



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA

Ciclo 38

Settore Concorsuale: 06/D3 - MALATTIE DEL SANGUE, ONCOLOGIA E REUMATOLOGIA

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15 - MALATTIE DEL SANGUE

ALLA RICERCA DI UN EQUILIBRIO TRA GVHD E GVL NEL TRAPIANTO
ALLOGENICO ATTRAVERSO L'ATLG

Presentata da: Margherita Ursi

Coordinatore Dottorato

Manuela Ferracin

Supervisore

Pier Luigi Zinzani

Co-supervisori

Francesca Bonifazi

Gianluca Storci

Esame finale anno 2026

Abstract della tesi

Il trapianto di cellule staminali allogeniche (allo-HSCT) rappresenta la terapia più efficace per le neoplasie ematologiche, in primis le leucemie acute, grazie all'effetto graft-versus-leukemia (GVL) che riduce il rischio di ricaduta, tuttavia è gravato da morbidità e mortalità, secondarie alla tossicità del regime di condizionamento, alle infezioni e soprattutto alla graft-versus-host-disease (GVHD). La profilassi della GVHD mediante immunosoppressione è un componente essenziale della piattaforma trapiantologica e si basa sull'associazione tra inibitori della calcineurina, antimetaboliti e T deplezione.

L'ATG/ATLG (Globulina anti-Timociti o Globulina anti-Linfociti T) è una delle forme di T deplezione in vivo più utilizzate in Europa sulla base di studi randomizzati, che ne hanno dimostrato l'efficace nel ridurre l'incidenza di GVHD acuta e soprattutto cronica, senza un aumento significativo del rischio di ricaduta e di mortalità infettiva. Esistono tuttavia delle limitazioni nella trasportabilità dei risultati di questi studi randomizzati alla popolazione attuale di real-life.

In primis, negli studi randomizzati sono scarsamente rappresentati i pazienti che ricevono un condizionamento a ridotta intensità (RIC), ossia i pazienti più anziani o con comorbidità.

La ricerca clinica del presente progetto si è incentrata sull'analisi dei principali endpoints clinici dei pazienti sottoposti a trapianto RIC che hanno ricevuto come profilassi antimetabolita+CNI+ATLG presso il nostro centro.

L'altra "open question" sull'uso dell'ATLG è la variabilità farmacocinetica e farmacodinamica interpaziente, a parità di dose somministrata.

La ricerca di laboratorio presentata in questa tesi si è incentrata sullo studio di fattori ricevente-specifici in grado di influenzare l'esposizione all'ATLG e il rischio individuale di GVHD. Ci si è concentrati su metodiche di biopsia liquida, utilizzando come surrogato delle cellule tissutali le vescicole extracellulari (EVs), in particolare le EVs CD31+, marker di derivazione endoteliale, essendo l'endotelio il primo tessuto non ematopoietico esposto all'ATLG e la superficie attraverso cui avviene la migrazione dei leucociti nelle fasi iniziali della GVHD.

English version

Allogeneic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the most effective treatment for hematological malignancies, primarily acute leukemias, thanks to the graft-versus-leukemia (GVL) effect, which reduces the risk of relapse. However, it is associated with morbidity and mortality secondary to the toxicity of the conditioning regimen, infections, and, above all, graft-versus-host disease (GVHD). GVHD prophylaxis through immunosuppression is an essential component of the transplant platform and is based on the combination of calcineurin inhibitors, antimetabolites, and T-cell depletion.

ATG/ATLG (anti-thymocyte globulin or anti-T-cell globulin) is one of the most widely used forms of in vivo T-cell depletion in Europe, based on randomized studies that have demonstrated its effectiveness in reducing the incidence of acute and, above all, chronic GVHD, without a significant increase in the risk of relapse and infectious mortality. However, there are limitations in the transferability of the results of these randomized studies to the current real-life population.

Firstly, patients receiving reduced-intensity conditioning (RIC), i.e., older patients or those with comorbidities, are poorly represented in randomized studies.

The clinical research in this project focused on the analysis of the main clinical endpoints of patients undergoing RIC transplantation who received antimetabolite+CNI+ATLG prophylaxis at our center. The other "open question" regarding the use of ATLG is the interpatient pharmacokinetic and pharmacodynamic variability, even when the same dose is administered.

The laboratory research presented in this thesis focused on the study of recipient-specific factors that can influence ATLG exposure and individual risk of GVHD. The focus was on liquid biopsy methods, using extracellular vesicles (EVs) as a surrogate for tissue cells, in particular CD31+ EVs, markers

of endothelial origin, since the endothelium is the first non-hematopoietic tissue exposed to ATLG and the surface through which leukocyte migration occurs in the early stages of GVHD.

INTRODUZIONE

PREMESSE GENERALI

Il trapianto di cellule staminali allogeniche (allo-HSCT) rappresenta la terapia più efficace per le neoplasie ematologiche, in primis le leucemie acute, grazie all'effetto graft-versus-leukemia (GVL) che riduce significativamente il rischio di ricaduta. La procedura trapiantologica, tuttavia, è gravata da un tasso non trascurabile di morbidità e mortalità, dovuto alla tossicità del regime di condizionamento, alle infezioni e soprattutto alla graft-versus-host-disease (GVHD).

La Graft-versus-host disease fu osservata inizialmente negli anni '60 in modelli murini di allo-HSCT, e, non essendo ancora noto il sistema HLA, fu descritta come "secondary disease". I topi esposti a una dose letale di radiazioni e a successiva infusione di splenociti sviluppavano lesioni cutanee, diarrea e malnutrizione grave fino alla morte.

Negli stessi anni Billingham¹ stabilì i tre elementi fondamentali che portavano allo sviluppo della "secondary disease":

- L'infusione di un inoculo (graft) contenente cellule immunocompetenti;
- Una disparità immunologica tra il donatore (donor) e il ricevente (host);
- La somministrazione del graft a un ricevente immunosoppresso, quindi incapace di rigettare le cellule del graft.

Ad oggi, dopo decenni di trapianto allogenico, questi concetti restano validi e abbiamo appreso che la "disparità immunologica" tra il donatore e il ricevente risiede principalmente nei polimorfismi del locus HLA (Human Leucocyte Antigen, alias MHC Major Histocompatibility Complex, *di qui in poi i termini HLA e MHC saranno usati come sinonimi*).

IL SISTEMA HLA

Struttura e funzioni

Il sistema HLA è un complesso di loci genici, caratteristico per ciascun individuo, sito sul braccio corto del cromosoma 6 (6q) (**Fig.1**).

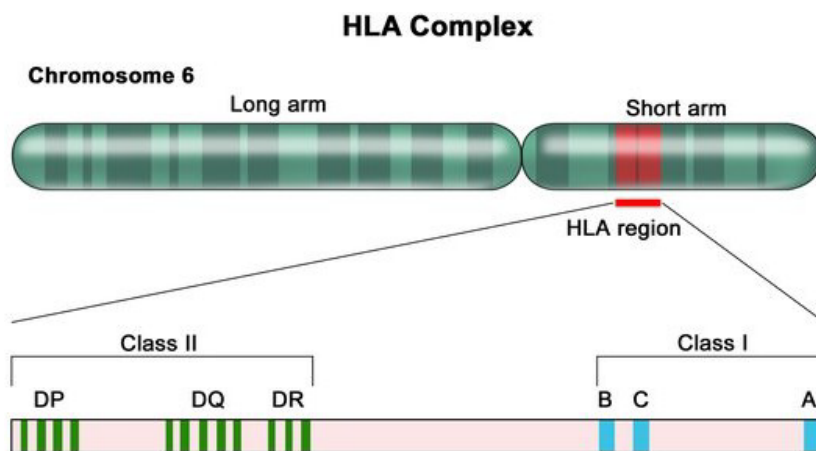


Fig.1

In corrispondenza del locus HLA si trovano gli alleli, altamente polimorfi, che codificano le molecole HLA di classe I (la catena alfa delle molecole HLA-A, HLA-B, HLA-C) e di classe II (catene alfa e beta di HLA-DR, HLA-DQ, -DP), *vedi oltre*.

Le molecole HLA svolgono un ruolo cruciale nell'attivazione e nella modulazione della risposta immunitaria cellulo-mediata, in quanto presentano i peptidi antigenici ai linfociti T. Ciascun clone linfocitario T riconosce, attraverso il suo TCR (T cell receptor), lo specifico complesso peptide-MHC mediante la corrispondenza tra le regioni ipervariabili del TCR, responsabili della specificità antigenica, e gli specifici complessi peptide-MHC, e questa interazione è il primo “segnale” che attiva il linfocita (**Fig. 2**).

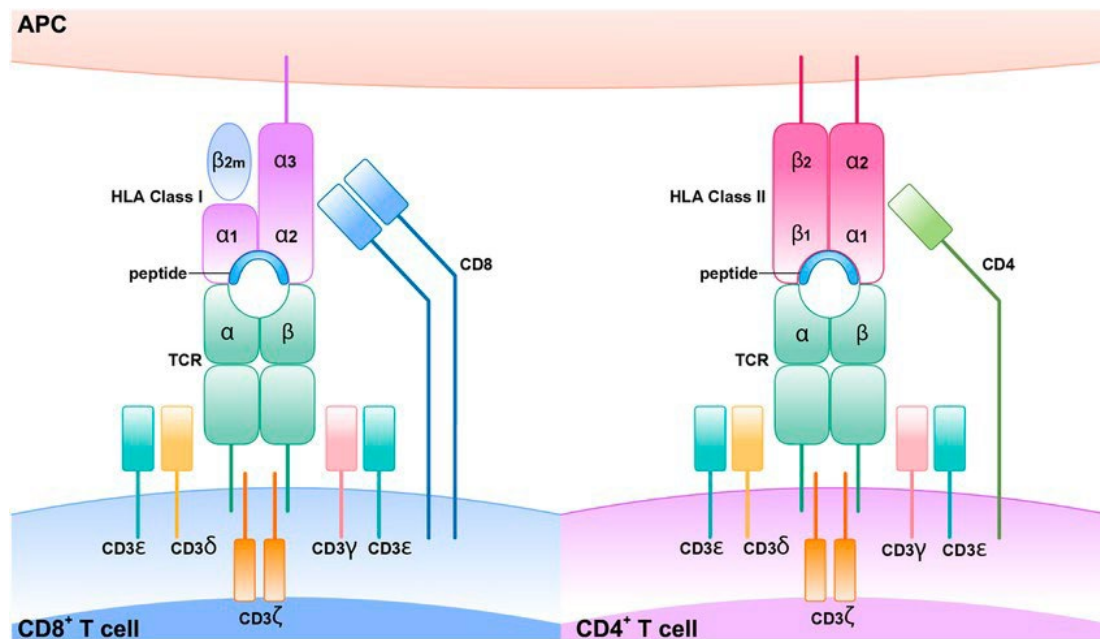


Fig.2 Sinapsi immunologica tra il linfocita T (CD4+ o CD8+) e i complessi peptide-MHC espressi dalle APC (antigen presenting cells).

L'interazione tra i complessi peptide-MHC e il TCR avviene a livello di una regione specifica delle membrane cellulari, sinapsi immunologica, dove si concentrano altre proteine fondamentali per una attivazione efficace, i co-recettori CD4+ e CD8+, e le molecole di co-stimolazione (“secondo segnale”), oltre a diversi recettori di citochine che modulano la polarizzazione e la differenziazione del linfocita attivato nella direzione più efficace a montare una risposta adeguata allo specifico antigene incontrato (“terzo segnale”).

Nella prima di queste interazioni, i complessi peptide-MHC di classe I legano e attivano linfociti T CD8+ citotossici, mentre i complessi peptide-MHC di classe II legano e attivano le sottoclassi di linfociti T CD4+ “helper”.

La struttura tridimensionale delle molecole HLA e la loro espressione sui diversi citotipi cellulari è funzionale a questa attivazione (**Fig. 3**).

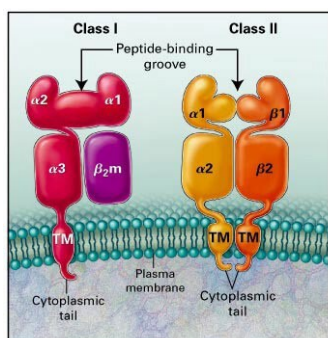


Fig. 3 Struttura delle molecole HLA

Le molecole HLA di classe I, HLA-A, HLA-B e HLA-C, sono espresse da tutte le cellule nucleate. Esse sono costituite da una catena alfa (a sua volta composta da 3 domini Ig-like, α_1 , α_2 , α_3) e una catena beta che è la beta2-microglobulina, legate non covalentemente. La beta2-microglobulina non è polimorfa e non è codificata dal locus HLA, di conseguenza solo le catene alfa per le molecole HLA di classe I sono rilevanti per la compatibilità.

I segmenti N-terminali dei domini α_1 , α_2 formano la tasca di legame per il peptide e quindi sono quelli in cui si concentra il maggior polimorfismo (in particolare negli esoni 2 e 3). Le molecole HLA di classe I legano preferenzialmente in questa tasca piccoli peptidi di 8-11 aa. A causa del polimorfismo nella tasca di legame per il peptide molecole MHC diverse legano peptidi differenti.

Il dominio α_3 è conservato in tutte le molecole HLA I e costituisce la maggior parte del sito di legame del CD8, a cui contribuisce anche la beta2-microglobulina e il dominio C-terminale non polimorfo di α_2 .

La molecola HLA di classe I completamente assemblata è un complesso trimetrico costituito dalla catena alfa, dalla beta2-microglobulina e dal peptide. Il legame al peptide stabilizza le interazioni delle due catene, pertanto solo le molecole legate al peptide vengono espresse sulla membrana cellulare.

Le molecole HLA di classe I presentano peptidi che derivano dalla degradazione di proteine citosoliche via ubiquitina-immunoproteasoma ai linfociti T CD8+ citotossici. I linfociti T CD8+ riconoscono il complesso peptide-MHC, in questo riconoscimento sono coinvolti sia i peptidi sia i residui aa dell'MHC. Le molecole MHC di classe I esprimono principalmente proteine di derivazione virale o da microbi intracellulari o di derivazione neoplastica, per attivare i linfociti T CD8+ ad uccidere le cellule infettate da virus o neoplastiche. Coerentemente, sono espresse da tutte le cellule perché qualsiasi cellula può essere infettata da virus o diventare neoplastica. Tuttavia, oltre alle proteine di derivazione patogena o neoplastica, qualsiasi proteina che si trova nel citosol e viene ubiquitinata e degradata nel proteasoma, incluse le proteine self o quelle derivanti dalla fagocitosi di altre cellule (cross presentation), può entrare nella via di presentazione della classe I e attivare una risposta T citotossica.

Su ciascun cromosoma 6, materno e paterno, sono presenti 3 loci per le catene alfa delle molecole HLA, 1 per HLA-A, 1 per HLA-B e 1 per HLA-C.

Ciascuno individuo quindi possiede 6 tipi di molecole HLA di classe I, 3 di derivazione paterna e 3 di derivazione materna e le esprime tutte perché è una espressione co-dominante (per aumentare la gamma di peptidi antigenici che può legare).

La maggior parte degli individui è ETEROZIGOTE per HLA di classe I e quindi esprime 6 DIVERSE molecole HLA di classe I.

Le molecole MHC o HLA di classe II sono invece costituite da 2 catene polipeptidiche di dimensioni simili, alfa e beta, entrambe codificate nel locus HLA ed entrambe polimorfe, anche se il maggior grado di polimorfismo si concentra nella catena beta, soprattutto per HLA-DR.

Ciascuna catena è a sua volta costituita da 2 domini Ig-like (4 in tutto), $\alpha 1$ e $\beta 1$ si trovano all'N-terminale, formano la tasca di legame per il peptide e sono le regioni in cui si concentra il maggior polimorfismo (esone 2).

$\alpha 2$ e $\beta 2$ sono più vicini alla membrana e (come il segmento $\alpha 3$ e la beta-2 microglobulina delle MHC di classe I) non sono altamente polimorfi e formano la regione di legame per il CD4.

La molecola MHC di classe II completamente assemblata è un complesso trimetrico costituito dalla catena alfa, dalla catena beta e dal peptide legato (16-30 aa). Anche in questo caso, come per la classe I, l'espressione sulla membrana cellulare richiede il legame del peptide.

Le molecole MHC di classe II sono fisiologicamente espresse dalle cellule APC (antigen presenting cells) professionali: cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B; sono inoltre espresse dalle cellule epiteliali timiche nel corso della maturazione dei timociti e (nell'uomo) dalle cellule endoteliali. L'espressione in membrana delle molecole MHC di classe II può, inoltre, essere indotta anche su cellule non APC professionali, in condizioni infiammatorie, da parte delle citochine quali IFN-gamma e TNF-alfa.

Le molecole MHC di classe II legano peptidi che derivano da proteine extracellulari che vengono endocitate e degradate nei fagolisosomi.

Ciascuno individuo possiede su ciascun cromosoma 6: un gene DP-A che codifica per la catena alfa di DP e un gene DP-B che codifica per la catena beta di DP; un gene funzionale per DQ-A che codifica per la catena alfa di DQ e un gene funzionale DQ-B che codifica per la catena beta di DQ; un gene per DR-A che codifica per la catena alfa di DR e uno o più geni funzionali beta che codificano per la catena beta di DR.

Quindi, ammesso che sia eterozigote che è ciò che accade nella maggior parte dei casi, ogni individuo esprime per l'HLA di classe II:

- 2 molecole DP (1 materna e 1 paterna)
- 2 molecole DQ (1 materna e 1 paterna)
- 2 o 3 o 4 molecole DR (1 o 2 materna e 1 o 2 paterna)

Quindi in tutto ogni individuo esprime 6 molecole per la classe I (in ciascuna cellula) e da 6 a 8 per la classe II (raramente di più se ci sono loci DRB funzionanti in più).

Come fa un individuo con 14 molecole MHC a legare tutti i possibili peptidi antigenici che può incontrare?

La spiegazione è che una singola molecola MHC può legare più peptidi diversi che rispettano le dimensioni e le caratteristiche elettrostatiche utili al legame nella sua tasca ma il linfocita T riconosce un solo complesso peptide-MHC e questo conferisce la specificità della risposta.

Le interazioni sinora descritte tra i complessi peptide-MHC e i TCR sono la base immunologica delle dei due aspetti fondamentali del trapianto allogenico:

- **GRAFT VERUS LEUKEMIA:** reazione, benefica, dei linfociti T del donatore nei confronti delle cellule leucemiche (o linfomatose/mielomatose) del ricevente;
- **GRAFT VERSUS HOST DISEASE:** reazione, dannosa, dei linfociti T del donatore nei confronti delle cellule sane non-self del ricevente, la cosiddetta "secondary disease" descritta da Billingham.

Studi successivi hanno dimostrato che tutte le cellule del sistema immunitario, innato e adattativo, sono coinvolte nella GVHD, oltre alle APC e ai linfociti T, tuttavia questo modello patogenetico semplificato resta valido per spiegare il dato clinico che il principale fattore di rischio della GVHD è la disparità immunologica (HLA-mediata) tra il donatore e il ricevente.

Il livello di compatibilità HLA tra donatore e ricevente rimane il singolo fattore di rischio più importante per lo sviluppo della GVHD.

Pertanto, la prima e fondamentale misura di profilassi della GVHD è la scelta di un donatore HLA-compatibile.

