony-forming units generated by stroma-adherent cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Blood* 1994, 83 : 1373.
 21. Gore SD, Kastan MB, Civin CI. Normal Human Bone Marrow Precursors That Express Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Include T-Cell Precursor and Possible Lymphoid Stem Cells. *Blood* 1991, 77 : 1681.
 22. Miller JS, Verfaillie C, McGlave P. The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long term bone marrow culture. *Blood* 1992, 80 : 2182.
 23. Loken MR, Civin CI, Bighee WL et al. Coordinate glycosilation and cell surface expression of glycoporphin A during normal human erythropoiesis. *Blood* 1987, 70 : 1959.
 24. Loken MR, Shaw WO, Dattilio K, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. I. Normal erythroid development. *Blood* 1987, 69 : 255.
 25. Lansdorp PM, Sutherland HJ, Eaves CJ. Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hematopoietic cells from human bone marrow. *J Exp Med* 1990, 172 :363.
 26. Caux C, Dezutter-dambuyant C, Schmidt D, Bancherau J. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langherhans cells. *Nature* 1992, 360 : 258.
 27. Terstappen LWMM, Huang S, Safford M et al. Sequential generation of hematopoietic colonies derived from nonlineage-committed CD34+/CD38- progenitors cells. *Blood* 1991, 77 : 1218.
 28. Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE et al. Direct demonstration of elevate aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitors cells. *Blood* 1990, 75 : 1947.
 29. De Fabritiis P, Dowding C, Bunjey J et al. Phenotipic characterization of normal and CML CD34- positive cells: only the most primitive CML progenitors include Ph-neg cells. *Leuk Lymphoma* 1993, 11 : 51.
 30. Verfaillie C, Miller WJ, Boylan K, Mc Glave PB. Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the basis of HLA-DR antigen expression. *Blood* 1992, 79 : 1003.
 31. Fina L, Molgaard HV, Robertson D et al. Expression of the CD34 gene in vascular

- endothelial cells. *Blood* 1990, 75 : 2417.
32. Borowitz MJ, Gockerman JP, Moore JO et al. Clinical-pathologic and cytogenetic features of CD34 (MY10)-positive acute nonlymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1989, 91 : 265.
 33. Campos L, Guyotat D, archimbaud E et al. Surface marker expression in adults with acute myelocytic leukemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy. *Br J Haematol* 1989, 72 : 161.
 34. Myint H, Lucie NP. The prognostic significance of the CD34 antigen in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1992, 7 : 425.
 35. Pui CH, Hancock ML, Head DR et al. Clinical significance of CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993, 82 : 889.
 36. Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor of hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988, 72 : 2074
 37. Peters W, Rosner G, Ross M et al. Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow transplantation after high-dose chemotherapy. *Blood* 1993, 81 : 1709.
 38. Yan Liu K, Akashi K, Harada M et al. Kinetics of circulating hematopoietic progenitor during chemotherapy-induced mobilization with or without granulocyte colony-stimulating factor. *BR J Haemat* 1993, 84 : 31.
 39. Kotasek D, Shepherd KM, Sage RE et al. Factors affecting blood stem cell collections following high-dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors. *Bone Marrow Transplant* 1992, 9 : 11.
 40. Tarella C, Boccadoro M, Omedè P et al. Role of chemotherapy and GM-CSF on hemopoietic progenitor cell mobilization in multiple Myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1993, 11 : 271.
 41. Pettengel R, Testa NG, Swindell R et al. Transplantation potential of hematopoietic cell released into the circulation during routine chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993, 82 : 2239.
 42. Teshima T, Harada M, Takamatsu Y et al. Citotoxic drug and citotoxic drug/G-CSF mobilization of peripheral blood stem cells and their use for autografting. *Bone Marrow Transplant* 1992, 10 : 215.
 43. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F et al. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 1993, 81 : 3158.
 44. Ravagnani F, Siena S, Bregni M et al. Large scale collection of circulating

