



Trapianto di cellule staminali emopoietiche T-depletato da donatore familiare aploidentico nelle emopatie maligne dell'infanzia

Roberto Raschetti, Valentina Burzio, Paola Guerini, Maria Chiara Leoni,
Gaia Ottonello, Giovanna Giorgiani, Marco Zecca, Franco Locatelli

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Trapianto di cellule staminali emopoietiche T-depletato da donatore familiare aploidentico nelle emopatie maligne dell'infanzia

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche rappresenta il trattamento di scelta per molte patologie oncoematologiche dell'infanzia e dell'età adulta. Tuttavia, un donatore familiare HLA-identico è disponibile solo in circa il 25% dei casi e spesso non è possibile identificare in tempo utile un donatore volontario non consanguineo nei registri internazionali dei donatori volontari di midollo osseo. Proprio per questo motivo, sono state sviluppate nel corso degli anni strategie trapiantologiche alternative, basate sull'impiego di fonti di cellule staminali emopoietiche differenti (come ad esempio il sangue placentare) o sull'impiego di donatori familiari HLA-parzialmente compatibili. In particolare, questo secondo approccio appare di rilevante interesse, in quanto permette virtualmente di poter identificare un donatore di cellule staminali emopoietiche per tutti i pazienti candidati ad un trapianto. Questo lavoro dimostra come il trapianto di cellule staminali emopoietiche da sangue periferico da donatore familiare HLA-parzialmente compatibile, dopo procedura di T-deplezione, rappresenti una valida opzione terapeutica per pazienti che necessitano di un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche ma che sono sprovvisti di un donatore familiare o non consanguineo HLA-compatibile.

T-depleted haploidentical hematopoietic stem cells transplantation from related donor in pediatric hematological malignancies

Allogeneic hematopoietic stem cells transplantation represents the most commonly used treatment for many oncoematologic infant and adulthood pathologies. However, a familiar HLA-identical donor is available in only about 25% of cases and it is often impossible to identify a voluntary non-consanguineous donor in the international registers of bone marrow voluntary donors. For this reason, during these last few years alternative strategies have been developed, based on the use of different hematopoietic stem cells sources (i.e. cord blood) or on the use of familiar HLA-partially matched donors. In particular, this second approach seems to be interestingly relevant, virtually allowing to identify a hematopoietic stem cells donor for any patient needing a transplant. The present work shows how the hematopoietic stem cells transplantation of peripheral T-depleted blood from a familiar HLA-partially matched donor represents a valid therapeutic option for patients needing an allogeneic transplantation, yet without an HLA-matched donor.

Introduzione

Il trapianto di midollo osseo allogenico rappresenta, al momento attuale, la migliore terapia per alcuni pazienti selezionati (alto rischio alla diagnosi e/o resistenti) affetti da emopatie maligne, in particolare leucemie acute, leucemia mieloide cronica, linfomi e mielomi. Purtroppo, solo il 25% circa dei pazienti candidati per il trapianto di midollo allogenico dispone di un donatore familiare HLA identico e la probabilità di identificare un donatore compatibile nell'ambito dei registri di donatori volontari varia dal 50-60% per i caucasici a meno per le etnie minori [1]. C'è poi il problema della ricerca che, per i pazienti con leucemia acuta diventa spesso inconciliabile con le necessità di urgenza terapeutica del paziente. Ne consegue che oltre la metà dei pazienti con emopatie maligne di fatto non dispone di un donatore compatibile nell'ambito familiare o da banca (MUD). Per contro, spesso sono disponibili familiari (genitori, fratelli, figli) incompatibili per due o tre loci che potrebbero essere immediatamente utilizzati come donatori. In passato, i tentativi di utilizzare, in pazienti leucemici, il midollo osseo di donatori aploidentici (2-3 loci incompatibili) sono stati non sempre soddisfacenti, a causa dell'elevata incidenza di *Graft Versus Host Disease* (GvHD) grave dopo infusione di midollo osseo non manipolato o di rigetti dopo infusione di cellule midollari preventivamente depletate in T-linfociti per prevenire la GvHD [2-5]. Queste alloreazioni sono in gran parte mediate *in vivo* dai linfociti T, ma anche l'alloreattività delle cellule *Natural Killer* (NK) può avere un ruolo nell'esito clinico dei trapianti incompatibili per un intero aplotipo [2]. In particolare, nel contesto di un trapianto incompatibile per tre loci, le cellule NK del donatore e/o del ricevente possono essere responsabili di tre situazioni:

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

Nella Figura 1 vengono sintetizzati, da un lato la portata e l'importanza del trapianto aploidentico, e dall'altro i principali problemi ad esso correlati.

Principali vantaggi e limiti del trapianto aploidentico

I principali vantaggi correlati a tale procedura trapiantologica sono:

- Trattandosi di un familiare, il donatore è immediatamente disponibile, sia al momento del trapianto, sia qualora si renda necessaria una seconda donazione a causa di un rigetto o di un mancato attecchimento, oppure una *Donor Lymphocyte Infusion* (DLI) per una immunoterapia di prevenzione della ricaduta di malattia [6].
- Sempre in quanto familiare, il donatore è altamente motivato.
- Rispetto alla ricerca del donatore nei Registri di volontari, non esistono restrizioni di tipo razziale o etnico.
- Grazie all'elevato numero di possibili familiari aploidentici (genitori, fratelli, zii), c'è la possibilità di selezionare il donatore più idoneo, secondo criteri che comprendono il sesso, l'età, la sierologia CMV, l'alloreattività NK, la cellularità dopo mobilitazione con G-CSF.
- I costi sono diminuiti [7].