Ereditarietà, tipizzazione e matching nella scelta del donatore

I principali alleli del sistema HLA (-A, -B, -C, -DR, -DQ) sono ereditati “in blocco” per linkage-disequilibrium (che rende altamente improbabile il crossing over tra i loci materni e paterni) e costituiscono l’aplotipo HLA. Ciascun individuo eredita 2 aplotipi HLA, uno da ciascuno da un genitore: 1 sul cromosoma 6 di origine paterna e 1 sul cromosoma 6 di origine materna (**Fig.4**).

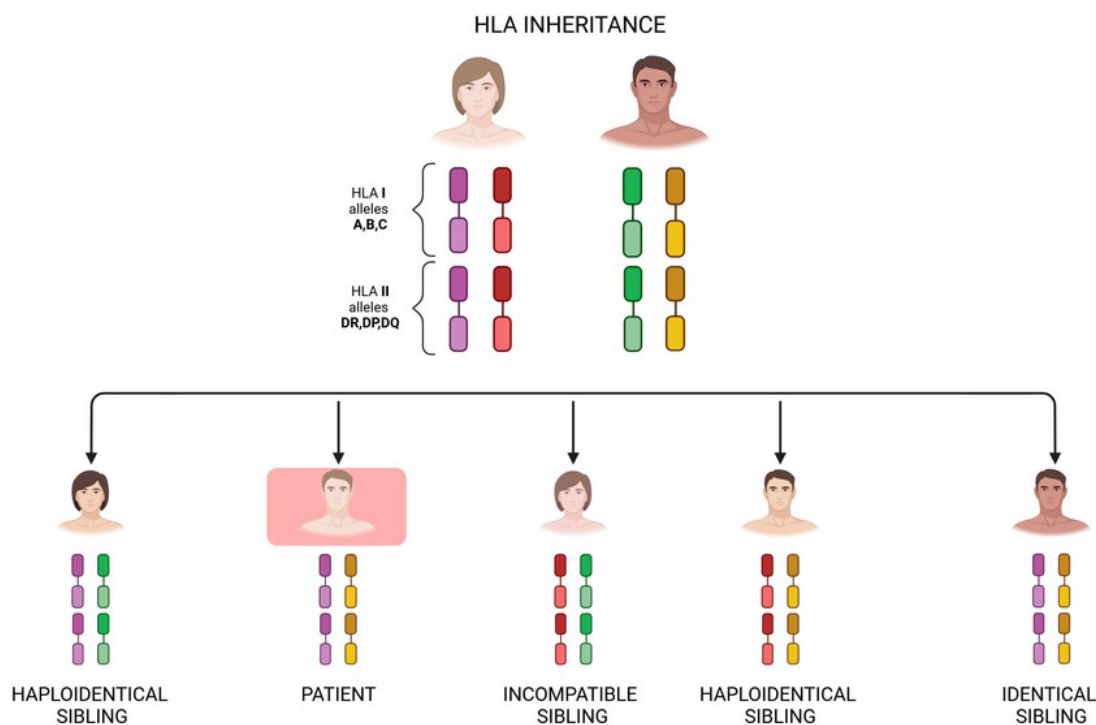


Fig. 4 Ereditarietà degli aplotipi HLA

L’ereditarietà dell’aplotipo segue la genetica “mendeliana”, pertanto la probabilità che un individuo condivida entrambi gli aplotipi con uno dei fratelli è del 25% per ogni fratello, che in tal caso si definisce “HLA-identico”.

Nel caso in cui i due fratelli abbiano ereditato 1 aplotipo uguale e 1 aplotipo differente dai genitori vengono definiti “Aplo-identici”; nel caso invece abbiano ereditato entrambi gli aplotipi differenti sono “HLA-incompatibili”.

I fratelli HLA-identici e aplo-identici del paziente sono potenziali donatori.

I genitori e i figli biologici condividono (salvo crossing-over) un solo aplotipo e vengono definiti “Aplo-identici”, e sono anch’essi potenziali donatori.²

Il trapianto da donatore aploidentico non sarà oggetto successivo di questa trattazione, in quanto la profilassi presso il nostro centro (e nel resto d'Europa) viene eseguita con la Ciclofosfamide post e non con ATLG.

E' possibile e frequente avere dei donatori HLA-compatibili al di fuori della famiglia, poiché gli alleli del sistema HLA sono polimorfici nella popolazione ma le varianti, sebbene numerose, non sono infinite, pertanto vi è una consistente probabilità di avere gli stessi alleli su entrambi i loci con un individuo non imparentato. Tale principio è alla base della ricerca e dell'utilizzo di donatori non consanguinei, iscritti ai registri nazionali e internazionali (IBMDR in Italia).

Il trapianto da donatore non consanguineo è aumentato esponenzialmente dalla creazione dei registri e ad oggi i donatori non familiari rappresentano la tipologia più frequentemente utilizzata nella pratica trapiantologica, almeno in Italia e in Europa.

I loci chiave da includere nel processo di tipizzazione e matching sono HLA-A, HLA-B, HLA-C (classe I, catena alfa) e HLA-DRB1 (classe II, catena beta), e opzionalmente HLA-DQB1 e HLA-DPB1.

Fino alla metà degli anni '90, la tipizzazione sierologica era la principale metodica di tipizzazione tissutale (match antigenico). Con l'avvento delle tecniche di biologia molecolare (PCR, polymerase chain reaction), è stata introdotta la tipizzazione allelica a livello di DNA, consentendo di apprezzare un grado di polimorfismo assai maggiore di quello inizialmente evidenziato dalla sierologia.³

Il polimorfismo nucleotidico degli alleli HLA è concentrato nelle regioni ipervariabili (HVRs, Hypervariable regions), principalmente gli esoni 2, 3 e 4 della classe I e gli esoni 2 e 3 della classe II, che codificano per le regioni di legame al peptide antigenico e ai co-recettori CD4-CD8 (vedi sopra). Pertanto, la tipizzazione basata sulla PCR, si focalizza principalmente su questi esoni.

La tipizzazione ad alta risoluzione (NGS, next generation sequencing) dei loci HLA ha consentito di migliorare ulteriormente la definizione nella caratterizzazione dei polimorfismi e nella valutazione della compatibilità tra donatore e ricevente. L'NGS consente di sequenziare le intere regioni codificanti e non dell'HLA, il che è essenziale per il miglior matching HLA e la minimizzazione del rischio di GVHD.

Ad oggi quindi, la tipizzazione "ad alta risoluzione" del donatore e del ricevente si basa su metodiche di NGS.

In caso di donatori familiari (MRD, Matched Related Donor o MSD, Matched Sibling Donor), viene condiviso l'aplotipo parentale, che comprende HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPB1, salvo rari fenomeni di ricombinazione (che vengono esclusi tramite lo studio della compatibilità), pertanto, i fratelli HLA-identici sono compatibili 8/8, 10/10, 12/12.

Al contrario, i donatori non consanguinei (MUD, Matched Unrelated Donor), sono definiti HLA-compatibili se condividono gli stessi alleli ai 4 loci principali, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 e sono pertanto HLA-identici 8/8.

Nella maggior parte dei casi, i match 8/8 sono anche 10/10, cioè condividono anche l'allele HLA-DQB1, per il forte linkage disequilibrium (LD) tra la regione dell'HLA-DR e quella dell'HLA-DQ. Al contrario, il LD è molto più debole per la regione HLA-DP (i.e. i fenomeni di crossing over a livello del -DP sono molto più frequenti nella genetica di popolazione), pertanto la maggior parte dei donatori HLA-identici (8/8 e anche 10/10) presentano mismatch in -DP.

Recenti evidenze di letteratura hanno evidenziato il contributo del mismatch in -DP alla GVL e alla GVHD.⁴

La probabilità di trovare un donatore HLA-matched 10/10 da registro varia a seconda dei gruppi etnici, da oltre il 75% per i caucasici a meno del 30% per altri gruppi etnici quali gli afro-americani.⁵ In assenza di un donatore MSD o MUD HLA-identico, un donatore con un singolo mismatch è una valida alternativa, in tal caso viene definito MMUD (MisMatched Unrelated Donor), associata tuttavia a un maggior rischio di non relapse mortality (NRM) dovuto alla maggiore incidenza di GVHD e delle terapie immunosoppressive (IS) necessarie per contrastarla.

E' un dato consolidato in letteratura che, con la profilassi standard della GVHD (vedi oltre), ogni mismatch ai loci HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1 aumenta il rischio di mortalità non da ricaduta (NRM, non relapse mortality) di circa il 10%.⁶

Il mismatch in HLA-DQ ha minore impatto sulla sopravvivenza⁷, pertanto è da preferire in assenza di un donatore HLA compatibile 10/10.

IMMUNOSOPPRESSIONE FARMACOLOGICA

INIBITORI DELLA CALCINEURINA E ANTIMETABOLITI

I primi 200 trapianti, eseguiti sugli esseri umani negli anni '60, senza conoscenza dell'istocompatibilità e senza immunosoppressione, si rivelarono un fallimento, tutti i trapiantati morirono di infezioni, graft failure, GVHD o ricaduta della leucemia.⁸

Diversi gruppi di ricercatori si concentrarono, negli anni '70, sullo studio di modelli animali di trapianto (più complessi dei topi inbred studiati inizialmente), nel tentativo di comprendere e superare gli ostacoli incontrati nel trasportare il trapianto dal laboratorio agli esseri umani. Il gruppo di Seattle, in particolare, si concentrò sullo studio dei cani, che condividono con gli esseri umani la maggiore eterogeneità genetica e alcune malattie ematologiche.⁹

Gli studi di quegli anni dimostrarono che i cani che ricevevano il trapianto da un donatore DLA-matched (dog leukocyte antigen), in base alle tecniche di istocompatibilità allora disponibili, sopravvivevano significativamente più a lungo dei mismatched, dimostrando l'importanza fondamentale del matching sia per l'attecchimento (prevenzione della graft rejection) che per la prevenzione della GVHD letale.¹⁰

Tuttavia, anche in caso di matching tra donatore e ricevente, la GVHD rimaneva una complicanza potenzialmente fatale, che necessitava di ulteriori interventi prima di riportare il trapianto nel setting clinico. Queste osservazioni stimolarono la ricerca di farmaci in grado di controllare la GVHD, il più promettente dei quali, nei modelli canini, si dimostrò il Metotrexato¹¹, dapprima come agente singolo, e successivamente in associazione alla Ciclosporina.^{11,12}

Sulla scorta di queste evidenze sul modello animale, un lavoro seminale di Storb del 1986 dimostrò la superiorità della combinazione Ciclosporina+Metotrexato vs solo Metotrexato nel prevenire la GVHD in pazienti trapiantati da donatori familiari HLA-identici e utilizzando midollo osseo come fonte.¹²

La combinazione Ciclosporina + Metotrexato è diventata da allora il back-bone standard nella profilassi della GVHD.

Il Metotrexato (MTX) è un antimetabolita che interferisce con la replicazione cellulare. Il preciso meccanismo con cui il MTX previene la GVHD non è completamente noto; è probabile che sia correlato alla sua azione di inibizione della replicazione cellulare dei linfociti T attivati (alloreattivi) che, essendo cellule rapidamente proliferanti, sono particolarmente sensibili all'azione antiproliferativa.

La Ciclosporina (CSA) e il Tacrolimus (FK506, vedi oltre), sono inibitori della calcineurina. La calcineurina è una fosfatasi calcio/calmodulina-dipendente che fa parte della via di segnalazione a valle del TCR. Dopo l'attivazione del TCR, la calcineurina attiva il fattore di trascrizione NFAT, mediante defosforilazione, ed NFAT trasloca nel nucleo dove up-regola l'espressione dell'IL-2 che stimola la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T.

Negli anni '90-2000 sono stati condotti due studi randomizzati di fase III di confronto tra CSA+MTX e FK+MTX, come profilassi della GVHD nel trapianto da donatori familiari HLA-identici e matched/mismatched unrelated (MUD/MMUD), rispettivamente.^{13,14}

Entrambi gli studi hanno riportato una riduzione dell'incidenza di GVHD acuta (grado II-IV) con l'uso del Tacrolimus rispetto alla Ciclosporina, senza tuttavia un guadagno netto in termini di sopravvivenza e senza impatto significativo sulla GVHD cronica.

Successivi dati retrospettivi hanno confermato la sostanziale equivalenza dei due CNI sulla profilassi della GVHD.

Le Linee Guida¹⁵ dell'European Bone Marrow Transplantation society (EBMT), pubblicate nel 2024, raccomandano che i pazienti che ricevono un trapianto allogenico da donatore MRD o MUD debbano ricevere come profilassi un inibitore della calcineurina in associazione all'antimetabolita, lasciando la scelta tra Tacrolimus e Ciclosporina all'esperienza del centro. La combinazione Ciclosporina+Metotrexato rimane la più utilizzata in Europa, soprattutto dopo un condizionamento mieloablativo, mentre l'associazione Tacrolimus+Metotrexato è la più utilizzata negli Stati Uniti.

E' importante sottolineare che i suddetti studi sulla profilassi della GVHD sono stati condotti su pazienti che ricevevano un condizionamento mieloablativo e midollo osseo come fonte di cellule staminali.

Nelle ultime 2 decadi importanti novità sono state introdotte nella pratica clinica trapiantologica rispetto al modello iniziale di trapianto di midollo osseo da donatore familiare HLA-identico e con condizionamento mieloablativo:

-L'utilizzo di cellule staminali mobilizzate nel sangue periferico con il G-CSF come fonte (PBSC)

-Il crescente impiego di donatori NON familiari

-L'estensione della trapiantabilità a pazienti più anziani, resa possibile dall'avvento dei regimi di condizionamento a "Intensità ridotta" (RIC) e/o non mieloablativi (NMA) che differiscono dai tradizionali condizionamenti mieloablativi (MAC) per l'utilizzo di farmaci chemioterapici e radiazioni a dosaggio inferiore (Busulfano ≤ 8 mg/kg, Melfalan ≤ 140 mg/mq, TBI ≤ 8 Gy in dosi frazionate).¹⁶

A parità di profilassi della GVHD (CNI+antimetabolita), l'impiego di donatore non familiare e l'uso delle periferiche come fonte ha portato a un aumento dell'incidenza di GVHD acuta e soprattutto cronica, rispetto al midollo osseo da fratello HLA-identico.¹⁷

Questa osservazione ha stimolato la ricerca di una profilassi più efficace della GVHD acuta e cronica, che non avesse tuttavia un impatto negativo sulla GVL e quindi sulla ricaduta della neoplasia ematologica.

Classicamente, il regime di condizionamento, ossia la radio/chemioterapia somministrata al paziente prima dell'infusione del graft, ha un duplice obiettivo:

- Mieloablazione: eliminazione della neoplasia ematologica e delle cellule emopoietiche (sane) del ricevente, per trattare la leucemia e “fare spazio” nelle nicchie midollari al midollo del donatore;

- Immunoablazione: soppressione del sistema immunitario del ricevente, per prevenire la “host versus graft” ossia il rigetto delle cellule del donatore da parte dei linfociti del ricevente.

Studi successivi hanno dimostrato che per ottenere la mieloablazione non è necessario utilizzare farmaci radio/chemioterapici a dosaggio massimale in quanto la successiva reazione del graft-versus-host è in grado di eliminare l'emopoiesi eventualmente residua del ricevente, rendendo di fatto il trapianto “mieloablativo” in seconda istanza, dopo un periodo di transitoria coesistenza tra l'emopoiesi del donatore e quella del ricevente (chimerismo misto).

Inoltre, l'efficacia delle DLI (donor lymphocyte infusion) nel trattamento della ricaduta post trapianto (con un'efficacia malattia-specifica, maggiore per la Leucemia Mieloide Cronica e la Mielofibrosi, minore per le Leucemie acute e i Linfomi aggressivi) e l'evidenza che la GVHD cronica si associa invariabilmente a una riduzione dell'incidenza di ricaduta, in tutte le patologie neoplastiche, ha dimostrato clinicamente che la superiore efficacia del trapianto risiede nella Graft versus Leukemia/Linfoma ossia l'azione di “immunosorveglianza” del sistema immunitario, linfociti in primis, del donatore nei confronti delle cellule neoplastiche residue o riemergenti del ricevente.

Queste osservazioni hanno incentivato la sperimentazione di regimi di preparazione al trapianto “a ridotta intensità, RIC”, basati sull'uso di farmaci a dosaggio inferiore e con proprietà immunoablativa (Fludarabina, TBI a dose ridotta, Busulfano a dose ridotta, Treosulfano)^{16,18}, che potessero essere somministrati anche a pazienti più anziani senza l'eccessiva tossicità del regime di condizionamento standard che risulta eccessivamente tossico (tossicità epatica, renale, polmonare, mucosale) nei pazienti con età >55-60 anni e/o con comorbidità.

I regimi “RIC” hanno l'obiettivo di trattare (sebbene non in maniera eradicante) la patologia di base e soprattutto di fornire una sufficiente immunoablazione per garantire l'attecchimento e consentire l'instaurarsi della graft versus leukemia (GVL) come trattamento anti-neoplastico principale.

Diversi studi retrospettivi hanno dimostrato che i regimi meno intensivi si associano ad una inferiore transplant-related-mortality (TRM) ma ad un maggior rischio di ricaduta, rispetto ai MAC classici, risultando in una analoga sopravvivenza globale (OS).^{19,20}

La scelta del regime di condizionamento è ad oggi una decisione “tailored” sul singolo paziente, bilanciando il rischio di ricaduta e il rischio di NRM.^{21,22}

Poiché con l'uso dei RIC, l'efficacia del trapianto risiede essenzialmente nella GVL, la profilassi della GVHD deve essere mirata a bilanciare il rischio di una immunosoppressione insufficiente che esiti in GVHD e il rischio di una immunosoppressione eccessiva con aumentato rischio di ricaduta.

T DEPLEZIONE IN VIVO: ATG/ATLG

L'introduzione delle PBSC come fonte di cellule staminali ha determinato un accorciamento del periodo della citopenia e una minore incidenza di graft failure, a scapito di una aumentata incidenza di GVHD acuta e soprattutto cronica, nei pazienti che ricevono come profilassi CNI+antimetabolita. Queste proprietà delle PBSC rispetto al midollo osseo derivano innanzitutto dalla composizione differente, in particolare le PBSC contengono circa 1 log in più di linfociti T rispetto al midollo osseo.

I linfociti T svolgono un ruolo chiave sia nell'attecchimento, per eliminazione dell'emopoiesi residua del ricevente (nei condizionamenti RIC), sia nella GVHD, di cui sono i principali effettori, spiegando almeno in parte le diversità del trapianto da PBSC e da midollo.

Considerata la diversa composizione delle due fonti, è intuitivo comprendere perché le strategie impiegate per ridurre il rischio di GVHD associato alle PBSC siano state primariamente strategie di T deplezione, ex vivo (*non affrontate in questo lavoro*) e in vivo.

Le due forme di T deplezione in vivo più studiate e applicate nella pratica clinica sono la ciclofosfamide post trapianto (PT-CY) e la ATG/ATLG (Globulina anti-Timociti o Globulina anti-Linfociti T).

La Ciclofosfamide (CY) post trapianto è stata introdotta con la classica “piattaforma di Baltimora” (Luznik 2008) nel trapianto da donatore familiare aploidentico e prevede somministrazione di CY 50 mg/kg ai giorni +3 e +4 dopo l'infusione, in associazione a Tacrolimus e MMF a partire dal +5.