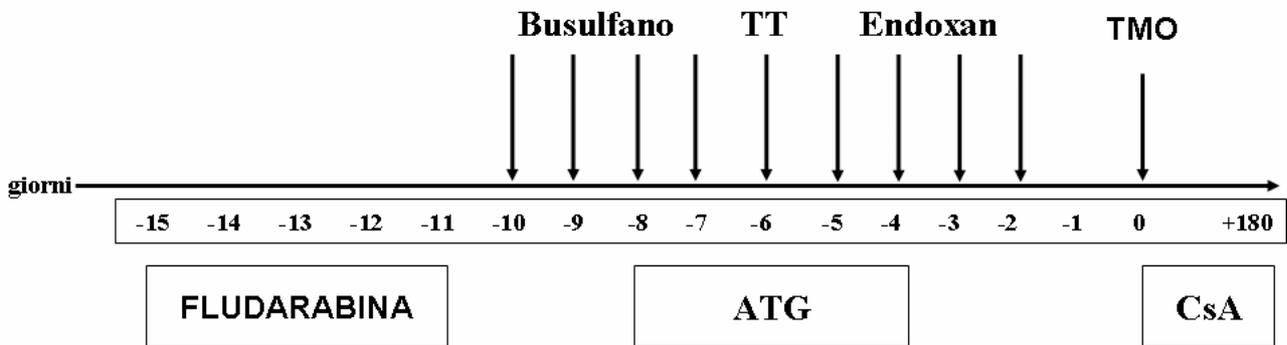
- hematopoietic progenitors in cancer patients treated with high-dose cyclophosphamide and recombinant human GM-CSF. *Eur J Cancer* 1990, 26 : 562.
45. Kessinger A, Armitage JO. The evolving role of autologous transplantation following high-dose therapies for malignancies. *Blood* 1991, 77: 211.
 46. Thomas ED, Marrow transplantation for malignant disease. *J Clin Oncol* 1983; 1:517-31.
 47. Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, et al. Retrospective analysis of 462 unrelated marrow transplants facilitated by the National Marrow Donor Program (NMDP) for treatment of acquired and congenital disorders of the lymphohematopoietic system and congenital metabolic disorders. *N Engl J Med* 1993; 328:593-602.
 48. Anasetti C, Etzioni R, Petersdorf EW, et al. Marrow transplantation from unrelated volunteer donors. *Ann Rev Med* 1995; 46:169-79.
 49. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999 ; 94(1):333-9.
 50. Anasetti C, Amos D, Beatty PG, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med* 1989; 320:197-204.
 51. Beatty PG, Mori M, Milford E. Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. *Transplantation* 1995; 60:778-92.
 52. Kernan NA, Flomemberg N, Dupont B, O'Reilly RJ. Graft rejection in recipients of T cell depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia: identification of host derived anti-donor alloreactive T lymphocytes. *Transplantation* 1987; 43:842-7.
 53. Soiffer RJ, Mauch P, Tarbell NJ, et al. Total lymphoid irradiation to prevent graft rejection in recipients of HLA non-identical T cell-depleted allogeneic marrow. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7:23-33.
 54. Cobbold SP, Martin G, Quin S, Waldman H. Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature* 1986; 323:164-6.
 55. Terenzi A, Aristei C, Chionne F, et al. Preliminary results in Fludarabine as an immunosuppressor in Bone Marrow transplantation conditioning. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: Suppl. 1:89.
 56. Lapidot T, Lubin I, Terenzi A, et al. Enhancement of bone marrow allografts from nude mice into mismatched recipients by T cells void of graft-versus-host activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 97:4595-9.
 57. Terenzi A, Lubin I, Lapidot T et al. Enhancement of T-cell depleted bone marrow allografts in mice thiotepa. *Transplantation* 1990; 50:517-9.
 58. Lapidot T, Terenzi A, Singer TS, Reisner Y. Size of bone marrow inoculum versus number of donor-type cells used for presensitization : a murine model for bone marrow

- allograft rejection in leukemia patients. *Blood* 1987 ; 70:309a.
59. Bachar-Lusting E, Rachamim N, Li HW, et al.. Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. *Nature Medicine* 1995 ; 1:268-1273.
 60. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, 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; 84:3948-55.
 61. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cell from related with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998; 339:1186-1193.
 62. Rachamim N, Gan J, Segall H, et al. Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants : donor type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 1998 ; 65:1386-1393.
 63. Eyrich M, Handgretinger R, Schumm M, et al. A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution after haploidentical CD34+ peripheral stem cell transplantation in children, *Blood* 1998; 92:686.
 64. Bennett M. Biology and genetics of hybrid resistance. *Adv. Immunol.* 1987 ; 41:333-445.
 65. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood* 1999 ; 93:467-80.
 66. World Health Organization. Handbook for reporting results of cancer treatment. W.H.O offset publication n°48, Geneva.
 67. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 1958, 53 : 457-481.
 68. Peto R, Pike MC, Armitage NE et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. Part II. Analysis and examples. *Br J Cancer* 1977, 35 : 1-39.
 69. Handgretinger R, Schumm M, Lang P, et al. Transplantation of megadose of purified haploidentical stem cells. *Ann NY Acad Sci* 872:351-361,1999.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti all'arruolamento