Sino ai primi anni '90, il trapianto da donatore aploidentico è stato gravato da una considerevole percentuale di insuccessi, a causa della elevata incidenza di grave GvHD acuta, causata dalle cellule T

alloreattive del donatore [8-10]. La soluzione a questo problema sembrava poter essere la T-deplezione dell'inoculo. Tuttavia, nei casi in cui veniva effettuata tale procedura, il trapianto risultava essere gravato da un'aumentata occorrenza di *graft failure*, ossia di fallimento del trapianto stesso. Ciò dipendeva dal rigetto delle cellule emopoietiche del donatore da parte del sistema immunitario residuo (in quanto resistente alla radio-chemioterapia del regime di condizionamento) del ricevente (*Host Versus Graft Reaction*, HvG), e da altri meccanismi, fra cui la competizione tra le cellule staminali residue dell'ospite e quelle del donatore per le limitate nicchie disponibili nello stroma midollare dopo la mieloablazione [8, 10-11]. Per ovviare a quest'altro inconveniente e giungere all'attecchimento oggi si utilizza con successo l'infusione di una megadose di cellule staminali da sangue periferico del donatore, dopo mobilitazione con G-CSF, leucoaferesi e selezione delle cellule staminali CD34+. La dose impiegata di routine è di almeno 10×10^6 /Kg di peso corporeo [8]. A sua volta, però, l'impiego della megadose di cellule staminali, anche se di inoculo T-depletato, espone potenzialmente a un maggior rischio di GvHD, principalmente a causa di una contaminazione di cellule T. Tuttavia, i casi di GvHD oltre il grado I sono risultati essere estremamente rari, anche grazie alla ATG (*Anti-Thymocyte Globuline*), che, somministrata tra i giorni -5 e -2 dal trapianto, contribuisce a ridurre sia la frequenza che la gravità della GvHD, esercitando un effetto citotossico contro i linfociti T del donatore [10]. È stato dimostrato che anche la co-infusione di cellule staminali mesenchimali espanse *ex vivo* è efficace nel ridurre il rischio di *graft failure* [12].

Un'ulteriore complicanza del trapianto aploidentico è costituita dalla lenta ricostituzione immune, che espone i pazienti al rischio di gravi morbidità e di mortalità per infezioni virali, fungine e opportunistiche per un periodo di tempo significativamente più lungo se confrontato con il trapianto da fratello HLA-identico [7]. L'eliminazione fisica dei linfociti T maturi dal trapianto comporta che il ricevente non possa beneficiare del trasferimento adottivo di linfociti T della memoria, che, attraverso la loro espansione periferica, rappresentano la principale protezione dalle infezioni durante i primi mesi dopo il trapianto [13]. Questo stato di profonda immunodeficienza si protrae per almeno 4-6 mesi dopo il trapianto, al termine dei quali la ricostituzione immunitaria dei bambini riceventi un aplo-HSCT (*Hematopoietic Stem Cell Transplant*) non differisce in modo sostanziale da quella dei pazienti sottoposti a un allotrapianto da altri tipi di donatore [13-16].

Un metodo promettente per favorire e velocizzare il ripristino dell'immunità specifica, anche se altamente specializzato, consiste nel trasferimento adottivo di cloni cellulari T, specifici per i principali patogeni (soprattutto CMV, EBV, *Aspergillus* e Adenovirus) [7, 13, 15-18].

Infine, la T-deplezione comporta un aumentato rischio di ricaduta leucemica, a causa della perdita dell'effetto GvL (*Graft Versus Leukemia*) [7]. Con questo termine si intende l'azione citotossica anti-leucemica espressa da cloni di linfociti T CD4+ e CD8+ del donatore, ad attività ristretta per gli antigeni HLA di classe I e II; gli antigeni target potrebbero essere antigeni minori del sistema di istocompatibilità presenti sulle cellule leucemiche, ma anche neo-peptidi prodotti dalle traslocazioni cromosomiche o proteine glicosilate o fosforilate in maniera anomala. In realtà, paradossalmente, studi clinici hanno mostrato che, specialmente nei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta, il tasso di recidiva era relativamente basso [19]. Ciò è probabilmente dovuto, come suggerito da recenti lavori, al significativo ruolo rivestito nell'effetto GvL da una diversa popolazione cellulare, ossia le cellule NK [20-21].