La CY agisce come farmaco antiproliferativo sui linfociti T attivati, rappresentati principalmente dai subsets allo-reattivi nei giorni immediatamente successivi all'infusione del graft, risparmiando le cellule staminali.²³

I risultati soddisfacenti ottenuti con l'aploidentico hanno portato a un crescente utilizzo della piattaforma di Baltimora anche nel setting del donatore MUD e MMUD, soprattutto in U.S.A. dove l'utilizzo dell'ATG/ATLG non si è mai particolarmente diffuso e l'aggiunta della PT-CY alla duplice profilassi con CNI e antimetabolita ha ridotto l'incidenza di GVHD acuta e cronica rispetto al solo CNI+antimetabolita.²⁴

Le principali tossicità della PT-CY sono la cistite emorragica e la cardiotoxicità che, sebbene rara, può rappresentare un effetto avverso significativo, soprattutto nei pazienti anziani e/o con preesistente comorbidità.

L'ATG/ATLG è un siero polivalente, costituito da anticorpi a diversa specificità antigenica e in composizione variabile, ottenuto immunizzando l'animale (il coniglio) con timociti umani (ATG) o linee cellulari T (Jurkatt, ATLG).

Il meccanismo di azione dell'ATLG, ancora non del tutto chiarito, è attribuito principalmente a una deplezione dei linfociti T sia del ricevente (fase pre-trapianto, attività anti graft failure) sia del donatore (fase post trapianto, attività anti-GVHD).²⁵

I target degli anticorpi contenuti nel siero ATG/ATLG sono tuttavia molteplici e includono antigeni espressi anche dai linfociti B, dalle cellule APC e delle cellule endoteliali. Alcuni di questi antigeni sono le molecole di costimolazione (CD80, CD86) e le integrine (LFA-1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, LFA-4, $\alpha 4\beta 7$). Sulla base di queste interazioni e di studi di laboratorio su modelli preclinici, si ritiene che, oltre alla T deplezione, all'attività anti-GVHD dell'ATG/ATLG contribuiscano: la deplezione dei linfociti B, l'inibizione della formazione delle sinapsi immunologiche tra APC e cellule T e l'inibizione della migrazione dei leucociti attraverso l'endotelio.²⁵

L'aggiunta dell'ATG/ATLG al “backbone” CNI+antimetabolita è stata testata in diversi studi randomizzati (Finke 2009, Walker 2015, Kroeger 2016, Soiffer 2017), che hanno confrontato la triplice profilassi allo standard di CNI+antimetabolita, in pazienti trapiantati da donatore familiare HLA-identico (Kroeger 2016) o MUD HLA-identico o MUD/MMUD.^{26,27,28,29}

Complessivamente tutti questi studi hanno dimostrato la superiorità della profilassi con ATLG nel prevenire la GVHD acuta e soprattutto la GVHD cronica, senza un aumento significativo del rischio

di ricaduta e senza modificare significativamente la sopravvivenza globale, determinando un guadagno netto in termini di Graft Relapse Free Survival (GRFS).

Sulla scorta di queste evidenze, le Linee Guida sulla profilassi (Lancet 2024)¹⁵ raccomandano l'uso della ATG/ATLG nei pazienti che ricevono un donatore familiare matched o un donatore volontario matched o con un mismatch in aggiunta al back-bone CNI+antimetabolita. Nel setting MUD/MMUD la PT-CY è una valida alternativa.

Il lavoro si concentrerà sull'ATLG, facendo riferimento alla PT-CY unicamente come comparatore presente in letteratura nella discussione dei risultati.

Esistono tuttavia delle limitazioni nella trasportabilità dei risultati di questi studi randomizzati alla popolazione attuale di real-life.

In primo luogo, negli studi randomizzati sono scarsamente rappresentati i pazienti che ricevono un condizionamento a ridotta intensità (RIC)→assenti nei lavori di Finke/Soiffer/Kroeger, solo il 33% nel trial di Walker; pazienti che stanno diventando sempre più numerosi.

In merito alla profilassi della GVHD nei pazienti trapiantati con condizionamento RIC/NMA, le Linee Guida¹⁵ (Lancet 2024) raccomandano che i pazienti dovrebbero ricevere una profilassi con inibitore della calcineurina e antimetabolita. L'antimetabolita di scelta in questo setting è il Micofenolato Mofetile (MMF). Tale preferenza rispetto al MTX deriva dagli iniziali protocolli di condizionamento/profilassi dei trapianti NMA/RIC e dalla pratica clinica che ne è seguita; non ci sono tuttavia evidenze dirette di comparazione MMF vs MTX nel setting NMA/RIC.

Per quanto riguarda l'aggiunta di una T deplezione nel setting del trapianto RIC non ci sono raccomandazioni forti e il timore iniziale degli esperti era un aumento dell'incidenza di ricaduta della neoplasiaematologica a causa di una eccessiva T deplezione. D'altra parte la GVHD è più frequente nei pazienti anziani e/o con comorbidità, che rappresentano la popolazione a cui vengono destinati i condizionamenti RIC, e ha un impatto negativo significativo sia sulla sopravvivenza che sulla qualità di vita post trapianto. Da questa esigenza clinica nasce la necessità di testare l'aggiunta di una T deplezione alla combinazione CNI+antimetabolita nel trapianto RIC, che è diventata oggetto di recenti studi clinici^{30,31} ed è un campo in espansione.

La ricerca clinica del presente progetto si è incentrata sull'analisi dei principali endpoints clinici dei pazienti sottoposti a trapianto condizionato con regime a ridotta intensità che hanno ricevuto come profilassi antimetabolita+CNI+ATLG presso il nostro centro.

In secondo luogo, i diversi studi sull'ATG differiscono per preparazione utilizzata (ATG Thymo vs ATLG Grafalon), dose totale e schedula di somministrazione; non vi è quindi ad oggi una "Posologia" ottimale dell'ATLG, che negli studi clinici varia tra 30 mg/kg totali e 60 mg/kg totali per ATLG Grafalon (*utilizzata nel presente lavoro come preparazione*) e 2.5 mg/kg – 7.5 mg/kg (fino a 10 nei lavori più datati) per ATG Thymo.

La dose totale di ATG/ATLG somministrata è di rilevanza clinica in quanto dosi più alte sono state associate a una maggior tasso di infezioni e mortalità infettiva post trapianto.³²

E' stato inoltre dimostrato che non è la dose sola a influire sul tasso di infezioni e la mortalità infettiva post trapianto, bensì l'interazione tra la dose totale somministrata e la conta linfocitaria assoluta nel primo giorno della somministrazione (ALC).²⁹ Essendo i linfociti il principale target dell'ATG, i pazienti con ALC inferiori verosimilmente legano meno ATG e ne rimane una quota libera maggiore

nel post trapianto che ritarda l'immunoricostruzione e aumenta la morbilità e la mortalità infettiva. Pazienti con ALC inferiore dovrebbero quindi ricevere dosi di ATG inferiori.

Eleganti studi di farmacocinetica di popolazione hanno ulteriormente mostrato che, a parità di dose totale somministrata, esiste una notevole variabilità interindividuale nell'esposizione al farmaco (misurata in termini di livelli a giorni stabiliti e AUC), parzialmente imputabile all'ALC, e che questa è a sua volta correlata all'outcome clinico finale; pazienti con AUC più elevata hanno un minor rischio di sviluppare GVHD acuta e cronica e una maggiore incidenza di PTLD EBV+.^{32,33}

Gli studi di farmacocinetica e farmacodinamica hanno inoltre evidenziato che l'AUC dell'ATG prima e dopo l'infusione del graft hanno un impatto diverso sugli outcome clinici, in particolare un AUC dell'ATG maggiore PRIMA dell'inoculo si associa a una minore incidenza di GVHD acuta (grado 2-4, grado 3-4) e cronica, mentre una AUC dell'ATG maggiore DOPO l'inoculo comporta un ritardo nell'immunoricostruzione (alias un numero inferiore di T CD4+ entro il day +100) che a sua volta si traduce in maggiore mortalità infettiva (e da ricaduta nelle neoplasie mieloidi) e ridotta sopravvivenza.^{34,35}

Poiché una AUC maggiore nel pre-trapianto aumenta la protezione nei confronti della GVHD senza impattare negativamente sulla ricostituzione immunologica, la schedula del nostro centro, mutuata dalle esperienze pediatriche, è basata su una somministrazione più precoce dell'ATLG rispetto ai trial randomizzati: dal giorno -6 al giorno -2.

Dal momento che nel pre-trapianto non vi sono cellule del donatore, viene da chiedersi quali fattori ricevente-specifici determinino una diversa AUC dell'ATLG nel pre-trapianto. Considerata l'eterogeneità di legame del siero policlonale, è improbabile che l'ALC sia l'unico determinante della variabilità dell'AUC pre-trapianto.

La ricerca biologica di questo progetto di dottorato è stata pertanto incentrata sull'identificazione di potenziali fattori ricevente specifici che contribuissero al rischio di GVHD e all'esposizione all'ATLG, con particolare riferimento allo studio di fattori di derivazione endoteliale, essendo l'endotelio il primo "organo" del ricevente con cui l'ATLG infusa entra in contatto, ed essendo noto che nel siero policlonale ATLG vi sono anticorpi in grado di legare la superficie endoteliale.

STUDIO CLINICO: ATLG come T deplezione aggiuntiva a CNI+antimetabolita nei trapianti RIC/NMA

PREMESSE

La profilassi migliore della GVHD per i pazienti che ricevono un condizionamento a ridotta intensità non è standardizzata e l'uso della duplice combinazione CNI+antimetabolita si associa a un tasso non trascurabile di GVHD acuta e cronica.

I pazienti sottoposti a trapianto con condizionamento RIC sono poco rappresentati all'interno dei trial randomizzati con ATG/ATLG e dati derivanti da studi retrospettivi e non randomizzati hanno riportato risultati contrastanti sull'impatto dell'ATLG/ATG nei RIC, influenzati anche dalla dose e dalla preparazione utilizzata. Basse dosi (5 mg/kg di ATG Thymo) non sono state associate a un aumento del rischio di ricaduta, a fronte di un beneficio nella riduzione della GVHD acuta severa.³⁶ Viceversa, una T deplezione più profonda con ATG a dosi maggiori o Alemtuzumab è stata associata ad un aumento del rischio di ricaduta e a una inferiore DFS.³⁷ Sulla base della revisione dei dati disponibili, una consensus di esperti (Bonifazi et al 2020) ha concluso che *"In reduced intensity or nonmyeloablative conditioning regimens, ATG/ATLG was deemed appropriate to reduce the incidence of acute and chronic GvHD, but a higher risk of relapse should be taken into account."*³⁸ Presso il nostro centro, l'uso di ATLG (Grafalon, Neovii) alla dose di 30 mg/kg è incorporato nella profilassi standard dei pazienti che ricevono un condizionamento RIC e PBSC come fonte. L'obiettivo principale di questo lavoro è analizzare retrospettivamente gli outcome clinici rilevanti dei pazienti trattati con questa schedula.

METODI

Disegno dello studio e criteri di inclusione

In questo studio retrospettivo monocentrico sono stati inclusi pazienti sottoposti a trapianto allogenico tra il 2019 e il 2024 presso l'UOC Trapianto e Terapie Cellulari in Ematologia dell'IRCCS AOU Sant'Orsola di Bologna, con condizionamento a ridotta intensità (RIC).

La definizione di RIC è stata basata sui criteri standard (Bacigalupo et al 2009), in base ai quali è stato considerato a ridotta intensità un regime a base di Busulfano a dose ≤ 8 mg/kg ev e/o TBI ≤ 8 Gy a dosi frazionate e/o Melfalan ≤ 140 mg/mq.

Altri criteri di inclusione sono stati:

- Pazienti adulti (≥ 18 anni) affetti da neoplasie ematologiche (escluse le malattie non neoplastiche);
- Uso di cellule staminali mobilizzate nel sangue periferico come fonte (PBSC);
- Donatore familiare HLA-identico (8/8, 10/10) o matched unrelated (8/8, ai loci -A, -B, -C, -DRB1) o mismatch unrelated (7/8 ai loci -A, -B, -C, -DRB1);
- Profilassi della GVHD basata sulla triplice combinazione di inibitore della calcineurina (ciclosporina o tacrolimus) + antimetabolita (Metotrexato o Micofenolato) + ATLG (Grafalon).

La schedula di Metotrexato usata in associazione ai RIC presso il nostro centro è la seguente: 10 mg/mq al giorno +1, 8 mg/mq ai giorni +3 e +6. Il MMF è stato somministrato alla dose di 10-15 mg/kg ogni 8 ore fino al +30. Il dosaggio della CSA è stato modulato in base ai livelli plasmatici.

L'ATLG è stata somministrata alla dose totale di 30 mg/kg, suddivisi in 5 somministrazioni da 6 mg/kg/die dal giorno -6 al giorno -2 rispetto all'infusione del graft, ciascuna della durata di 12 ore (infusione endovenosa).

Data collection, endpoints e analisi statistica

I dati sono stati raccolti retrospettivamente dalle cartelle cliniche scannerizzate relative al ricovero per il trapianto allogenico, nelle quali è riportata l'anamnesi ematologica, lo stato di malattia al momento del trapianto, la tipizzazione HLA ad alta risoluzione del ricevente e del donatore, i dati salienti del donatore (gruppo sanguigno, età, CMV status, genere), il regime di condizionamento, lo schema di profilassi della GVHD, la lettera di dimissione contenente i dati di engraftment e le complicanze precoci.

Per l'aggiornamento relativo allo sviluppo della GVHD acuta e/o cronica, la ricaduta e la sopravvivenza globale è stata consultata la relazione di visita di Day Hospital/Ambulatorio, aggiornata all'ultimo accesso del paziente.

L'endpoint primario è stata l'incidenza cumulativa di GVHD acuta e cronica.

In dettaglio:

- Incidenza cumulativa di GVHD acuta di grado II-IV e di grado III-IV a 100 giorni e a 1 anno dal trapianto

- Incidenza cumulativa di GVHD cronica e GVHD cronica moderata-severa a 1 anno e 2 anni dal trapianto

La GVHD acuta è stata gradata secondo i criteri del Consorzio MAGIC (Harris 2016).³⁹

La GVHD cronica è stata classificata secondo i criteri NIH 2015.⁴⁰

Gli **endpoint secondari** analizzati sono stati:

- Incidenza cumulativa di ricaduta della malattia ematologica di base (CIR, cumulative incidence of relapse) e Non relapse mortality (NRM) definita come morte in assenza di ricaduta della malattia ematologica a 1 anno e 2 anni;

- La sopravvivenza libera da ricaduta (Relapse Free Survival, RFS) definita come l'intervallo di tempo tra il trapianto e l'evento ricaduta della neoplasia ematologica di base o morte, qualunque degli eventi si verificasse prima;

- La sopravvivenza globale (Overall Survival, OS), definita come l'intervallo di tempo tra il trapianto e l'evento morte;

- La GFRS definita come la sopravvivenza libera da ricaduta, GVHD acuta di grado III-IV, GVHD cronica con necessità di immunosoppressione.

La RFS, la OS e la GRFS sono state stimate con lo stimatore di Kaplan-Meier.

Le incidenze cumulative di GVHD acuta e cronica, di ricaduta e la non relapse mortality sono state stimate con il test di incidenza cumulativa con eventi competitivi (pacchetto CMPSK di R), considerando la ricaduta come evento competitivo per la non relapse mortality e viceversa e

considerando come eventi competitivi per la GVHD (sia acuta che cronica) la ricaduta e la morte. Le analisi sono state condotte con Easy R.

RISULTATI

Sono stati analizzati 121 pazienti, sottoposti a trapianto di cellule staminali allogeniche presso l'IRCCS AOU Sant'Orsola di Bologna tra il 2019 e il 2024, che avessero ricevuto un condizionamento a ridotta intensità (RIC) e una triplice profilassi della GVHD contenente CNI+antimetabolita (metotrexato o micofenolato) e ATLG.

Nella tabella sottostante (**Tab. 1**) sono riassunte le caratteristiche della popolazione.

L'età mediana è stata di 63 anni (IQR 56-67), il 62.8% dei riceventi era di sesso maschile.

Il 47.1% dei pazienti aveva un Sorrow basso (0-2) ed ha ricevuto un condizionamento a ridotta intensità per età e/o diagnosi di Linfoma.

La diagnosi più frequente era la Leucemia Acuta Mieloide (**48%**), seguita dai Linfomi (**21.5%**) e dalle Sindromi Mieloproliferative Croniche (**16.5%**), diagnosi meno frequenti le Sindromi Mielodisplastiche (**7.4%**) e la Leucemia Linfoblastica Acuta (**6.6%**).

Tra i pazienti con LAM (N=58), 7 (12%) avevano un rischio ELN2017 favorevole e sono stati trapiantati per MRD positività, 19 (32.8%) avevano un rischio ELN2017 intermedio e 28 (48.3%) un rischio ELN2017 sfavorevole, nei rimanenti 4 non era valutabile; 40 (69%) erano in I remissione morfologica completa (CR1) al momento del trapianto, 4 (6.9%) in II remissione morfologica completa (CR2) e 14 (24.1%) non erano in remissione (>5% blasti). I pazienti con LAL erano in CR1 (5/8) o CR2 (3/8). I pazienti con SMD sono stati trapiantati upfront, con o senza Azacitidina-bridge, ed erano in malattia stabile al momento del trapianto. I pazienti con MPN erano in I fase cronica (15/20) o in fase accelerata (5/20). I pazienti con Linfoma erano affetti da Linfoma T (9/26, 4 in CR1, e 5 in CR2) o Linfoma di Hodgkin (5/26, 2 PR, 3 CR>2), Leucemia Linfatica Cronica (4/26) ad alto rischio, Linfomi Non Hodgkin B in remissione successiva alla seconda.

Tutti i pazienti hanno ricevuto come fonte di cellule staminali allogeniche le periferiche (PBSC). Il donatore è stato un donatore volontario da registro nella maggior parte dei casi, matched unrelated (MUD, ai loci -A, -B, -C, -DR) nel **63.6%** dei casi, e MMUD (1 incompatibilità ai loci -A, -B, -C, -DR) nel **29.8%** dei casi; solo il **6.6%** dei pazienti ha ricevuto le PBSC da un fratello HLA-identico. L'età mediana dei donatori è stata di 28 anni e il 12.4% dei pazienti ha ricevuto un mismatch di genere sfavorevole (donatrice femmina in ricevente maschio).

Il 48% dei pazienti ha ricevuto un condizionamento a base di Busulfano 6.4 mg/kg, il 20.7% un condizionamento a base di Treosulfano 30 g/mq e il 21.4% un condizionamento con Tiotepa-Fludarabina-Ciclofosfamide (Corradini et al). Quest'ultimo è stato impiegato nei pazienti con diagnosi di Linfoma.

La maggior parte dei pazienti ha ricevuto come CNI la Ciclosporina (95.1%), in associazione al Metotrexato (68.7%) o al Micofenolato (26.4%).