Diagnosi: <ul style="list-style-type: none">• Leucemia Acuta Mieloide• Leucemia acuta linfoblastica• Leucemia mieloide cronica in crisi blastica	6 3 1
Sesso: <ul style="list-style-type: none">• Maschi• Femmine	8 2
Età mediana (range)	19 (5-60)
Citogenetica: <ul style="list-style-type: none">• t(9;22)• t(9;22) + iso(17)• t(12;13)(p12;q12)• +4• t(8;17)• Cariotipo complesso	2 1 1 1 1 2
Stato di malattia all'arruolamento: <ul style="list-style-type: none">• Malattia refrattaria• I Recidiva• II Recidiva• III Recidiva• LMC in crisi blastica	5 2 1 1 1
Linee di terapia precedenti, mediana (range)	2 (2-4)

Figura 1. Terapia di condizionamento e profilassi della GvHD.



Fludarabina 150 mg/m² (-15, -11)

Busulfano: 14 mg/kg (-10, -7)

TT : thiotepa 10 mg/kg (-6)

ATG (timoglobulina, Sangstat): 12,5 mg/kg

Endoxan 160 mg/kg(-5, -2)

Ciclosporina A 3mg/kg

Figura 2. Composizione del Graft, T deplezione

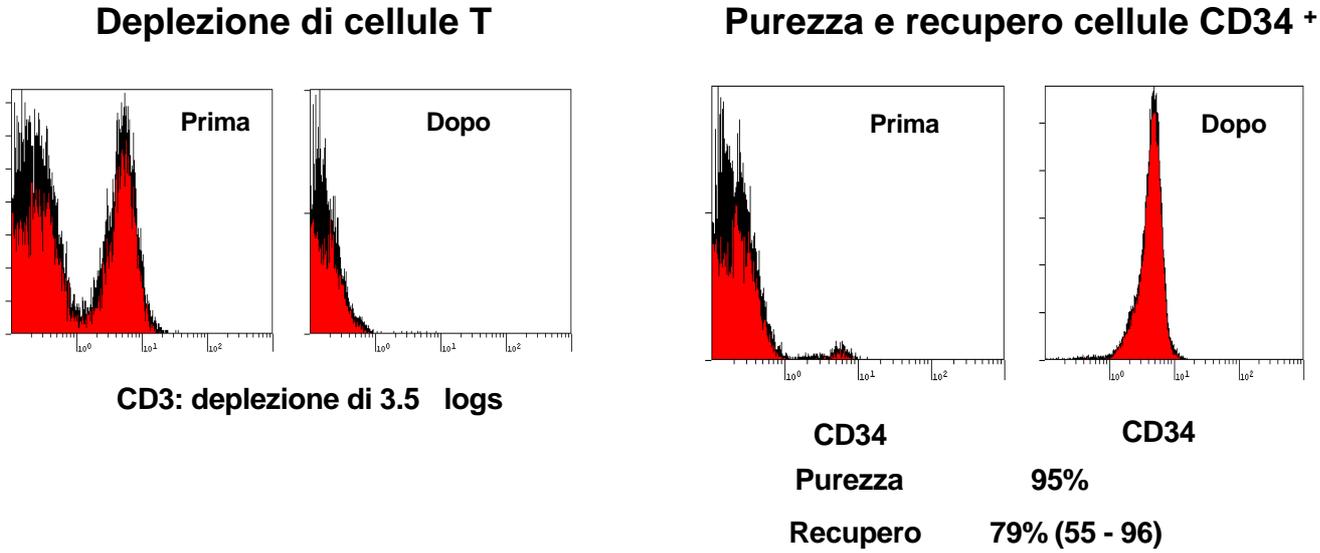


Figura 3. Recettori KIR e meccanismo di lisi da parte delle cellule natural killer