L'alloreattività NK

Le cellule NK, che appartengono al compartimento dell'immunità innata, possono rivestire importanza nell'induzione della GvL, essendo attivate da un'alterata o assente espressione di molecole HLA di classe I sulla superficie cellulare. In questo modo, le cellule NK non sarebbero coinvolte nella genesi della GvH, non attaccando i tessuti con normale espressione delle molecole HLA di classe I, ma solo della GvL. In sintesi, quindi, le cellule NK sono in grado di sopprimere le cellule anormali, rispar-

miando al tempo stesso le cellule autologhe normali. Infatti, gli alleli di classe I del ricevente non sono in grado di bloccare tutte le cellule NK del donatore e vengono così generati cloni NK alloreattivi del donatore, che uccidono cellule bersaglio dell'ospite, fra cui le cellule leucemiche. Ciò dimostra che le cellule NK sono responsabili dell'effetto GvL, e spiega perché, nonostante la T-deplezione, il tasso di recidiva dopo trapianto aploidentico si sia rivelato relativamente basso.

La virtuale abrogazione della GvHD potrebbe essere una conseguenza di un inefficiente *priming* di (poche) cellule T alloreattive del donatore, conseguente all'uccisione cellule NK-mediata delle cellule presentanti l'antigene (APC) del ricevente. In accordo con questo concetto, studi *in vitro* hanno dimostrato che proprio i cloni di cellule NK alloreattive sono capaci di uccidere le cellule dendritiche (DC) monocito-derivate, sia immature che mature.

Manipolazione delle cellule staminali

Il rischio di GvHD grave dipende dal grado di disparità fra i complessi HLA del donatore e del ricevente e un'incidenza pari al 90% di GvHD di grado III e IV è stata rilevata in pazienti riceventi trapianti di midollo non manipolati da donatori familiari con 3 *loci mismatch* [22]. Le cellule T del donatore giocano senza dubbio un ruolo maggiore nel mediare la malattia del trapianto contro l'ospite in tali situazioni e la deplezione di queste cellule può dunque effettivamente prevenire la comparsa di una sintomatologia clinica. Diverse strategie sono state quindi utilizzate con lo scopo di minimizzare il numero di cellule T del donatore, presenti nel trapianto:

1. deplezione diretta delle cellule T con agglutinazione di lectina di semi di soia *in vitro* o con anticorpi monoclonali *in vitro* e *in vivo*;
2. selezione positiva di cellule progenitrici CD34+ o CD133+ con *microbeads* immunomagnetiche *in vitro*, che include una deplezione indiretta di tutti gli altri tipi cellulari;
3. deplezione diretta delle cellule T con *microbeads* anti-CD3, in associazione con deplezione B cellulare anticorpo-mediata (anti-CD20, Rituximab) *in vivo*, o con *microbeads* CD19 [22].

Il numero di cellule T residue nel trapianto è di conseguenza cruciale. Esiste evidenza clinica che persino valori molto bassi di cellule presenti nel trapianto possa comportare la comparsa di gravi forme di GvHD in pazienti che non ricevano ulteriore immunosoppressione farmacologica a seguito della procedura trapiantologica. Tuttavia, almeno in ambito pediatrico, sembra che un valore soglia di $0.2-5.2 \times 10^4$ cellule T/kg non comporti un rischio significativo di GvHD [22].

Attualmente, sono disponibili nuove tecniche di deplezione diretta delle cellule T e B, che permettono un una co-trasfusione di elevati valori di cellule NK vitali.

Scopo del lavoro

Diversi approcci sono stati sperimentati nel corso degli anni per risolvere i principali problemi di un trapianto da donatore HLA-parzialmente compatibile, sia per permettere l'attecchimento del trapianto [23], sia per prevenire la malattia del trapianto contro l'ospite (GvHD) per mezzo di una completa deplezione delle cellule T *in vitro* e/o *in vivo* [24], sia per ridurre la mortalità correlata alla procedura trapiantologica (TRM), causata dagli intensi regimi di condizionamento e dal lento ripristinarsi della popolazione T a seguito del trapianto [25]. In particolare, un protocollo che prevedeva l'infusione di megadosi di cellule staminali dopo T-deplezione estensiva (almeno 3 logaritmi di riduzione nel contenuto di linfociti maturi CD3+), preceduta da un regime di condizionamento altamente mieloablativo e immunosoppressivo, ed in assenza di immunosoppressione farmacologica quale profilassi della GvHD

post-trapianto, si è dimostrato efficace nell'ottenere un attecchimento stabile del trapianto, ed una sopravvivenza libera da malattia (EFS) ottimale in pazienti adulti affetti da neoplasie ematologiche [10, 19].

L'esperienza in merito alla possibile applicazione del trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore familiare aploidentico in pazienti pediatriche affette da emopatia maligna è estremamente limitata [6, 14].

Obiettivo del nostro studio è dimostrare come il trapianto di cellule staminali emopoietiche T-depletato da donatore familiare aploidentico possa offrire, in termini di mortalità trapianto-correlata e di sopravvivenza libera da malattia, risultati tali da renderlo una routinaria prospettiva terapeutica in tutti quei pazienti in cui non siano realizzabili procedure trapiantologiche alternative. In particolare, è stato analizzato il ruolo di alcune importanti variabili associate al trapianto, che permetterebbero di migliorare a livello clinico l'esito della procedura.