Tab.1

Caratteristiche della popolazione	Numero totale di pazienti N= 121
Età, mediana (range min-max)	63 (20-72)
Sesso, n (%)	
- M	76 (62.8)
- F	45 (37.2)
Diagnosi	
- LAM	58 (48)
- LAL	8 (6.6)
- SMD	9 (7.4)
- SMC	20 (16.5)
- Linfoma	26 (21.5)
HCT-CI (Sorrer), n (%)	
- 0-2	57 (47.1)
- ≥3	62 (51.2)
- Missing	2 (1.7)
N. linee terapeutiche pre-, mediana (range min-max)	1 (0-8)
Tipo di donatore, n (%)	
- Familiare HLA identico	8 (6.6)
- Unrelated	113 (93.4)
MUD 8/8	77 (63.6)
MMUD 7/8	36 (29.8)
Età del donatore, mediana (range min-max)	28 (18-65)
Donatrice femmina in ricevente maschio	15 (12.4)
Condizionamento	
- TT-Bu2-Flu	58 (48)
- Treo-Flu	25 (20.7)
- TT-CY-Flu	26 (21.4)
- Other	12 (9.9)
Profilassi GVHD	
- CSA+MTX+ATLG	83 (68.7)
- CSA+MMF+ATLG	32 (26.4)
- FK+MMF+ATLG	5 (4.1)
- FK+MTX+ATLG	1 (0.8)

Abbreviazioni: LAM (Leucemia Acuta Mieloide), LAL (Leucemia Acuta Linfoblastica), SMD (Sindrome Mielodisplastica), SMC (Sindrome Mieloproliferativa Cronica), HCT-CI (Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index), MUD (Matched Unrelated Donor), MMUD (Mismatched Unrelated Donor), TT-Bu2-Flu (Tiotepa-Busulfano-Fludarabina), Treo-Flu (Treo-sulfano-Fludarabina), TT-CY-Flu (Tiotepa-Ciclofosfamide-Fludarabina), CSA (Ciclosporina), MTX (Metotrexato), MMF (Micofenolato mofetile), FK (Tacrolimus).

GVHD ACUTA

A un follow-up mediano di circa 16 mesi (447 giorni), 47 pazienti (38.8%) hanno sviluppato GVHD acuta (aGVHD) di qualsiasi grado, 35 pazienti (28.9%) hanno avuto GVHD acuta di grado II-IV e 10 (8.3%) di grado III-IV. La GVHD acuta è insorta a una mediana di 35 giorni (95% C.I. 29-42).

L'incidenza cumulativa (C.I.) stimata di GVHD acuta **a 100 giorni è del 27%** (95% C.I. 20%-35%) per il **grado II-IV** e **6%** (95% C.I. 3%-12%) per il **grado III-IV**; a 1 anno 29% (95% C.I. 21%-37%) per il grado II-IV e dell'8% (95% C.I. 4%-14%) per il grado III-IV (**Fig. 5A e B**).

GVHD ACUTA grado II-IV

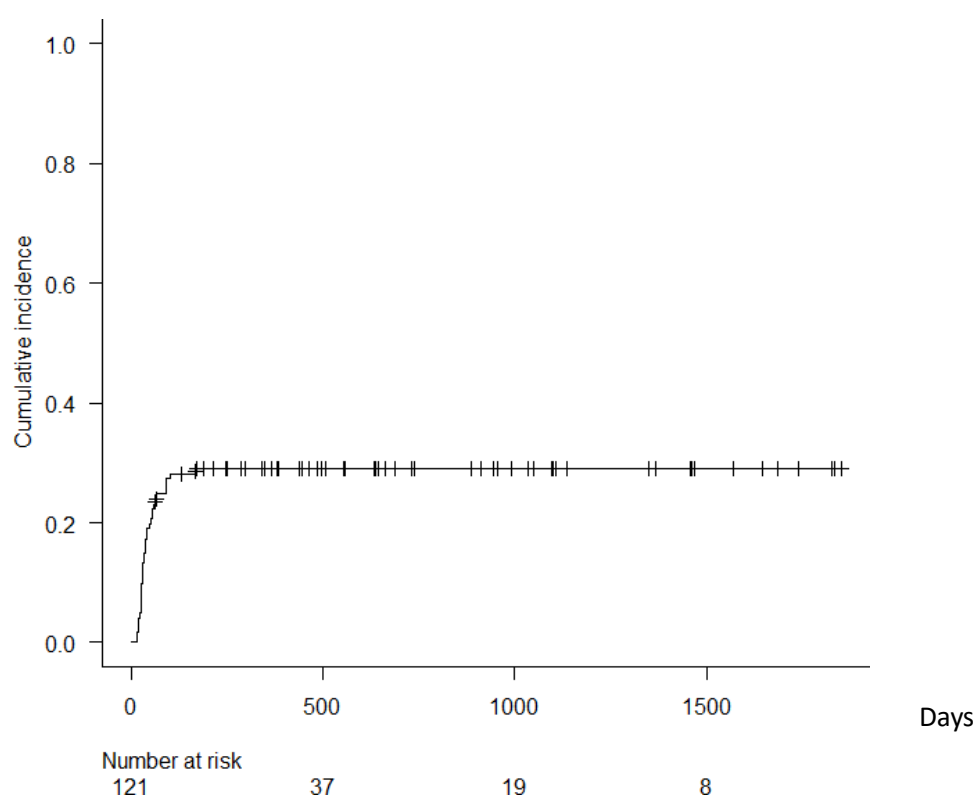


FIG. 5A : Incidenza cumulativa di GVHD acuta di grado II-IV

GVHD ACUTA grado III-IV

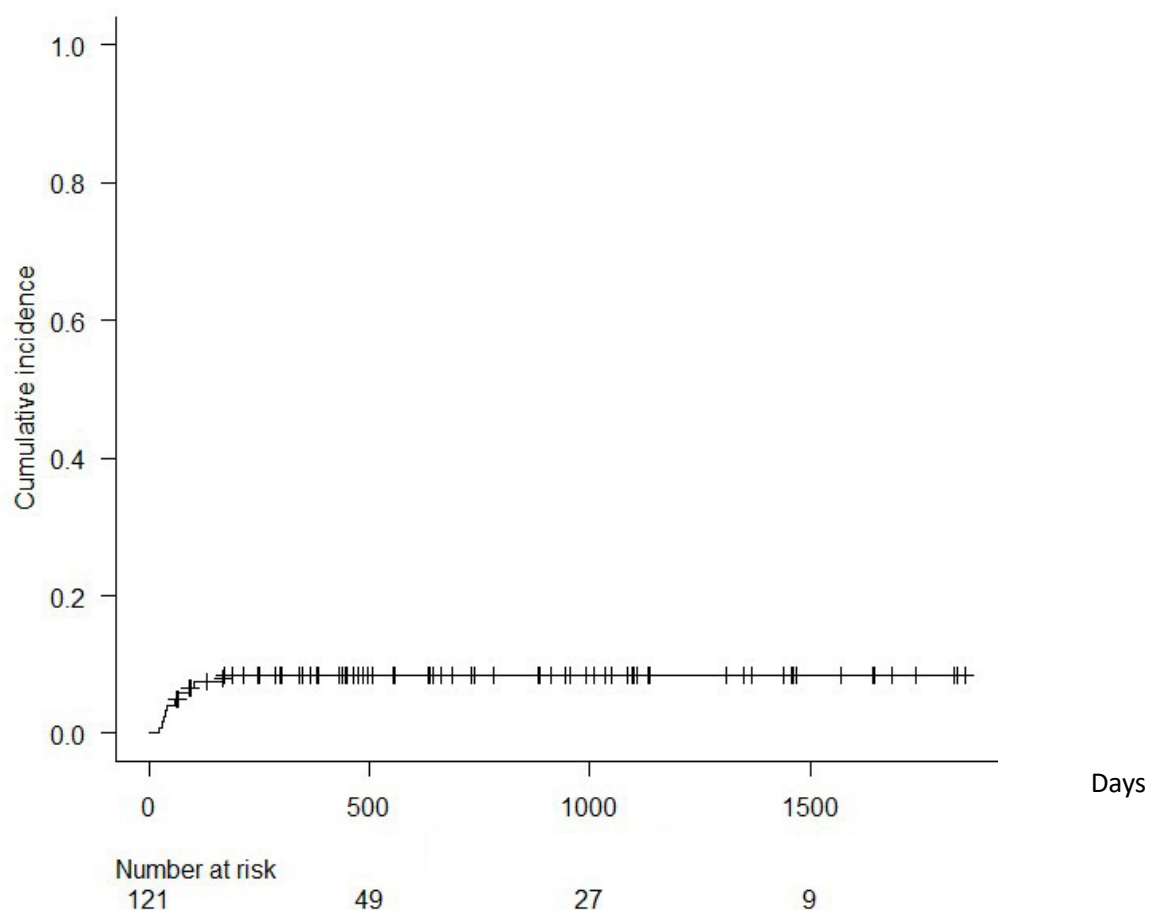


Fig. 5 B : Incidenza cumulativa di GVHD acuta di grado III-IV

L'incidenza cumulativa di GVHD acuta di grado II-IV è risultata **significativamente più alta nei pazienti con donatore 7/8 vs 8/8, a 100 giorni 50% (95% C.I. 33-65%) vs 20% (95% C.I. 12-30%)** (Gray test, **p=0.001, Fig. 5C**); tuttavia se si considerano solo i gradi più severi III-IV la differenza non è statisticamente significativa, a 100 giorni 8% (95% C.I. 2-20%) per i pazienti con donatore MMUD 7/8 vs 6% (95% C.I. 2-12%) per i donatori MUD 8/8 (Gray test p=0.486).

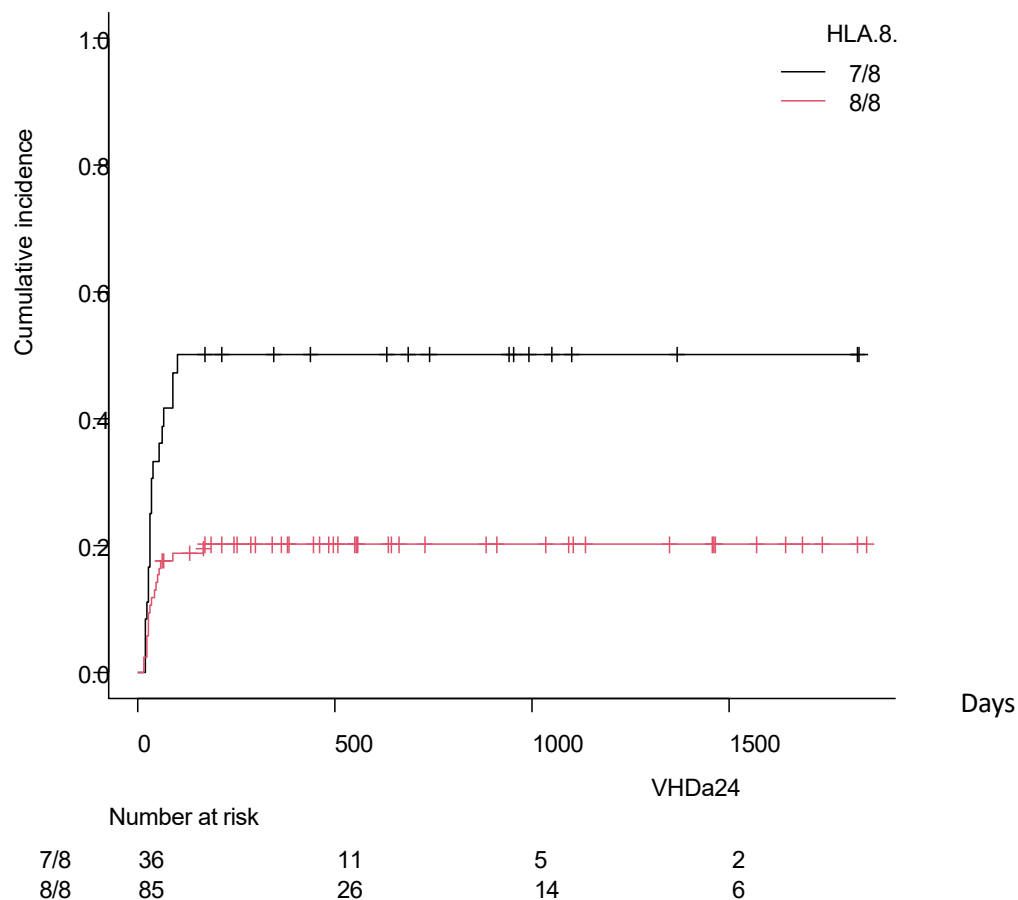


Fig. 5C : Incidenza cumulativa di GVHD acuta di grado II-IV in base al donatore HLA 7/8 (curva nera) vs 8/8 (curva rossa)

GVHD CRONICA

Al follow-up mediano, 33 pazienti (27.3%) hanno sviluppato una GVHD cronica (c GVHD) e 24 (19.8%) una cGVHD moderata-severa (secondo i criteri NIH 2015).

La GVHD cronica si è manifestata a una mediana di 176 giorni (95% C.I. 110-216).

L'incidenza cumulativa stimata di GVHD cronica di qualsiasi grado è del **27%** (95% C.I. 19%-36%) a **1 anno** e del 29% (95% C.I. 21%-38%) a 2 anni (**Fig. 6 A**); con una incidenza maggiore nei pazienti con donatore 7/8, a 1 anno 34% (95% C.I. 19-50%) vs 24% (95% C.I. 15-34%), sebbene non statisticamente significativa (Gray test, $p=0.089$). L'incidenza cumulativa di GVHD cronica **moderata-severa** è del **20%** (95% C.I. 13%-28%) a **1 anno** e del 22% (95% C.I. 14%-30%) a 2 anni (**Fig. 6 B**), con una incidenza maggiore nei pazienti con donatore 7/8, a 1 anno 29% (95% C.I. 15-44%) vs 16% (95%

C.I. 9-25%, $p=0.084$).

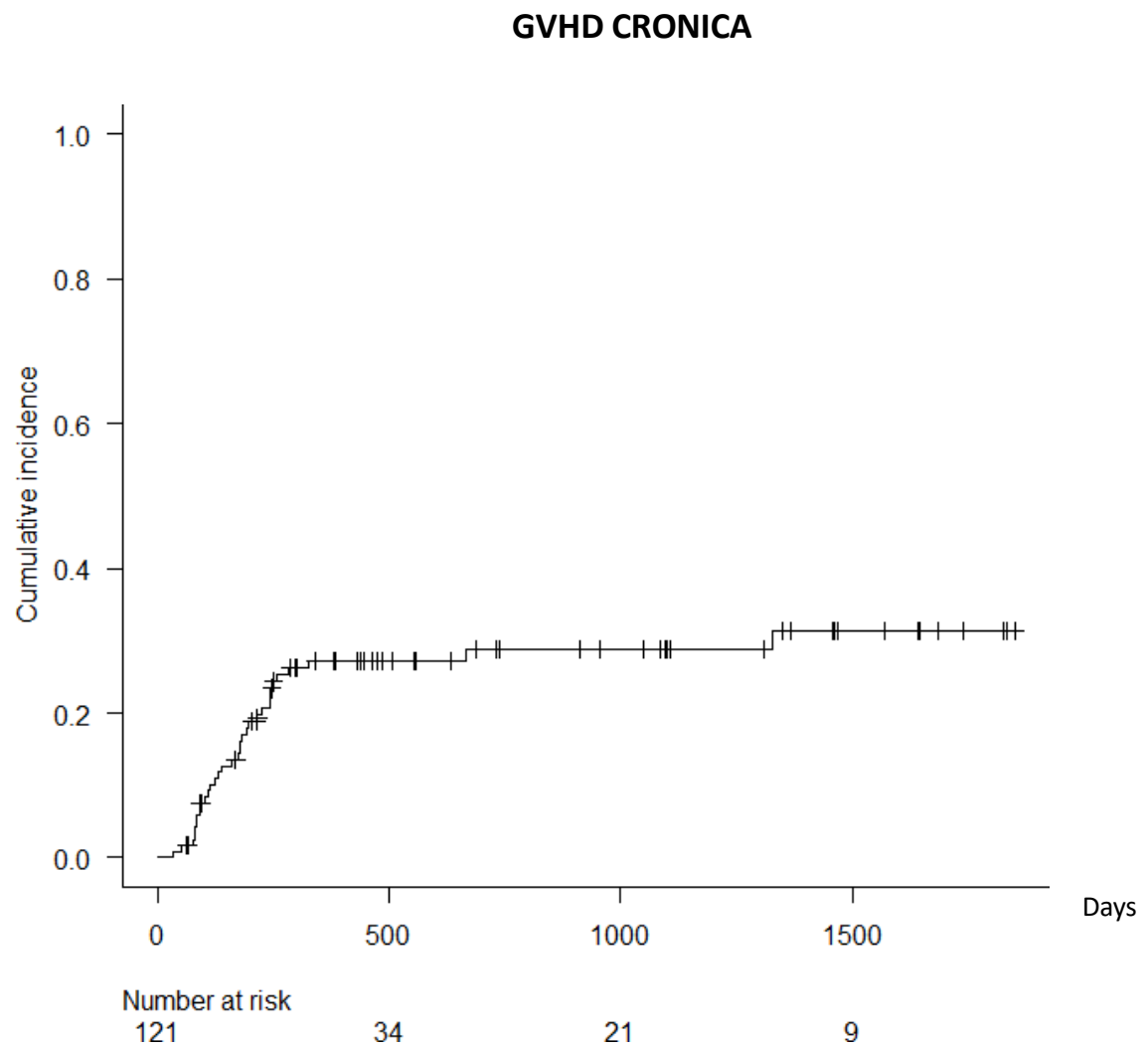


Fig. 6A : Incidenza cumulativa di GVHD cronica di qualsiasi grado

GVHD CRONICA MODERATA-SEVERA

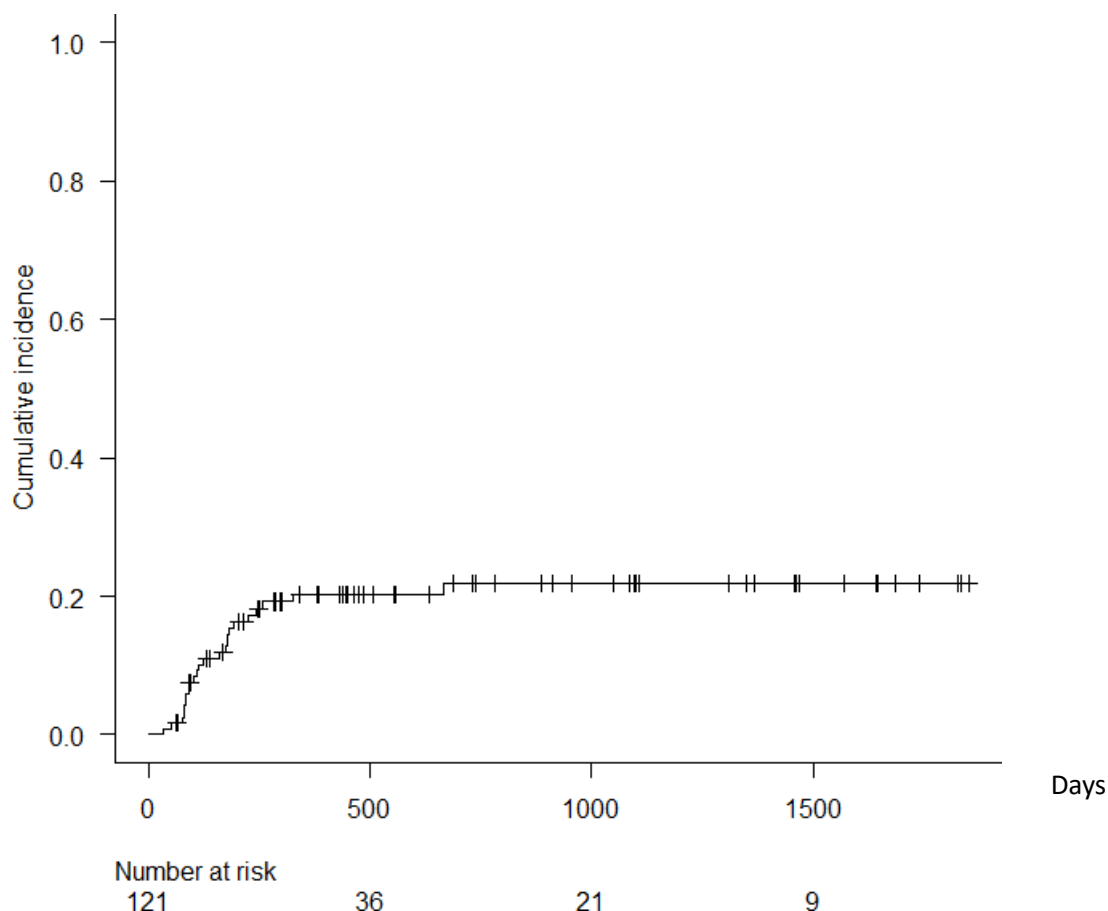


Fig. 6B: Incidenza cumulativa di GVHD cronica moderata-severa

RICADUTA E NON RELAPSE MORTALITY

Al follow up mediano si sono verificati 28 eventi di ricaduta (23.1%) e 15 morti non da ricaduta (12.4%). Tra i 28 ricaduti, 15 erano affetti da LAM, di cui 8 con malattia refrattaria al trapianto (6 in CR1, 1 in CR2).