Pazienti e metodi

Pazienti

Dal luglio 1999 al giugno 2010 settantadue pazienti (47 maschi, 25 femmine) sono stati sottoposti a trapianto aploidentico di cellule staminali periferiche da donatore familiare HLA-parzialmente compatibile presso l'Unità di Oncoematologia Pediatrica della Fondazione IRCCS San Matteo di Pavia.

Il range per l'età dei pazienti inclusi era compreso tra 0.2 e 24 anni, con un valore mediano di 5 anni.

La coorte arruolata nello studio comprendeva 42 pazienti affetti da LLA (58%), di cui 7, al momento del trapianto, erano in prima remissione completa, 20 in seconda e 15 presentavano malattia in stadio avanzato; 21 pazienti avevano ricevuto il trapianto in seguito a diagnosi di LMA (29%) di cui 4 in prima remissione completa, 8 in seconda e 8 in stadio avanzato di malattia; infine, 9 pazienti erano affetti da SMD (13%). Il trapianto aploidentico di cellule staminali emopoietiche rappresentava per questi pazienti l'unica opzione curativa.

Donatori, mobilitazione delle cellule staminali e loro raccolta

Sono stati impiegati come donatori 61 genitori (27 padri, 34 madri), 10 fratelli o sorelle e una zia. L'età dei donatori era compresa tra 17 e 51 anni con una mediana di 36 anni. Nel 37% dei casi il donatore era di sesso femminile e il ricevente maschile, mentre nel restante 63% dei casi sono state utilizzate altre combinazioni. L'NK alloreattività era presente nel 57% delle coppie donatore/ricevente.

I donatori sono stati sottoposti a mobilitazione delle cellule staminali periferiche mediante somministrazione sottocutanea di G-CSF alla posologia di 10-15 µg/kg per 4-5 giorni. La raccolta è stata eseguita in quarta e/o quinta giornata per mezzo di un separatore cellulare, eseguendo, a seconda della necessità, una o più leucoferesi. Il numero medio di cellule CD34+ e CD3+ infuse per Kg di peso corporeo del ricevente è stato di 20×10^6 (range 9-41) e 0.7×10^4 (range 0.1-22), rispettivamente.

Schema terapeutico del condizionamento

Il regime di condizionamento ha previsto come trattamento mieloablativo l'impiego della *total body irradiation* (TBI) o di farmaci mieloablativi come il busulfano, il treosulfano e il melphalan con specifiche modificazioni a seconda del paziente, dell'età e della diagnosi. Sono stati associati ai presidi farmacologici e radioterapici sopramenzionati diverse combinazioni di chemioterapici, quali il thiotepa e la fludarabina (in 40 pazienti, associati alla TBI; in 9 pazienti, associati al treosulfano), il thiotepa e il melphalan (in 9 pazienti, 12% dei trapianti), il thiotepa e la ciclofosfamide, la ciclofosfamide e il melphalan associati al busulfano (in 7 pazienti, 10% dei trapianti) e altre combinazioni.

Al fine di minimizzare il rischio di rigetto, siero antilinfocitario di coniglio (ATG) è stato somministrato a tutti i pazienti prima dell'allograft. Nessun paziente è stato sottoposto a immunosoppressione farmacologica post-trapianto come profilassi alla GvHD.

Monitoraggio e terapia antiinfettiva e valutazione del chimerismo

Tutti i pazienti hanno ricevuto terapia infusiva antiinfettiva di profilassi con ciprofloxacina (20 mg/kg/die per os in 2 somministrazioni giornaliere), ceftazidime (100 mg/kg/die per via endovenosa in 3 somministrazioni), acyclovir (30 mg/kg/die per via endovenosa in 3 somministrazioni giornaliere) e fluconazolo (6 mg/kg/die per via endovenosa in un'unica somministrazione giornaliera).

Quale profilassi della polmonite da *Pneumocystis jiroveci* è stata somministrata l'associazione trimetoprim/sulfametossazolo alla dose di 5 mg/Kg/die per tre giorni alla settimana per os in 2 somministrazioni giornaliere.

Periodicamente sono state somministrate immunoglobuline aspecifiche per via endovenosa.

Il monitoraggio effettuato tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa della riattivazione dell'infezione da CMV è stata eseguita due volte alla settimana. Allo stesso modo anche il monitoraggio per la riattivazione dell'infezione da EBV, per l'infezione da Adenovirus e per la ricerca del galatto-mannano per *Aspergillus spp* sono stati eseguiti settimanalmente.

Sono stati intrapresi trattamenti antivirali specifici con ganciclovir e/o foscarnet in caso di riattivazione di CMV, con cidofovir in caso di infezione da Adenovirus, con rituximab (Mabthera®, anticorpi monoclonali anti-CD20) in caso di riattivazione di EBV.

In caso di mancata risposta alla terapia farmacologica antiinfettiva, i pazienti hanno ricevuto terapia *preemptive* o curativa mediante infusione di linfociti T patogeno-specifici del donatore, espansi in laboratorio secondo le normative di Buona Pratica di Fabbricazione (GMP) e criopreservati.

L'attecchimento è stato valutato attraverso l'analisi del chimerismo post-trapianto eseguita mediante amplificazione di sequenze STR (*Short Tandem Repeats*) su cellule mononucleate di sangue periferico, settimanalmente fino al centesimo giorno dopo il trapianto e quindi ogni mese durante il primo anno di *follow-up*.