L'incidenza di **ricaduta** è stata del **22%** (95% C.I. 15%-30%) **a 1 anno** e del **25%** (95% C.I. 17%-34%) **a 2 anni**. La **Non relapse mortality** è stata del **12%** (95% C.I. 7%-19%) **a 1 anno** e del **14%** (95% C.I. 9%-21%) **a 2 anni**, senza differenze significative in base al tipo di donatore (**Fig. 7**).

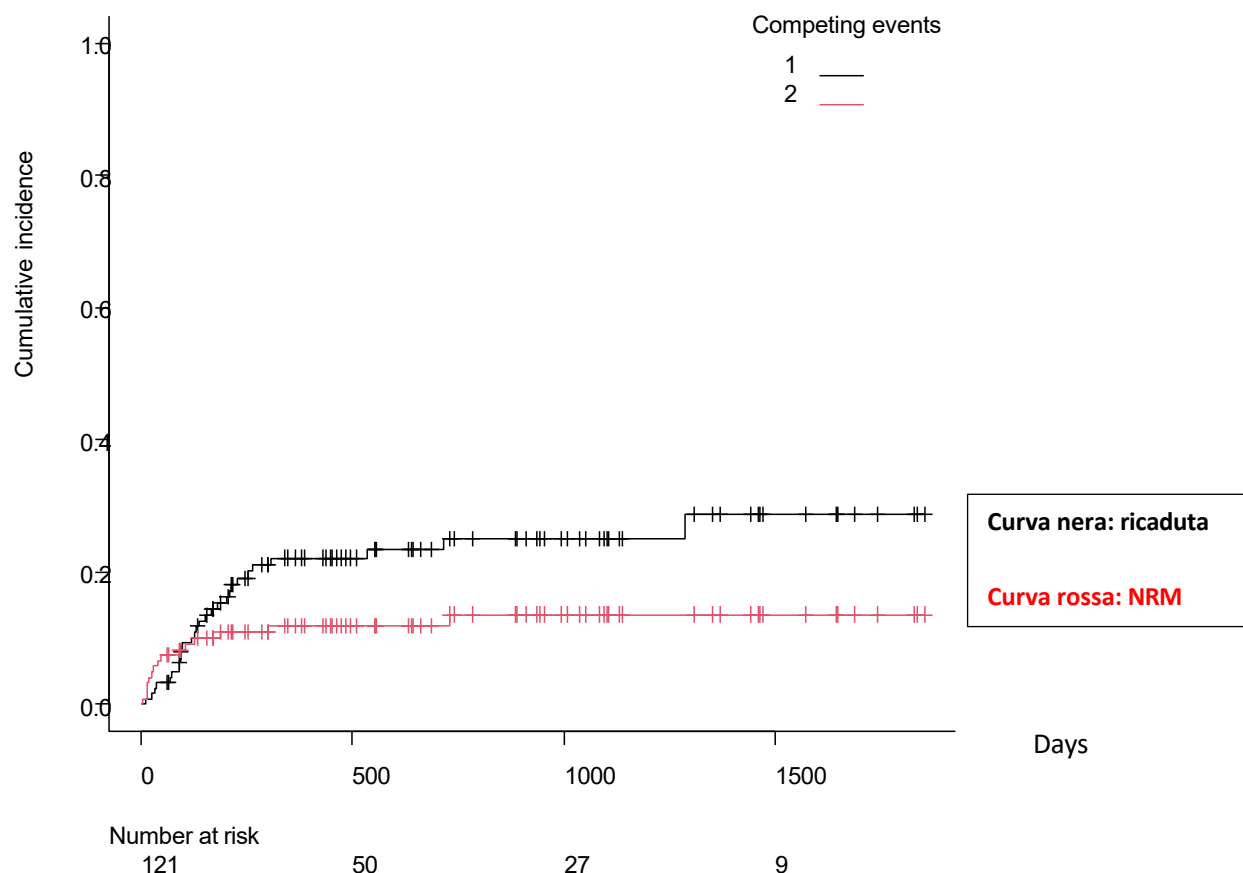


Fig. 7: Incidenza cumulativa di ricaduta (curva nera) e NRM (curva rossa)

RELAPSE FREE SURVIVAL E OVERALL SURVIVAL

Al follow-up mediano, 35 pazienti sono morti (28.9%), 20 a causa della ricaduta della neoplasia ematologica di base (13 LAM, 1 LMMC in fase accelerata, 1 LMC in fase blastica, 1 MF in fase accelerata, 2 LAL, 2 Linfomi); le morti non da ricaduta sono state causate nella maggior parte dei casi da infezioni, solo 3 pazienti sono morti a causa della GVHD acuta di grado 3-4 refrattaria ai trattamenti.

A un anno la RFS stimata è del 66% (95% C.I. 56-74%) e la OS del 74% (95% C.I. 65-82%); a 2 anni la RFS stimata è del 61% (95% C.I. 51-70%) e la OS del 69% (95% C.I. 58-77%) (Fig. 8 e 9).

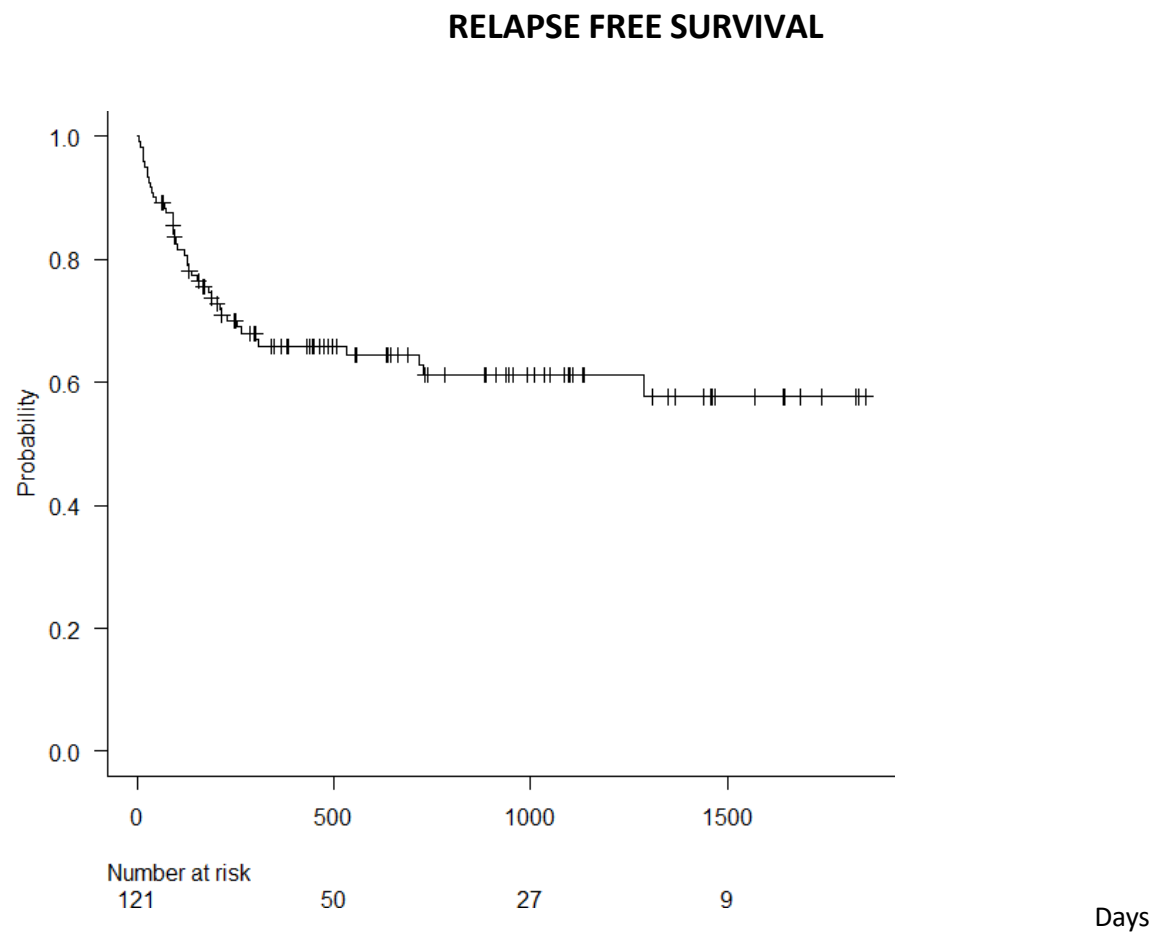


Fig. 8: Curva di relapse free survival

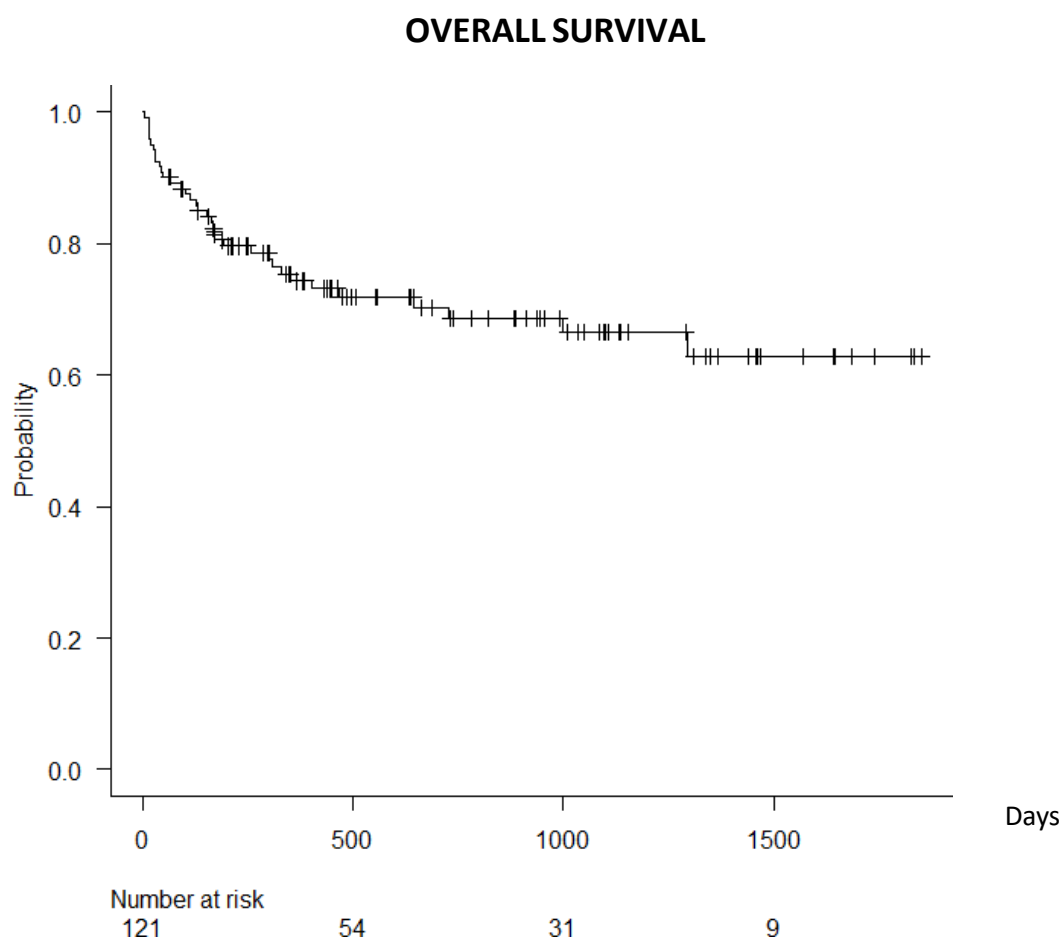


Fig. 9: Curva di Overall Survival

GRAFT FREE RELAPSE FREE SURVIVAL

A un anno la GFRS stimata è del 46.8% (95% C.I. 37.4%-55.6%) e a 2 anni è del 43.8% (95% C.I. 34.2%-53%) (**Fig. 10**).

GRAFT FREE RELAPSE FREE SURVIVAL

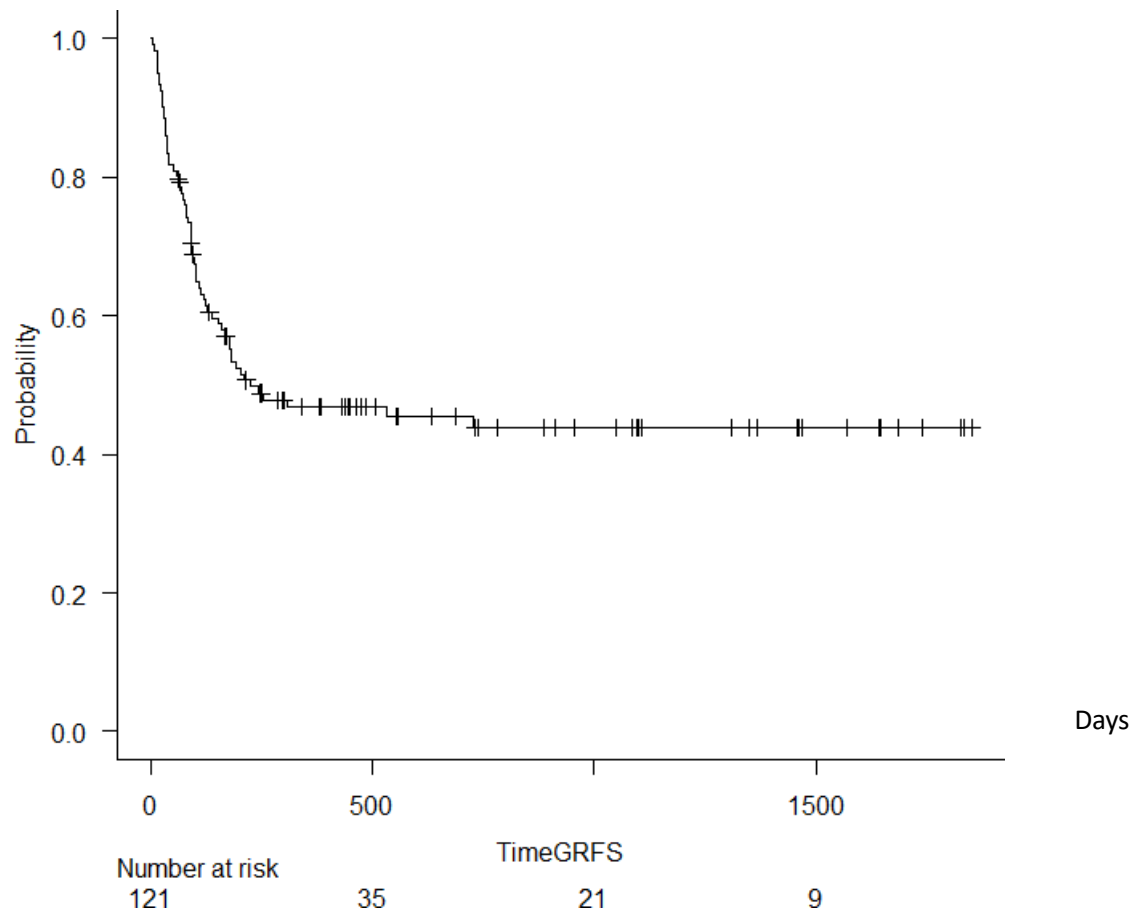


Fig. 10 : Curva di Graft free Relapse Free Survival

DISCUSSIONE

L'introduzione dei regimi di condizionamento a ridotta intensità ha permesso di estendere la trapiantabilità a pazienti anziani e/o con comorbidità, per minore non relapse mortality, a spese di un teorico aumento del rischio di ricaduta, confermato da dati retrospettivi. La profilassi ottimale della GVHD nei pazienti candidati a condizionamento RIC non è standardizzata e il rischio di GVHD acuta e cronica che richiedono immunosoppressione è di particolare rilevanza in una popolazione di pazienti, di base anziani e con maggiore fragilità.

La duplice combinazione di CNI+antimetabolita potrebbe non essere sufficiente, soprattutto con l'uso crescente delle periferiche come fonte e in caso di donatori alternativi.

Nel 2013 il BMT CTN (Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network) ha lanciato uno studio clinico di fase 2³⁰ (BMT CTN 1203) di confronto tra 3 diverse strategie di profilassi nei pazienti sottoposti a trapianto con condizionamento RIC: Ciclofosfamide + Tacrolimus + Micofenolato vs Tacrolimus + Bortezomib + Metotrexato vs Tacrolimus + Metotrexato + Maraviroc. Il trial ha dimostrato la superiorità della combinazione Ciclofosfamide + Tacrolimus + Micofenolato in termini di GRFS (GVHD-free relapse-free survival), pertanto questa tripletta è stata scelta come braccio di confronto rispetto allo standard di Tacrolimus + Metotrexato in un trial di fase III (BMT CTN 1703) recentemente pubblicato sul NEJM (Bolanos 2023).³¹

In questo studio, pazienti adulti affetti da neoplasia ematologica e sottoposti a trapianto di PBSC allogeniche da donatore MRD o MUD o MMUD (7/8), con condizionamento a ridotta intensità, sono stati randomizzati 1:1 a ricevere ciclofosfamide-tacrolimus-micofenolato mofetil (braccio sperimentale) or tacrolimus-metotrexato (braccio standard).

L'endpoint primario era la GRFS a 1 anno (sopravvivenza libera da GVHD acuta di grado III-IV, GVHD cronica necessitante immunosoppressione, ricaduta della neoplasia ematologica), ed è risultato superiore nel braccio sperimentale (52.7% vs 34.9%).

I pazienti nel braccio sperimentale hanno avuto una minore incidenza di GVHD acuta severa (al day 100 GVHD III-IV 6.3% con PT-CY vs 14.7% senza) o cronica (a 1 anno 21.9% con PT-CY vs 35.1% senza), e di conseguenza una maggiore sopravvivenza libera da immunosoppressione a 1 anno dal trapianto.

Viceversa, non ci sono state differenze significative tra i due gruppi in termini di GVHD acuta di grado II-IV a 100 giorni (52-54%), sopravvivenza globale (OS 72-77% a 1 anno) sopravvivenza libera da malattia (DFS 62-67% a 1 anno), ricaduta (CIR 20% a 1 anno), e non relapse mortality (NRM 12-17% a 1 anno) né in termini di engraftment. Pur con i limiti di uno studio retrospettivo monocentrico e senza braccio di confronto e con il bias di popolazioni in parte differenti, i nostri risultati comparano favorevolmente con quelli del braccio sperimentale dello studio del NEJM.³¹

Nel nostro studio la GVHD acuta di grado II-IV a 100 giorni è del 27%, inferiore a quella riportata in letteratura, e di grado III-IV 6%, analoga a quella riportata in letteratura con l'uso della PT-CY e inferiore a quella riportata usando CNI+antimetabolita.

La GVHD cronica moderata severa a un anno è del 20% e globale del 27%, dati paragonabili al braccio con PT-CY del lavoro di Bolanos e al braccio sperimentale con ATG (Thymo 4.5 mg/kg) dello studio di Walker 2015 (22% a 1 anno)²⁸.

I risultati sulla mortalità, l'incidenza di ricaduta e la sopravvivenza appaiono soddisfacenti con un'incidenza di ricaduta a 1 anno del 22%, una NRM a 1 anno del 12%, una RFS a 1 anno del 66% e una OS del 74%, del tutto in linea con il braccio sperimentale di Bolanos 2023. In entrambi i lavori il 48% della popolazione era affetto da Leucemia acuta Mieloide, nel nostro studio vi è una percentuale maggiore di pazienti con Linfoma e una minore di pazienti con MDS. E' inoltre importante sottolineare che nella nostra popolazione il 30% dei pazienti ha ricevuto il graft da un donatore MMUD. In questo sottogruppo l'incidenza cumulativa di GVHD acuta di grado II-IV a 100 giorni è del 50%, significativamente superiore a quella dei pazienti con donatore full matched, non emergono invece differenze significative in termini di GVHD cronica sebbene si conferma un trend di superiore incidenza di GVHD cronica e cronica moderata-severa in caso di mismatch. Da questi ultimi risultati appare evidente come il matching HLA sia un fattore di rischio importante per la GVHD utilizzando ATLG come profilassi, è da chiarire se nel setting del trapianto RIC valga lo stesso con PT-CY. I dati del nostro studio, come quelli con PT-CY, supportano l'utilizzo di un terzo agente, in associazione a CNI e antimetabolita, per la profilassi della GVHD nei pazienti sottoposti a condizionamento RIC.

La scelta del terzo agente, tra PT-CY e ATLG, non è al momento supportata da trial clinici di confronto diretto e si basa sull'esperienza del centro e sulla presenza di eventuali controindicazioni, in particolare il rischio di cardiotossicità associato alla Ciclofosfamide. E' in corso un trial clinico randomizzato (NCT04888741) di confronto diretto di 3 differenti strategie di profilassi della GVHD nei pazienti sottoposti a trapianto con regime di condizionamento a ridotta intensità: ATG (Thymo 5 mg/kg) + CSA + MMF vs PT-CY + CSA + MMF vs PT-CY + Sirolimus + MMF, i cui risultati saranno fondamentali per le raccomandazioni future.

STUDIO BIOLOGICO: Identificazione di fattori biologici del ricevente che contribuiscono alla diversa esposizione all'ATLG

PREMESSE

L'analisi di efficacia e sicurezza dell'ATG/ATLG nella profilassi della GVHD è resa più complessa dalla eterogeneità delle formulazioni e delle schede posologiche utilizzate nei differenti trial clinici e della diversa esposizione del singolo paziente al farmaco, misurata mediante AUC, a parità di dose somministrata e schedula di somministrazione.

Poiché è noto da studi precedenti^{34,35} che una AUC maggiore nel pre-trapianto aumenta la protezione nei confronti della GVHD senza impattare negativamente sulla ricostituzione immunologica, la schedula del nostro centro, mutuata dalle esperienze pediatriche, è basata su una somministrazione più precoce dell'ATLG rispetto ai trial randomizzati: dal giorno -6 al giorno -2.

Nella parte iniziale del lavoro del nostro gruppo (Storci et al 2023)⁴¹ è stata verificata la correlazione tra esposizione al farmaco in termini di AUC delle diverse sottopopolazioni leucocitarie e outcome clinico, in termini di GVHD, usando la nostra schedula e preparazione. E' stato confermato che, anche alla posologia da noi utilizzata, vi è una correlazione tra l'AUC dell'ATLG e l'insorgenza della GVHD: pazienti con esposizione maggiore al farmaco (AUC superiore, misurata come frazione specifica legante le cellule CD45+, le CD45+CD3+ e le CD45+CD3+CD4+) hanno un minor rischio di sviluppare GVHD. Questa correlazione tra esposizione ed outcome è valida sia considerando la AUC dal giorno -6 al +15 che facendo riferimento unicamente alla fase pre-infusione, dal giorno -6 al giorno 0.

Il dato è coerente con quanto riportato in letteratura.^{32,33}

Considerata l'eterogeneità di legame del siero policlonale, è improbabile tuttavia che le cellule leucocitarie e linfocitarie circolanti siano l'unico determinante della variabilità dell'AUC, soprattutto nella fase di condizionamento pre-trapianto in cui le cellule circolanti sono estremamente scarse.

Pertanto, la ricerca che abbiamo condotto che costituisce il presente lavoro, è stata incentrata sull'identificazione di potenziali fattori ricevente-specifici che contribuissero alla variabilità farmacocinetica individuale. E' noto infatti che oltre i già riconosciuti target cellulari (e.g. i linfo/leucociti circolanti), sono da considerarsi impattanti la biodisponibilità dell'ATG/ATLG anche altri target circolanti, primi fra tutti quelli di derivazione endoteliale. Essendo noto che l'endotelio il primo tessuto del ricevente con cui l'ATLG infusa entra in contatto, e che nel siero policlonale ATLG vi sono anticorpi in grado di legare la superficie endoteliale, abbiamo concentrato l'attenzione sulle popolazioni di vescicole extracellulari di derivazione primariamente endoteliale come le vescicole extracellulari CD31+ per testare l'ipotesi che tali vescicole potessero agire da "decoy" per l'ATLG. Abbiamo pertanto utilizzato una metodica di misurazione per via citofluorimetrica delle vescicole CD31+, marker di derivazione endoteliale.⁴²

MATERIALI E METODI

Popolazione studiata e schedula di somministrazione

Sono stati arruolati pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali allogeniche presso il Programma Trapianti e Terapie Cellulari Avanzate dell'IRCCS AOU di Bologna che avessero ricevuto ATLG (Grafalon, Neovii) come parte della profilassi della GVHD, di età maggiore o uguale a 18 anni.

Tutti i pazienti hanno ricevuto PBSC come fonte, da donatore matched related, MUD 8/8 e MMUD 7/8, con condizionamento sia mieloablativo che RIC.

La schedula di somministrazione dell'ATLG è stata la seguente, uguale per tutti i pazienti: 30 mg/kg tot. divisi in 6 mg/kg/die, dal giorno -6 al giorno -2 rispetto all'infusione del graft (giorno 0), con ciascuna infusione della durata di 12 ore.

I pazienti hanno fornito il consenso al prelievo dei campioni e alla raccolta dei dati in forma anonima. Lo studio è registrato come MET_SCT_2018; 151/2018/Sper/AOUBO; NCT 03871269.

Misurazione delle vescicole CD31+ (marcatore endoteliale)

Sono stati raccolti campioni di siero al giorno -6, ossia prima dell'infusione della prima dose di ATLG e all'inizio del condizionamento, e al giorno -1, ossia al termine dell'ATLG e del condizionamento, rispetto all'infusione del graft (giorno 0).

Le vescicole sono state isolate mediante ultracentrifugazione e quantificate mediante nanoparticles analyzer (nanosight).

Successivamente è stata eseguita una analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni di vescicole, immunofenotipicamente caratterizzate dall'espressione di proteine di superficie indicative della cellula d'origine (CD31, PECAM-1, marcatore endoteliale). E' stata ricercata e quantificata mediante citofluorimetria la presenza di vescicole legate all'ATLG, sia totali, sia CD31+.

Raccolta dei dati clinici e analisi statistica

E' stata utilizzata la stessa metodologia descritta nel lavoro clinico (vedi sopra).

RISULTATI

Sono stati analizzati complessivamente 100 pazienti, comprendenti la coorte esplorativa (n=23) dei pazienti in cui era stata studiata la farmacocinetica dell'ATLG (Storci et al 2023).⁴¹

Le caratteristiche demografiche, cliniche e trapiantologiche dei pazienti analizzati sono riassunte nella tabella sottostante (Tab.2):

Tab. 2

Caratteristiche della popolazione	Numero totale di pazienti N=100
Età, mediana (range)	55 (18-70)
Sesso, n (%)	
- M	56 (56)
- F	44 (44)
Diagnosi	

- LAM	50 (50)
- LAL	18 (18)
- SMD	8 (8)
- SMC Ph-	10 (10)
- LMC	5 (5)
- Linfoma	9 (9)
HCT-CI (Sorrer), n (%)	
- 0-2	50 (50)
- ≥3	50 (50)
N. linee terapeutiche pre-, mediana (range)	1 (0-7)
Tipo di donatore, n (%)	
- Familiare	7 (7)
- Unrelated	93 (93)
Compatibilità HLA, n (%)	
- 8/8	69 (69)
- 7/8	31 (31)
- 10/10	65 (65)
- 9/10	32 (32)
- 8/10	3 (3)
Condizionamento, n (%)	
- MAC	50 (50)
- RIC	50 (50)
Profilassi GVHD	
- CSA+MTX+ATLG	77 (77)
- CSA+MMF+ATLG	20 (20)
- FK+MTX+ATLG	1 (1)
- FK+MMF+ATLG	2 (2)

GVHD ACUTA

A un follow-up mediano di 21 mesi (range 1-39), la GVHD acuta di qualsiasi grado si è manifestata nel 49% dei pazienti, la GVHD acuta di grado II-IV e III-IV nel 32% e 14% dei pazienti rispettivamente.

Il tempo mediano di insorgenza è stato di 34 giorni dal trapianto (range 11-265).

La corrispondente incidenza cumulativa (C.I) stimata a 100 giorni è risultata 41% (95% C.I. 31-50%) per la GVHD acuta di qualsiasi grado e 27% (95% C.I. 19-36%) per la GVHD acuta di grado II-IV e 10% (95% C.I. 5-17%) per il grado III-IV; a 1 anno la C.I. stimata è risultata 49% (95% C.I. 39-58%) per la GVHD acuta di qualsiasi grado, 32% (95% C.I. 23%-41%) per il grado II-IV, 14% (95% C.I. 8-21%) per il grado III-IV.

La GVHD acuta di grado II-IV è stata significativamente più frequente nei pazienti con donatore 7/8 (48.4% vs 24.6%, $p=0.02$), incidenza cumulativa di GVHD acuta II-IV a 100 giorni 42% (95% C.I. 25-58%) nei pazienti con donatore 7/8 vs 20% (95% C.I. 12-30%) nei pazienti con donatore 8/8 ($p=0.013$) (**Fig.11**).

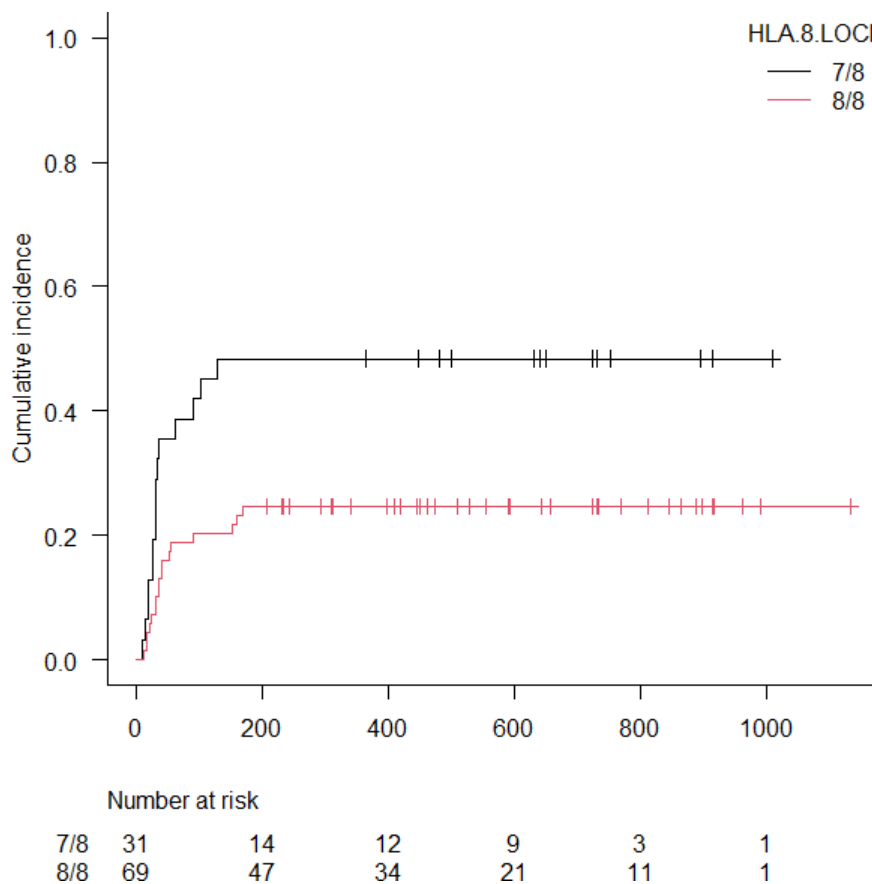


Fig. 11: Incidenza cumulativa di GVHD acuta nei pazienti con donor 7/8 (curva nera) vs 8/8 (curva rossa)

GVHD CRONICA

La GVHD cronica si è verificata nel 29% dei pazienti, a un tempo mediano di 180 giorni dal trapianto (range 53-665); il 25% dei pazienti ha avuto una GVHD cronica moderata-severa (grado 2-3 NIH 2015) e il 14% una GVHD severa (grado 3).

L'incidenza cumulativa stimata di GVHD cronica è risultata del 24% (95% C.I. 16-33%) a 1 anno, senza differenze significative in base al tipo di donatore (7/8 vs 8/8, Gray test, $p=0.148$); la C.I. stimata di GVHD cronica moderata-severa 20% (95% C.I. 13-29%) a 1 anno, senza differenze significative in base al tipo di donatore (7/8 vs 8/8, Gray test, $p=0.12$).

EV CD31+ nei pazienti con e senza GVHD

Il dosaggio delle EVs totali al giorno -6 e -1 non è risultato significativamente diverso tra i pazienti che in seguito avrebbero sviluppato GVHD acuta (a GVHD) o meno (no a GVHD). E' invece emersa una differenza statisticamente significativa nel livello mediano di vescicole esprimenti il CD31+ endoteliale.

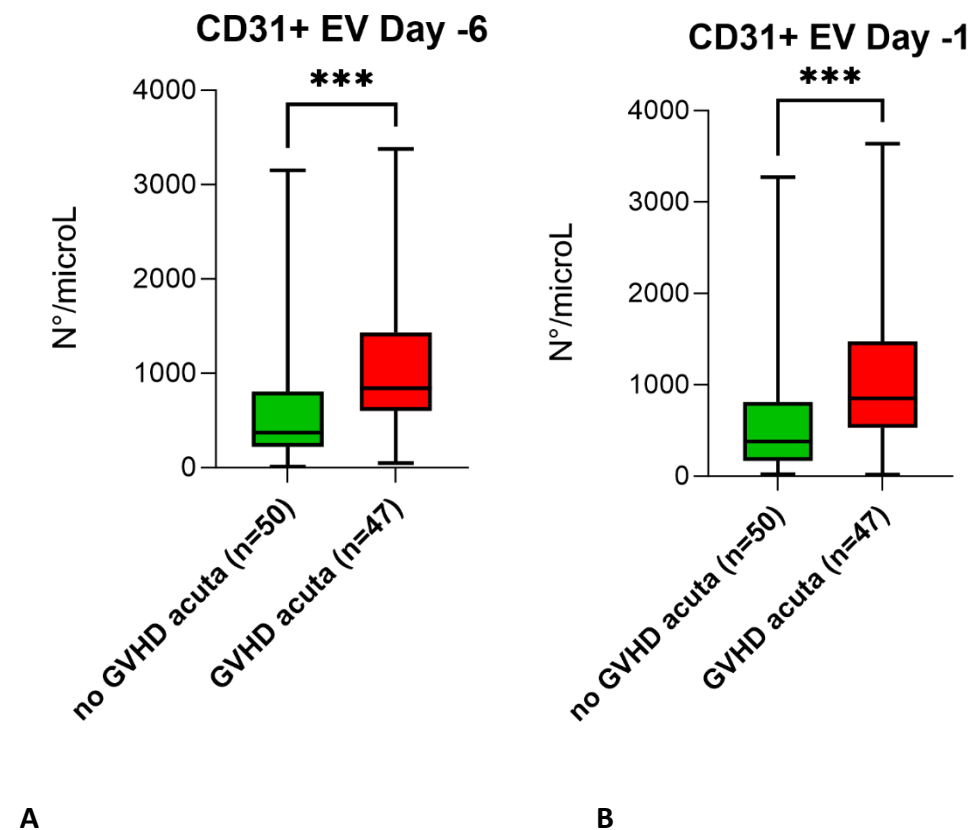
EV CD31+ nei pazienti con e senza GVHD ACUTA

Nello specifico, le vescicole CD31+ al giorno -6, sono state analizzate in 97/100 campioni disponibili, 47 di pazienti che avrebbero sviluppato GVHD acuta (31 di grado II-IV) e 50 di pazienti senza la complicanza.

Il livello mediano è risultato significativamente più alto nei pazienti che hanno avuto in seguito GVHD acuta (gruppo A) rispetto a coloro che non l'hanno sviluppata (gruppo B): EV CD31+ mediana **842/microL** vs **372/microL** (MW test, $p=0.0001$) **Fig. 12 A**

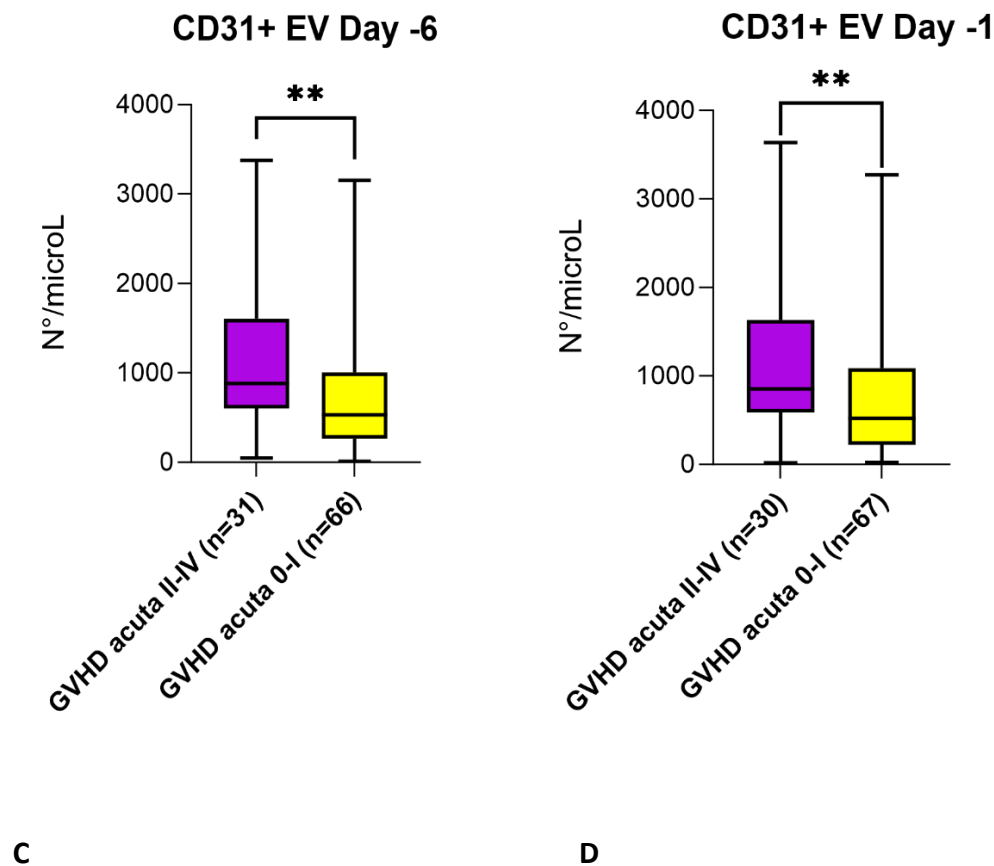
Analoga differenza è emersa nei campioni del giorno -1: EV CD31+ mediana **851/microL** nel gruppo aGVHD vs **382/microL** nel gruppo no aGVHD (MW test, $p=0.0005$). **Fig. 12 B**

Fig. 12



La differenza rimane significativa anche se si considerano come gruppi i pazienti con GVHD acuta di grado II-IV (gruppo C) vs i pazienti con GVHD acuta di grado 0-I (gruppo D) con una mediana di EV CD31+ al giorno -6 di **880/microL** nel gruppo C (n=31 campioni) vs **532/microL** nel gruppo D (n=66 campioni) (MW test, **p=0.0037**, **Fig. 12 C**), e al giorno -1 di **851.5/microL** nel gruppo C (n=30 campioni) vs **522/microL** nel gruppo D (n=67 campioni) (MW test, **p=0.0043**, **Fig. 12 D**). Il sottogruppo di pazienti con GVHD acuta di grado III-IV (n=14) presenta un numero mediano di EV CD31+ di 769/microL.