Definizioni

I pazienti sono stati considerati in remissione morfologica completa di malattia se alla valutazione dello striscio di sangue midollare si evidenziava una quota blastica inferiore al 5%.

L'attecchimento è stato definito come il primo di tre giorni consecutivi, in cui la conta di neutrofili fosse superiore a $0.5 \times 10^9/L$ ($500/mm^3$), mentre l'attecchimento piastrinico è stato definito come il primo di sette giorni consecutivi, in cui la conta piastrinica fosse superiore a $20 \times 10^9/L$ ($20000/mm^3$), in assenza di supporto trasfusionale.

Tutti i pazienti al giorno +10 dal trapianto sono stati considerati a rischio di sviluppare una GvHD acuta. I bambini dal giorno +100 erano considerati potenzialmente a rischio di sviluppare una GvHD cronica. Il trattamento della GvHD sia acuta che cronica è stato eseguito in accordo con i protocolli in uso nel nostro Centro.

Risultati

Risultati clinici della casistica analizzata

Un rapido attecchimento del trapianto si è osservato in 66 pazienti, con un tempo mediano di attecchimento dei neutrofili pari a 13 giorni e di attecchimento piastrinico pari a 12 giorni. L'incidenza di rigetto è stata dell'8%, essendosi verificati 4 rigetti primari e 2 rigetti secondari.

La sopravvivenza totale dei 72 pazienti arruolati è stata del 61%, con una sopravvivenza libera da malattia del 55%, ad un *follow-up* mediano dei pazienti vivi pari a 2.9 anni (range 0.5-10.7) (Figura 3).

Ventisei pazienti sono deceduti, ad un tempo mediano di 5 mesi dal trapianto (range 0.3-21 mesi), 11 per cause legate alla procedura trapiantologica e 15 per progressione di malattia. Tra le cause di decesso trapianto-correlate, le più frequenti sono state le infezioni batteriche, virali o fungine (n=6), seguite dalla GvHD acuta e cronica (n=3) (Figura 4).

Ventuno pazienti (29%) hanno mostrato una ricaduta della malattia di base ad un tempo mediano di 4 mesi dall'HSCT (range 2-12 mesi) (Figura 4); 6 di questi pazienti sono vivi ed in remissione dopo un successivo trapianto. Diciannove pazienti hanno sviluppato una GvHD acuta; dei 58 pazienti valutabili, 6 hanno sviluppato una GvHD cronica dopo il trapianto.

Risultati del trapianto per i diversi tipi di neoplasie ematologiche

La sopravvivenza libera da malattia, globalmente attestata al 55%, si differenzia in base al tipo di neoplasia ematologia considerata. In particolare, i risultati dell'HSCT da donatore familiare HLA-aploidentico sono risultati incoraggianti nel caso di pazienti con SMD (LFS pari al 78%) o LLA (LFS pari al 61%), mentre nel caso di pazienti con LMA la LFS è significativamente inferiore (33%, $p<0.01$) (Figura 5). I peggiori risultati ottenuti nei pazienti con LMA sembrano attribuibili ad una maggiore mortalità legata al trapianto, piuttosto che ad una aumentata incidenza di ricadute.

Fattori correlati all'outcome clinico

Si è, quindi, proceduto all'analisi del ruolo di diversi parametri clinici e biologici sulla sopravvivenza libera da malattia nei riceventi di HSCT da donatore familiare HLA-aploidentico con neoplasie ematologiche. Nel dettaglio, sono stati valutati fattori inerenti ai pazienti e ai donatori, al regime di preparazione al trapianto, e al trapianto stesso.

Caratteristiche dei riceventi di HSCT, quali età e sesso, non hanno mostrato un impatto significativo sui risultati clinici del trapianto.

L'HSCT effettuato per una malattia neoplastica in fase avanzata ha un impatto negativo, seppur non in modo significativo, sulla EFS.

Non si è evidenziato alcun impatto del regime mieloablativo, ed in particolare dell'uso della TBI, rispetto a farmaci chemioterapici quali busulfano o treosulfano.

Parallelamente, le caratteristiche del trapianto, ed in particolare il numero di cellule staminali CD34+, così come il numero di linfociti T maturi CD3+ presenti nell'inoculo, non correlava con la LFS.

Avere effettuato il trapianto dalla madre piuttosto che dal padre o da un fratello/sorella sembra costituire un vantaggio, seppure nella nostra casistica la numerosità non consenta di osservare una variazione significativa della EFS.

Inoltre, aver ricevuto un trapianto da donatore NK-alloreattivo ha determinato una migliore EFS, seppure non si sia raggiunta una significatività statistica (EFS pari al 66% vs 41% in caso di donatore NK non-alloreattivo, $p=0.11$) (Figura 6). Limitando l'analisi alle sole leucemie acute, il vantaggio dell'aver un donatore NK-alloreattivo, in termini di EFS, aumenta (EFS pari al 63% vs 35%, $p=0.08$).