Fig. 12

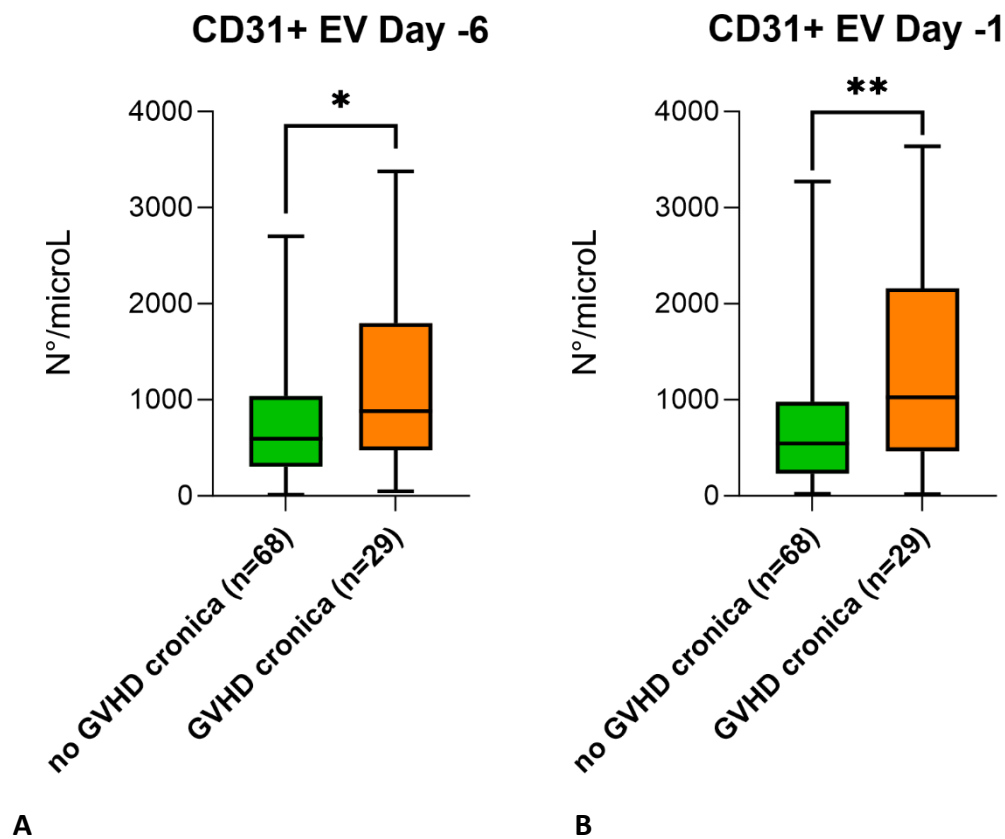


EV CD31+ nei pazienti con e senza GVHD CRONICA

Le vescicole CD31+ sono risultate significativamente più alte anche nei pazienti che hanno sviluppato in seguito GVHD cronica (cGVHD) rispetto a coloro che non l'hanno sviluppata (no cGVHD), sia al giorno -6 con una mediana di EVs CD31+ di **880/microL** cGVHD vs **596/microL** no cGVHD (MW test, p=0.0240), **Fig. 13 A**

sia al giorno -1 con una mediana di EVs CD31+ di **1026/microL** nel gruppo cGVHD vs **544/microL** nel gruppo no cGVHD (MW test, **p=0.0023**, Fig. 13 B).

Fig.13



ANTICORRELAZIONE TRA ATLG LEGATO AI LEUCOCITI E ATLG LEGATO ALLE EVs

Nei 23 pazienti di cui era stata eseguita la farmacocinetica dell'ATLG è stato analizzato il livello di vescicole CD31+ leganti l'ATLG nei due gruppi di pazienti con e senza GVHD (acuta e/o cronica).

E' stato dimostrato che, in maniera opposta a ciò che si ottiene con l'ATLG legato ai leucociti (Storci et al 2023), l'ATLG legato alle EV CD31+ al giorno -1 è significativamente più alto in coloro che svilupperanno GVHD (MW test, **p=0.0028**) (Fig. 14)

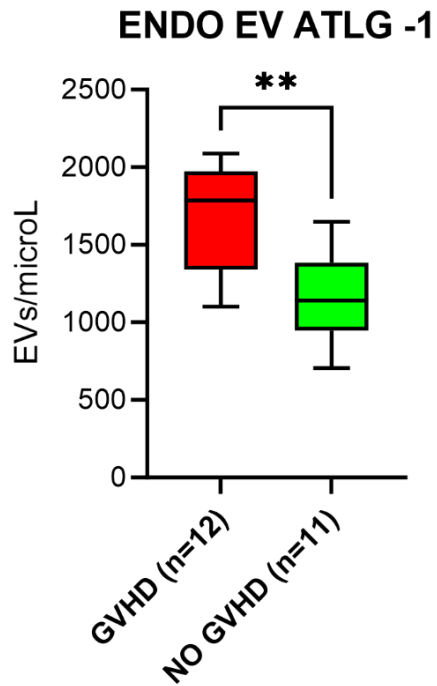
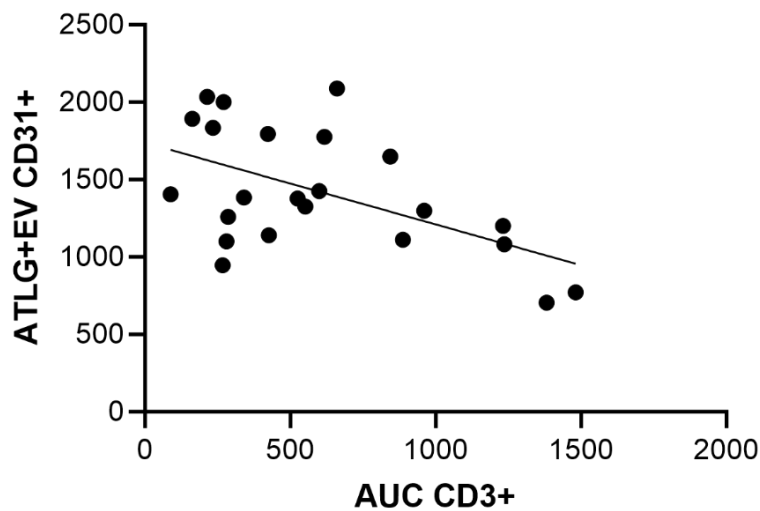


Fig. 14: Numero di EVs CD31+ nei pazienti con GVHD e senza GVHD

Emerge inoltre una anti-correlazione tra il livello di ATLG legato alle vescicole CD31+ e quello legato ai linfociti CD3+ negli stessi pazienti (r_s -0.48, $p=0.019$) (Fig.15).



Regressione lineare: $Y = -0,5278 \cdot X + 1739$

Fig. 15: Anticorrelazione tra ATLG legato alle EVs CD31+ e ATLG legato ai linfociti CD3+

Quest'ultimo risultato suggerisce che le vescicole CD31+ possano agire come “decoy” per l'ATLG, sottraendo una quota farmacologicamente attiva del siero.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Nelle fasi iniziali della GVHD, il danno cellulare innescato dal regime di condizionamento induce il rilascio di DAMPs (damage-associated molecular patterns) da parte delle cellule del ricevente. I DAMPs e i PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), rilasciati dai batteri che si trovano a contatto con le superfici mucose, attivano le cellule dell'immunità innata che rilasciano ROS e citochine infiammatorie, provocando il reclutamento delle cellule dell'immunità adattativa.

In questo processo cellule di derivazione emopoietica e non agiscono da APC per attivare i linfociti T del donatore. L'endotelio, a sua volta, svolge un ruolo cruciale, in quanto attraverso di esso avviene la migrazione delle cellule leucocitarie nei tessuti, e sotto lo stimolo delle citochine infiammatorie, può esprimere molecole MHC di classe II e agire da APC.^{43,44}

E' noto da tempo che la disfunzione endoteliale è alla base di complicanze precoci del trapianto allogenico quali la SOS/VOD, la capillary leak syndrome, le microangiopatie trombotiche associate al trapianto e il danno alveolare diffuso.⁴⁵

Studi più recenti suggeriscono il coinvolgimento dell'endotelio anche nella graft versus host disease.⁴⁶ L'angiogenesi si manifesta precocemente negli organi target di GVHD, prima ancora dell'infiltrazione da parte delle cellule immunitarie.⁴⁷

Nelle fasi più tardive è stata dimostrata una apoptosi delle cellule endoteliali nella GVHD acuta cutanea⁴⁸ e nei vasi della mucosa duodenale e colica in biopsie di pazienti con GVHD acuta severa.⁴⁹

Studi clinici hanno dimostrato che marcatori solubili di danno endoteliale come il fattore di von Willebrand, la trombomodulina, l'Angiopietina-2 e le “microparticelle” rilasciate dalle cellule endoteliali possono essere usati come biomarcatori solubili durante la GVHD acuta.^{46,50}

Vi sono inoltre evidenze sperimentali che l'endotelio danneggiato rilascia una quantità maggiore di vescicole rispetto all'endotelio fisiologico.⁵¹

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare mediante “biopsia liquida” basata sulla misurazione delle vescicole extracellulari, lo stato di “disfunzione” dell'endotelio prima e dopo il regime di condizionamento e la somministrazione dell'ATLG, e la sua eventuale correlazione con la GVHD e il suo eventuale contributo al legame all'ATLG e quindi alla sua biodisponibilità.

Nella casistica da noi analizzata, di 97 campioni prelevati a due differenti timepoints su un totale di 100 pazienti, è stato dimostrato che le vescicole CD31+ sono significativamente più alte già al giorno -6, nei pazienti che in seguito svilupperanno GVHD acuta e/o cronica. Tale dato si conferma analizzando le EVs CD31+ al giorno -1, ossia al termine del condizionamento e della somministrazione dell'ATLG.

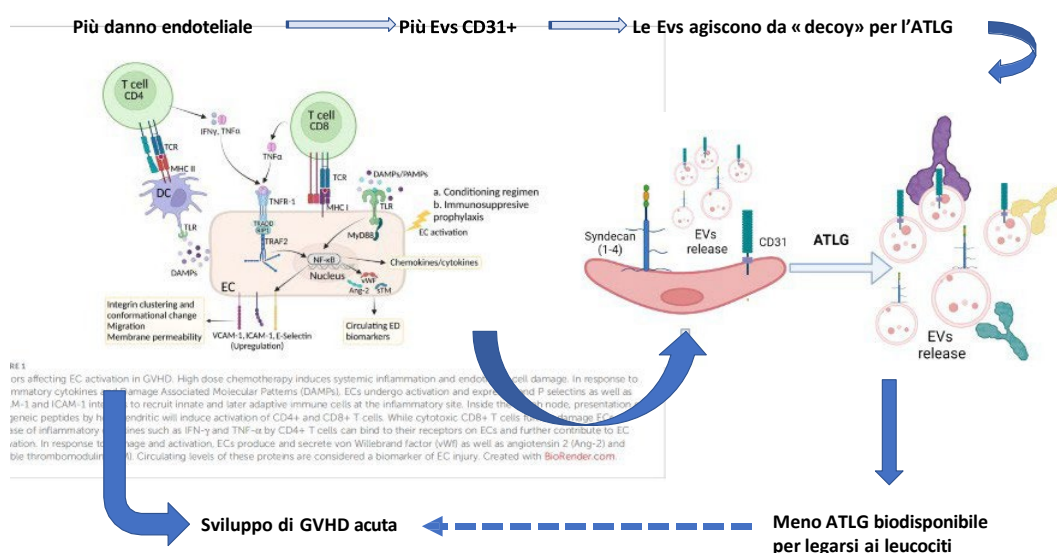
Questo risultato suggerisce che le EVs CD31+ siano biomarcatori di una maggiore disfunzione/danno endoteliale che predispone alla GVHD e che è già presente nel

ricevente, prima ancora del danno indotto dal condizionamento e dell'infusione del graft.

E' inoltre emersa una interessante correlazione inversa tra la quota di ATLG legato alle EV CD31+ e la quota di farmaco legante i linfociti CD3+ in un sottogruppo di 23 pazienti dei quali era stata misurata la farmacocinetica dell'ATLG, e l'impatto sull'outcome GVHD. I pazienti che svilupperanno GVHD hanno una maggiore quantità di ATLG legato alle EVs CD31+ e una minore quantità di ATLG legato ai linfociti CD3+, suggerendo che le EVs CD31+ possano agire da "decoy" per l'ATLG e sottrarre una quota farmacologicamente attiva del siero policlonale ai linfociti CD3+, target principale, riducendone l'efficacia.

E' ipotizzabile un modello patogenetico in cui i pazienti con maggiore disfunzione endoteliale, al basale e dopo il regime di condizionamento, rilascino una maggiore quantità di vescicole EVs CD31+, che sottraggono una maggiore quantità di ATLG, in una popolazione di pazienti per sé a maggior rischio di GVHD per il maggior danno endoteliale, come schematizzato nella figura sottostante (Fig.16).

Fig. 16



CONCLUSIONI

Il trapianto di cellule staminali allogeniche (allo-HSCT) rappresenta la terapia più efficace per le neoplasie ematologiche, in primis le leucemie acute, grazie all'effetto graft-versus-leukemia che riduce significativamente il rischio di ricaduta. La procedura trapiantologica, tuttavia, è gravata da un tasso non trascurabile di morbidità e mortalità, dovuto alla tossicità del regime di condizionamento, alle infezioni e soprattutto alla graft-versus-host-disease (GVHD).

I tradizionali schemi di preparazione mieloablativi si associano a una tossicità d'organo eccessiva nella popolazione anziana (>55-60 anni), limitandone l'uso negli anni. Le crescenti evidenze accumulate nel tempo sull'importanza dell'effetto GVL nell'eradicare la neoplasia, senza la necessità di una mielo-immunoablazione farmacologica massimale, ha consentito l'introduzione dei regimi di condizionamento a ridotta intensità/ridotta tossicità che si sono dimostrati sufficientemente "safe" anche in una popolazione di pazienti ultrasessantenni.

La profilassi migliore della GVHD per i pazienti che ricevono un condizionamento a ridotta intensità non è standardizzata e l'uso della duplice combinazione CNI+antimetabolita si associa a un tasso non trascurabile di GVHD acuta e cronica.

Alcuni autori utilizzano la PT-CY, sulla scorta della piattaforma di Baltimora.

Presso i centri europei, incluso il nostro, è utilizzata l'ATG/ATLG, sebbene i pazienti sottoposti a trapianto con condizionamento RIC sono poco rappresentati all'interno dei trial randomizzati con ATG/ATLG. Il nostro studio retrospettivo su 121 pazienti con un follow-up mediano superiore a 1 anno e un'età media di 63 anni, metà dei quali affetti da Leucemia Acuta Mieloide, conferma che la combinazione ATLG + CNI + antimetabolita è una piattaforma di profilassi della GVHD associata a un favorevole rapporto rischio/beneficio in termini di GVHD acuta e cronica e ricaduta della neoplasia ematologica di base.

La dose da noi utilizzata è di 30 mg/kg totali, più bassa di quella dei trial randomizzati sui donatori MUD, e mutuata dallo studio sui sibling (Kroeger, Bonifazi 2016), con una schedula di somministrazione precoce, dal giorno -6 al giorno -2, per favorire l'engraftment (attività anti-linfociti T del ricevente), ridurre la GVHD e minimizzare gli effetti deleteri di una ritardata immunoricostituzione, attribuibili principalmente alla quota di siero farmacologicamente attivo che rimane nell'organismo del ricevente nelle settimane successive all'infusione del graft.

Lo studio della farmacocinetica/farmacodinamica dell'ATLG è estremamente complesso, sia per la metodica di misurazione della quota farmacologicamente attiva sui leucociti/linfociti, sia per la presenza di anticorpi in grado di legare antigeni espressi da cellule di derivazione non ematopoietica del ricevente.

La ricerca biologica del nostro lavoro ha dimostrato che l'ATLG è in grado di legare vescicole CD31+, marker endoteliale, presenti nel siero del ricevente all'inizio e al termine dell'infusione (giorni -6 e -1). Le EV CD31+ sono numericamente più alte, in maniera statisticamente significativa, nei pazienti che in seguito svilupperanno GHVD acuta e/o cronica, suggerendo che uno stato pre-esistente di disfunzione endoteliale del ricevente aumenti per sé il rischio di GVHD, a parità di profilassi somministrata.

D'altra parte, il dato epidemiologico, che l'età del ricevente si associa a un maggior rischio di GVHD acuta e cronica, suggerisce che fattori non solo emopoietici e indipendenti dal donatore e dalla composizione del graft, contribuiscano allo sviluppo della complicità. Le EVs CD31+ inoltre, legando l'ATLG, sottraggono una quota del farmaco al suo target principale, riducendone la biodisponibilità proprio nei soggetti a maggior rischio di sviluppo della complicità.

Sebbene sia difficile standardizzare nella pratica clinica la misurazione delle vescicole come biomarcatore di GVHD e proporre una personalizzazione della profilassi, questo risultato biologico fornisce comunque un interessante e ulteriore spunto di ricerca sul contributo del ricevente e dei tessuti non emopoietici all'innescio iniziale della graft versus host disease.