Il vantaggio osservato è pressoché completamente ascrivibile ai pazienti con LLA. Infatti, i pazienti affetti da LLA che avevano ricevuto il trapianto da donatori NK-alloreattivi hanno mostrato una EFS pari al 73%, a differenza del 42% di pazienti vivi ed in remissione dopo HSCT da donatore NK non-alloreattivo. La migliore EFS osservata nei pazienti affetti da LLA che avevano ricevuto un HSCT da donatore NK-alloreattivo è risultata principalmente ascrivibile ad un rischio significativamente ridotto di recidiva (REL: 16% in pazienti con donatore NK-alloreattivo, vs 51% in pazienti con donatore NK-non alloreattivo, $p<0.05$), probabilmente determinato dall'attività an-

ti-leucemia mediata da linfociti NK del donatore. Viceversa, la mortalità legata al trapianto non è risultata significativamente correlata alla NK-alloreattività del donatore.

Un altro fattore che ha mostrato un impatto sulla sopravvivenza libera da malattia nei pazienti con leucemia acuta è risultato essere il periodo nel quale è stato effettuato il trapianto. In particolare, aver ricevuto l'HSCT dopo il 01/01/2005 si è associato ad una LFS pari al 62%, in paragone ad una LFS del 42% nei pazienti trapiantati prima di tale data. Il netto miglioramento nell'*outcome* del trapianto, rilevato a partire dal 2005, è risultato ascrivibile ad una significativa riduzione della mortalità legata al trapianto (6% dal 01/01/05 vs 33% prima del 01/01/05, $p < 0.005$), dovuta all'implementazione di protocolli di monitoraggio delle infezioni post-trapianto, e trattamento pre-sintomatico mediante somministrazione di farmaci anti-infettivi o, in caso di mancata disponibilità di agenti specifici, o di mancata risposta ai farmaci, mediante infusione di prodotti per terapia cellulare.

Discussione

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche rappresenta il trattamento di scelta per molte patologie oncoematologiche dell'infanzia e dell'età adulta. Tuttavia, un donatore familiare HLA-identico è disponibile solo in circa il 25% dei casi. Inoltre, per i pazienti sprovvisti di un fratello o sorella HLA-identico, spesso, non è possibile identificare in tempo utile un donatore volontario non consanguineo nei registri internazionali dei donatori volontari di midollo osseo. Esiste, quindi, un consistente numero di soggetti che, pur avendo l'indicazione ad un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, non possono beneficiare di tale procedura essendo sprovvisti di un donatore idoneo. Proprio per questo motivo, sono state sviluppate nel corso degli anni strategie trapiantologiche alternative, basate sull'impiego di fonti di cellule staminali emopoietiche differenti (come ad esempio il sangue placentare) o sull'impiego di donatori familiari HLA-parzialmente compatibili. In particolare, questo secondo approccio appare di rilevante interesse, in quanto permette virtualmente di poter identificare un donatore di cellule staminali emopoietiche per tutti i pazienti candidati ad un trapianto.

La popolazione da noi analizzata e descritta nel presente lavoro, che include 72 pazienti pediatrici sottoposti a trapianto aploidentico T-depleto di cellule staminali emopoietiche, rappresenta ad oggi la casistica più numerosa fino ad ora descritta nella letteratura medica in ambito pediatrico. Inoltre, il periodo di osservazione post-trapianto particolarmente lungo (mediana di *follow-up* pari a quasi 3 anni) contribuisce a rendere questi risultati particolarmente significativi. Numerosi sono gli aspetti degni di nota dei risultati ottenuti da questo studio e che meritano di essere discussi e commentati.

In primo luogo va segnalato il basso numero di casi di rigetto osservati: solo 6 pazienti (8%) hanno infatti presentato un rigetto acuto o una perdita tardiva del trapianto. Questo risultato appare di particolare rilievo proprio perché la rimozione della maggior parte dei linfociti T dall'inoculo midollare si associa frequentemente a maggiori difficoltà nell'ottenere l'attecchimento delle cellule staminali emopoietiche trapiantate e ad un maggiore rischio di rigetto del trapianto.

Allo stesso modo, anche la cinetica di attecchimento del trapianto appare particolarmente buona, con un tempo mediano per l'attecchimento dei polimorfonucleati neutrofilici di 13 giorni ed un tempo mediano per l'attecchimento piastrinico di soli 12 giorni. La cinetica di attecchimento ed il rischio di rigetto sono decisamente favorevoli anche quando confrontati con i risultati comunemente osservati nel contesto di trapianto di midollo osseo da donatore familiare o volontario non consanguineo HLA-identico. A questo proposito, è possibile che l'elevato numero di cellule staminali infuse, con una mediana di 20×10^6 cellule CD34+ per Kg di peso corporeo del ricevente, abbia giocato un ruolo importante per quanto riguarda la bassa percentuale di rigetti, ed abbia contribuito alla rapida ricostituzione ematologica osservata.

Infatti, seppur senza raggiungere il livello di significatività statistica, si segnala come la LFS sia risultata migliore per i pazienti che hanno ricevuto un numero di cellule CD34+ superiore alla mediana.

Anche per quel che riguarda la GvHD i risultati sono degni di nota, con un'incidenza cumulativa globale pari al 25% per la GvHD acuta di grado II-IV (solo del 4% per i gradi III-IV) e uguale all'11% per la GvHD cronica. Questi valori sono simili, se non addirittura inferiori, a quanto osservabile nel contesto di trapianti da donatore HLA-compatibile.

Particolarmente basso è poi risultato il rischio di mortalità trapianto-correlata, con un'incidenza cumulativa globale pari al 15%, valore sovrapponibile a quanto si può osservare dopo un trapianto da donatore volontario non consanguineo. L'incidenza cumulativa di mortalità trapianto correlata scende poi al 6% quando vengono presi in considerazione solo i trapianti effettuati dopo il 2005.

Come già descritto da Stern e colleghi [26], l'impiego della madre quale donatrice delle cellule staminali sembra dare un vantaggio in termini di *outcome* clinico rispetto al padre. Come già ipotizzato, questo vantaggio potrebbe essere il risultato dell'esposizione del sistema immunitario della madre nei confronti degli antigeni fetali durante la gravidanza. Questa esposizione sarebbe in grado di favorire lo sviluppo, tramite il trasferimento con il trapianto di un limitatissimo numero di linfociti T materni, di un effetto *Graft Versus Leukemia* T-dipendente, sufficiente a ridurre il rischio di recidiva leucemica.

Globalmente, la probabilità di sopravvivenza libera da leucemia post-trapianto è risultata essere del 55%, con risultati significativamente migliori per la LLA rispetto alla LMA (61% vs 33%). Questa differenza è dovuta soprattutto ad un più basso rischio di ricaduta per i pazienti affetto da LLA rispetto alla LMA (10% vs 29%), mentre la differenza per quel che riguarda la mortalità trapianto-correlata è minore (29% per le LLA e 38% per le LMA).

Il dato più interessante, confermato dal nostro studio, riguarda comunque l'impatto dell'alloreattività NK sull'*outcome* dei pazienti trapiantati. I soggetti che hanno ricevuto il trapianto da un donatore NK-alloreattivo hanno, infatti, una probabilità di guarigione nettamente superiore a quella dei soggetti trapiantati da donatore non NK-alloreattivo (66% vs 41%). Questo effetto, mediato dalle cellule NK, è molto più evidente nel sottogruppo di pazienti affetti da LLA (dove il vantaggio in termini di sopravvivenza libera da malattia arriva al limite della significatività statistica) rispetto ai pazienti con una diagnosi di LMA. Il vantaggio in termini di *outcome* clinico per i pazienti che hanno ricevuto un trapianto da donatore NK-alloreattivo è legato essenzialmente ad una netta e significativa riduzione del rischio di ricaduta che, per i pazienti affetti da LLA, raggiunge la significatività statistica (16% nel caso di donatore NK-alloreattivo vs 51% nel caso di donatore non NK-alloreattivo, $p = 0,035$), mentre è più limitato nella LMA (33% vs 44%, p non significativa).

Infine, è doveroso sottolineare il miglioramento dei risultati nel corso del tempo, passando da una sopravvivenza libera da malattia del 42% per i pazienti trapiantati prima del 2005 al 62% per i pazienti trapiantati dopo il 2005 ($p=0.06$). Questo netto miglioramento è dovuto ad una drastica riduzione della mortalità trapianto-correlata, dal 33% di prima del 2005 al 6% dei trapianti effettuati in epoca più recente ($p=0.002$).

In conclusione, questo lavoro dimostra come il trapianto di cellule staminali emopoietiche da sangue periferico da donatore familiare HLA-parzialmente compatibile, dopo procedura di T-deplezione, rappresenti una valida opzione terapeutica per pazienti che necessitano di un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche ma che sono sprovvisti di un donatore familiare o non consanguineo HLA-compatibile. Questa opzione terapeutica dovrebbe essere presa in considerazione per tutti i pazienti per cui sussiste un'indicazione ad un trapianto allogenico e non solo come ultima risorsa per pazienti con malattia refrattaria o plurirecidivata. L'*outcome* finale dei soggetti sottoposti a questa procedura può essere migliorata impiegando, quando possibile, un donatore NK-alloreattivo, preferibilmente la madre, e cercando di infondere un elevato carico di cellule staminali CD34+.