BIBLIOGRAFIA

1. Holler E., Greinix H., Zeiser R. (2024). "Acute Graft-Versus-Host Disease." In A. Sureda et al., *The EBMT Handbook*, pp. 385-393, Springer 2024. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-44080-9>
2. Spierings E., Madrigal A., Fleischhauer K. (2024). "Histocompatibility". In A. Sureda et al., *The EBMT Handbook*, pp. 73-81, Springer 2024. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-44080-9>
3. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens*. 2012; 80:1–11.
4. Fleischhauer K, Shaw BE. HLA-DP in unrelated hematopoietic cell transplantation revisited: challenges and opportunities. *Blood*. 2017 Aug 31;130(9):1089-1096. doi: 10.1182/blood-2017-03-742346. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28667011; PMCID: PMC12247121.
5. Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, Hartzman R, Rizzo JD, Horowitz M, Confer D, Maiers M. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med*. 2014 Jul 24;371(4):339-48. doi: 10.1056/NEJMs1311707. PMID: 25054717; PMCID: PMC5965695.
6. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4576-83. doi: 10.1182/blood-2007-06-097386. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17785583.
7. Tie R, Zhang T, Yang B, Fu H, Han B, Yu J, Tan Y, Huang H. Clinical implications of HLA locus mismatching in unrelated donor hematopoietic cell transplantation: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Apr 18;8(16):27645-27660. doi: 10.18632/oncotarget.15291. PMID: 28206973; PMCID: PMC5432365.

8. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation*. 1970 Jun;9(6):571-87. doi: 10.1097/00007890-197006000-00006. PMID: 4911417.
9. Granot N., Storb R. (2024). “*HCT: Historical Perspective*” In A. Sureda et al., *The EBMT Handbook*, pp. 3-8, Springer 2024. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-44080-9>
10. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med*. 1975 Apr 24;292(17):895-902. doi: 10.1056/NEJM197504242921706. PMID: 235092.
11. Storb R, Epstein RB, Graham TC, Thomas ED. Methotrexate regimens for control of graft-versus-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts. *Transplantation*. 1970 Mar;9(3):240-6. doi: 10.1097/00007890-197003000-00007. PMID: 4392379.
12. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Farewell V, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med*. 1986 Mar 20;314(12):729-35. doi: 10.1056/NEJM198603203141201. PMID: 3513012.
13. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, Fay JW, Nademanee A, Antin JH, Christiansen NP, van der Jagt R, Herzig RH, Litzow MR, Wolff SN, Longo WL, Petersen FB, Karanes C, Avalos B, Storb R, Buell DN, Maher RM, Fitzsimmons WE, Wingard JR. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2303-14. PMID: 9746768.
14. Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, Przepiorka D, Davies S, Petersen FB, Bartels P, Buell D, Fitzsimmons W, Anasetti C, Storb R, Ratanatharathorn V. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2062-8. PMID: 10979948.
15. Penack O, Marchetti M, Aljurf M, Arat M, Bonifazi F, Duarte RF, Giebel S, Greinix H, Hazenberg MD, Kröger N, Mielke S, Mohty M, Nagler A, Passweg J, Patriarca F, Ruutu T, Schoemans H, Solano C, Vrhovac R, Wolff D, Zeiser R, Sureda A, Peric Z. **Prophylaxis and management of graft-versus-host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet Haematol*. 2024 Feb;11(2):e147-e159. doi: 10.1016/S2352-3026(23)00342-3. Epub 2024 Jan 3. PMID: 38184001.**
16. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralto S, Lazarus H, Ho V, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM, Barrett J, Blaise D, Lowski R, Horowitz M. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol*

- Blood Marrow Transplant. 2009 Dec;15(12):1628-33. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.07.004. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19896087; PMCID: PMC2861656.
17. Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, Pereira SE, Nash RA, Mielcarek M, Fero ML, Warren EH, Sanders JE, Storb RF, Appelbaum FR, Storer BE, Martin PJ. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3214-9. doi: 10.1182/blood-2010-08-302109. Epub 2011 Jan 24. PMID: 21263156; PMCID: PMC3062319.
 18. Beelen DW, Trensche R, Stelljes M, Groth C, Masszi T, Reményi P, Wagner-Drouet EM, Hauptrock B, Dreger P, Luft T, Bethge W, Vogel W, Ciceri F, Peccatori J, Stölzel F, Schetelig J, Junghans C, Grosse-Thie C, Michallet M, Labussiere-Wallet H, Schaefer-Eckart K, Dressler S, Grigoleit GU, Mielke S, Scheid C, Holtick U, Patriarca F, Medeot M, Rambaldi A, Micò MC, Niederwieser D, Franke GN, Hilgendorf I, Winkelmann NR, Russo D, Socié G, Peffault de Latour R, Holler E, Wolff D, Glass B, Casper J, Wulf G, Menzel H, Basara N, Bieniaszewska M, Stuhler G, Verbeek M, Grass S, Iori AP, Finke J, Benedetti F, Pichlmeier U, Hemmelmann C, Tribanek M, Klein A, Mylius HA, Baumgart J, Dzierzak-Mietla M, Markiewicz M. Treosulfan or busulfan plus fludarabine as conditioning treatment before allogeneic haemopoietic stem cell transplantation for older patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome (MC-FludT.14/L): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2020 Jan;7(1):e28-e39. doi: 10.1016/S2352-3026(19)30157-7. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31606445.
 19. Aoudjane M, Labopin M, Gorin NC, Shimoni A, Ruutu T, Kolb HJ, Frasson F, Boiron JM, Yin JL, Finke J, Shouten H, Blaise D, Falda M, Fauser AA, Esteve J, Polge E, Slavin S, Niederwieser D, Nagler A, Rocha V; Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2304-12. doi: 10.1038/sj.leu.2403967. PMID: 16193083.
 20. Luger SM, Ringdén O, Zhang MJ, Pérez WS, Bishop MR, Bornhauser M, Bredeson CN, Cairo MS, Copelan EA, Gale RP, Giralt SA, Gulbas Z, Gupta V, Hale GA, Lazarus HM, Lewis VA, Lill MC, McCarthy PL, Weisdorf DJ, Pulsipher MA. Similar outcomes using myeloablative vs reduced-intensity allogeneic transplant preparative regimens for AML or MDS. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Feb;47(2):203-11. doi: 10.1038/bmt.2011.69. Epub 2011 Mar 28. PMID: 21441963; PMCID: PMC3134582.

21. Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, Storer B. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2912-9. doi: 10.1182/blood-2005-05-2004. Epub 2005 Jun 30. PMID: 15994282; PMCID: PMC1895304.
22. Spyridonidis A, Labopin M, Savani BN, Niittyvuopio R, Blaise D, Craddock C, Socié G, Platzbecker U, Beelen D, Milpied N, Cornelissen JJ, Ganser A, Huynh A, Giskevicius L, Giebel S, Aljurf M, Brissot E, Malard F, Esteve J, Peric Z, Baron F, Ruggeri A, Schmid C, Gilleece M, Gorin NC, Lanza F, Shouval R, Versluis J, Bug G, Fløisand Y, Ciceri F, Sanz J, Bazarbachi A, Nagler A, Mohty M. Redefining and measuring transplant conditioning intensity in current era: a study in acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jun;55(6):1114-1125. doi: 10.1038/s41409-020-0803-y. Epub 2020 Jan 29. Erratum in: *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jun;55(6):1213. doi: 10.1038/s41409-020-0835-3. PMID: 31996792.
23. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, Gooley TA, Piantadosi S, Kaup M, Ambinder RF, Huff CA, Matsui W, Bolaños-Meade J, Borrello I, Powell JD, Harrington E, Warnock S, Flowers M, Brodsky RA, Sandmaier BM, Storb RF, Jones RJ, Fuchs EJ. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Jun;14(6):641-50. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.03.005. PMID: 18489989; PMCID: PMC2633246.
24. El Fakih R, Hashmi SK, Ciurea SO, Luznik L, Gale RP, Aljurf M. Post-transplant cyclophosphamide use in matched HLA donors: a review of literature and future application. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jan;55(1):40-47. doi: 10.1038/s41409-019-0547-8. Epub 2019 May 14. PMID: 31089284.
25. Mohty M. **Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond.** *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1387-94. doi: 10.1038/sj.leu.2404683. Epub 2007 Apr 5. PMID: 17410187.
26. Kröger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, Nagler A, Selleri C, Risitano A, Messina G, Bethge W, Pérez de Oteiza J, Duarte R, Carella AM, Cimminiello M, Guidi S, Finke J, Mordini N, Ferra C, Sierra J, Russo D, Petrini M, Milone G, Benedetti F, Heinzelmann M, Pastore D, Jurado M, Terruzzi E, Narni F, Völz A, Ayuk F, Ruutu T, Bonifazi F. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2016 Jan 7;374(1):43-53. doi: 10.1056/NEJMoa1506002. PMID: 26735993.
27. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhäuser M, Einsele H, Kolb HJ, Bertz H, Egger M, Grishina O, Socié G; ATG-Fresenius Trial Group. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2009

- Sep;10(9):855-64. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70225-6. Epub 2009 Aug 18. PMID: 19695955.
28. Walker I, Panzarella T, Couban S, Couture F, Devins G, Elemary M, Gallagher G, Kerr H, Kuruvilla J, Lee SJ, Moore J, Nevill T, Popradi G, Roy J, Schultz KR, Szwajcer D, Toze C, Foley R; Canadian Blood and Marrow Transplant Group. Pretreatment with anti-thymocyte globulin versus no anti-thymocyte globulin in patients with haematological malignancies undergoing haemopoietic cell transplantation from unrelated donors: a randomised, controlled, open-label, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2016 Feb;17(2):164-173. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00462-3. Epub 2015 Dec 24. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2018 Nov;19(11):e581. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30774-5. PMID: 26723083.
 29. Soiffer RJ, Kim HT, McGuirk J, Horwitz ME, Johnston L, Patnaik MM, Rybka W, Artz A, Porter DL, Shea TC, Boyer MW, Maziarz RT, Shaughnessy PJ, Gergis U, Safah H, Reshef R, DiPersio JF, Stiff PJ, Vusirikala M, Szer J, Holter J, Levine JD, Martin PJ, Pidala JA, Lewis ID, Ho VT, Alyea EP, Ritz J, Glavin F, Westervelt P, Jagasia MH, Chen YB. Prospective, Randomized, Double-Blind, Phase III Clinical Trial of Anti-T-Lymphocyte Globulin to Assess Impact on Chronic Graft-Versus-Host Disease-Free Survival in Patients Undergoing HLA-Matched Unrelated Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 2017 Dec 20;35(36):4003-4011. doi: 10.1200/JCO.2017.75.8177. Epub 2017 Oct 17. PMID: 29040031; PMCID: PMC8462523.
 30. Bolaños-Meade J, Reshef R, Fraser R, Fei M, Abhyankar S, Al-Kadhimi Z, Alousi AM, Antin JH, Arai S, Bickett K, Chen YB, Damon LE, Efebera YA, Geller NL, Giralto SA, Hari P, Holtan SG, Horowitz MM, Jacobsohn DA, Jones RJ, Liesveld JL, Logan BR, MacMillan ML, Mielcarek M, Noel P, Pidala J, Porter DL, Pusic I, Sobecks R, Solomon SR, Weisdorf DJ, Wu J, Pasquini MC, Koreth J. Three prophylaxis regimens (tacrolimus, mycophenolate mofetil, and cyclophosphamide; tacrolimus, methotrexate, and bortezomib; or tacrolimus, methotrexate, and maraviroc) versus tacrolimus and methotrexate for prevention of graft-versus-host disease with haemopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning: a randomised phase 2 trial with a non-randomised contemporaneous control group (BMT CTN 1203). *Lancet Haematol.* 2019 Mar;6(3):e132-e143. doi: 10.1016/S2352-3026(18)30221-7. PMID: 30824040; PMCID: PMC6503965.
 31. Bolaños-Meade J, Hamadani M, Wu J, Al Malki MM, Martens MJ, Runaas L, Elmariah H, Rezvani AR, Gooptu M, Larkin KT, Shaffer BC, El Jurdi N, Loren AW, Solh M, Hall AC, Alousi AM, Jamy OH, Perales MA, Yao JM, Applegate K, Bhatt AS, Kean LS, Efebera YA, Reshef R, Clark W, DiFronzo NL, Leifer E, Horowitz MM, Jones RJ, Holtan SG; BMT CTN 1703 Investigators. **Post-Transplantation Cyclophosphamide-Based Graft-versus-Host Disease Prophylaxis.** *N Engl J Med.* 2023 Jun 22;388(25):2338-2348. doi: 10.1056/NEJMoa2215943. PMID: 37342922; PMCID: PMC10575613.

32. Kennedy VE, Chen H, Savani BN, Greer J, Kassim AA, Engelhardt BG, Goodman S, Sengsayadeth S, Chinratanalab W, Jagasia M. Optimizing Antithymocyte Globulin Dosing for Unrelated Donor Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Based on Recipient Absolute Lymphocyte Count. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018 Jan;24(1):150-155. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.08.029. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28864139.
33. Podgorny PJ, Ugarte-Torres A, Liu Y, Williamson TS, Russell JA, Storek J. High rabbit-antihuman thymocyte globulin levels are associated with low likelihood of graft-vs-host disease and high likelihood of posttransplant lymphoproliferative disorder. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Jul;16(7):915-26. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.02.027. Epub 2010 Mar 11. PMID: 20226870.
34. Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, Lankester AC, Bierings MB, Egberts TC, van Tol MJ, Knibbe CA, Bredius RG, Boelens JJ. Association between anti-thymocyte globulin exposure and CD4+ immune reconstitution in paediatric haemopoietic cell transplantation: a multicentre, retrospective pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet Haematol.* 2015 May;2(5):e194-203. doi: 10.1016/S2352-3026(15)00045-9. Epub 2015 Apr 21. PMID: 26688094.
35. de Koning C, Nierkens S, Boelens JJ. Strategies before, during, and after hematopoietic cell transplantation to improve T-cell immune reconstitution. *Blood.* 2016 Dec 8;128(23):2607-2615. doi: 10.1182/blood-2016-06-724005. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27697775.
36. Crocchiolo R, Esterni B, Castagna L, Fürst S, El-Cheikh J, Devillier R, Granata A, Oudin C, Calmels B, Chabannon C, Bouabdallah R, Vey N, Blaise D. Two days of antithymocyte globulin are associated with a reduced incidence of acute and chronic graft-versus-host disease in reduced-intensity conditioning transplantation for hematologic diseases. *Cancer.* 2013 Mar 1;119(5):986-92. doi: 10.1002/cncr.27858. Epub 2012 Oct 23. PMID: 23096591.
37. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, Kan F, Artz A, Champlin RE, Devine S, Isola L, Lazarus HM, Marks DI, Porter DL, Waller EK, Horowitz MM, Eapen M. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood.* 2011 Jun 23;117(25):6963-70. doi: 10.1182/blood-2011-01-332007. Epub 2011 Apr 4. PMID: 21464372; PMCID: PMC3128486.
38. Bonifazi F, Rubio MT, Bacigalupo A, Boelens JJ, Finke J, Greinix H, Mohty M, Nagler A, Passweg J, Rambaldi A, Socie G, Solano C, Walker I, Barosi G, Kröger N. **Rabbit ATG/ATLG in preventing graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: consensus-based recommendations by an international expert panel.** *Bone Marrow Transplant.* 2020 Jun;55(6):1093-1102. doi: 10.1038/s41409-020-0792-x. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31969678; PMCID: PMC7269907.
39. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, Chanswangphuwana C, Efebera YA, Holler E, Litzow M, Ordemann R, Qayed

- M, Renteria AS, Reshef R, Wölfl M, Chen YB, Goldstein S, Jagasia M, Locatelli F, Mielke S, Porter D, Schechter T, Shekhovtsova Z, Ferrara JL, Levine JE. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):4-10. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.001. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26386318; PMCID: PMC4706482.
40. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, Palmer J, Weisdorf D, Treister NS, Cheng GS, Kerr H, Stratton P, Duarte RF, McDonald GB, Inamoto Y, Vigorito A, Arai S, Datile MB, Jacobsohn D, Heller T, Kitko CL, Mitchell SA, Martin PJ, Shulman H, Wu RS, Cutler CS, Vogelsang GB, Lee SJ, Pavletic SZ, Flowers ME. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Mar;21(3):389-401.e1. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25529383; PMCID: PMC4329079.
 41. Storci G, Barbato F, Ricci F, Tazzari PL, De Matteis S, Tomassini E, Dicaldo M, Laprovitera N, Arpinati M, Ursi M, Maffini E, Campanini E, Dan E, Manfroi S, Santi S, Ferracin M, Bonafe M, Bonifazi F. ***Pre-transplant CD69+ extracellular vesicles are negatively correlated with active ATLG serum levels and associate with the onset of GVHD in allogeneic HSCT patients***. *Front Immunol*. 2023 Jan 13;13:1058739. doi: 10.3389/fimmu.2022.1058739. PMID: 36713433; PMCID: PMC9880409.
 42. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016 May;23(3):253-9. doi: 10.1097/MOH.0000000000000239. PMID: 27055047; PMCID: PMC4986701.
 43. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*. 2017 Nov 30;377(22):2167-2179. doi: 10.1056/NEJMra1609337. PMID: 29171820; PMCID: PMC6034180.
 44. Zeiser R. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2019 Dec;187(5):563-572. doi: 10.1111/bjh.16190. Epub 2019 Oct 6. PMID: 31588560.
 45. Carreras E; Barcelona Endothelium Team (BET). Vascular endothelial syndromes after HCT: 2020 update. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Oct;55(10):1885-1887. doi: 10.1038/s41409-020-0852-2. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32203255.
 46. Neidemire-Colley L, Robert J, Ackaoui A, Dorrance AM, Guimond M, Ranganathan P. Role of endothelial cells in graft-versus-host disease. *Front Immunol*. 2022 Nov 23;13:1033490. doi: 10.3389/fimmu.2022.1033490. Erratum in: *Front Immunol*. 2023 Jan 04;13:1125035. doi: 10.3389/fimmu.2022.1125035. PMID: 36505438; PMCID: PMC9727380.

47. Riesner K, Shi Y, Jacobi A, Kräter M, Kalupa M, McGearey A, Mertlitz S, Cordes S, Schrezenmeier JF, Mengwasser J, Westphal S, Perez-Hernandez D, Schmitt C, Dittmar G, Guck J, Penack O. Initiation of acute graft-versus-host disease by angiogenesis. *Blood*. 2017 Apr 6;129(14):2021-2032. doi: 10.1182/blood-2016-08-736314. Epub 2017 Jan 17. PMID: 28096092.
48. Murata H, Janin A, Leboeuf C, Soulier J, Gluckman E, Meignin V, Socie G. Donor-derived cells and human graft-versus-host disease of the skin. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2663-5. doi: 10.1182/blood-2006-07-033902. Epub 2006 Nov 14. PMID: 17105815.
49. Cordes S, Mokhtari Z, Bartosova M, Mertlitz S, Riesner K, Shi Y, Mengwasser J, Kalupa M, McGeary A, Schleifenbaum J, Schrezenmeier J, Bullinger L, Diaz-Ricart M, Palomo M, Carreras E, Beutel G, Schmitt CP, Beilhack A, Penack O. Endothelial damage and dysfunction in acute graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2021 Aug 1;106(8):2147-2160. doi: 10.3324/haematol.2020.253716. PMID: 32675225; PMCID: PMC8327719.
50. Pihusch V, Rank A, Steber R, Pihusch M, Pihusch R, Toth B, Hiller E, Kolb HJ. Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation*. 2006 May 27;81(10):1405-9. doi: 10.1097/01.tp.0000209218.24916.ba. PMID: 16732177.
51. Bar-Sela G, Cohen I, Avisar A, Loven D, Aharon A. Circulating blood extracellular vesicles as a tool to assess endothelial injury and chemotherapy toxicity in adjuvant cancer patients. *PLoS One*. 2020 Oct 27;15(10):e0240994. doi: 10.1371/journal.pone.0240994. PMID: 33108394; PMCID: PMC7591065.