Tabelle e figure

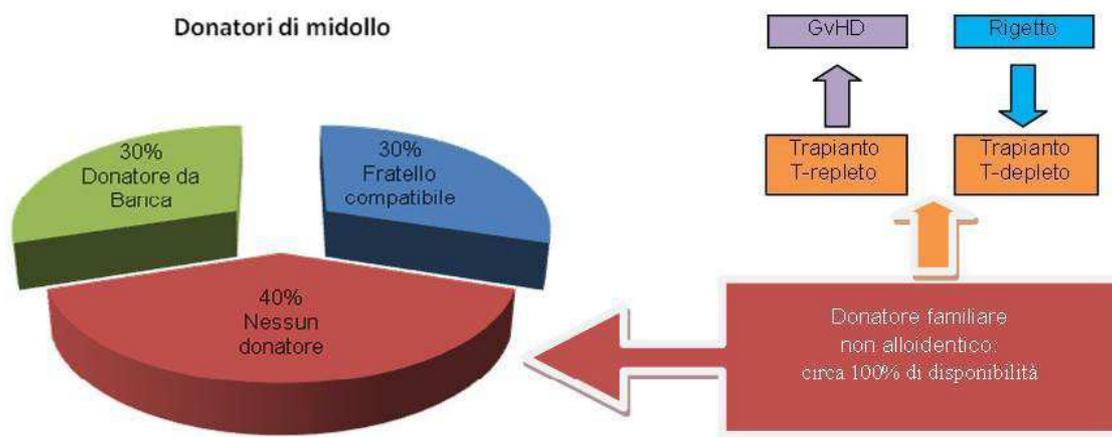


Figura 1. Per quasi tutti i pazienti leucemici per i quali non è possibile trovare un donatore compatibile, sia consanguineo che non, o una idonea unità di sangue cordonale, un'opzione è il trapianto da un donatore familiare, che sia compatibile per un aplotipo HLA e completamente incompatibile per i loci HLA di classe I e di classe II dell'aplotipo non condiviso (aploidentico). Gli ostacoli al trapianto di midollo osseo da donatore aploidentico sono l'elevata incidenza di grave GvHD acuta nei trapianti non manipolati (*T Cell Replete*), e il rigetto nei trapianti T cell-depleti.

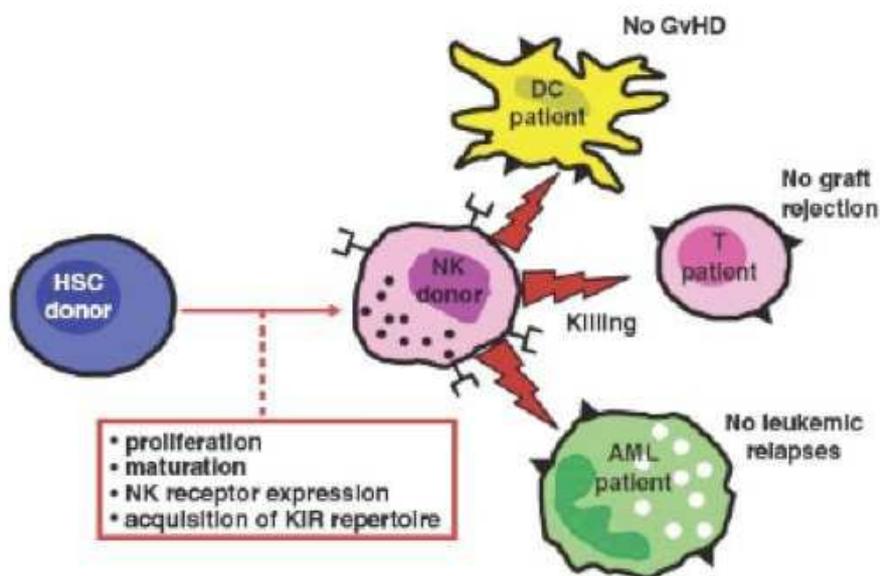


Figura 2. Le cellule NK sono generate dalle cellule staminali (HSC) del donatore. Esse subiscono un processo di maturazione e acquisiscono il repertorio KIR del donatore. Così, contengono un sottogruppo di cellule NK alloreattive caratterizzate dalla capacità di uccidere efficacemente le cellule leucemiche in vitro. Le cellule NK alloreattive possono uccidere le cellule leucemiche residue dopo chemioterapia e radioterapia (regime di condizionamento). Questo trattamento può prevenire le ricadute leucemiche. Esse possono anche eliminare le DC del paziente, prevenendo così il *priming* di (poche) cellule T allogene residue nella sospensione di HSC trapiantate, e la GvHD. Infine, le cellule NK alloreattive uccidono le cellule linfo-emopoietiche residue del paziente, inclusi i linfociti T, prevenendo così il rigetto del trapianto.

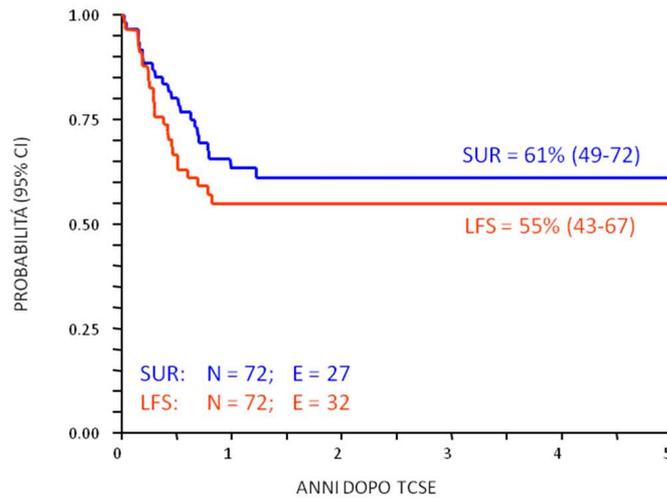


Figura 3. Sopravvivenza totale (SUR), e sopravvivenza libera da malattia (LFS) della coorte analizzata.

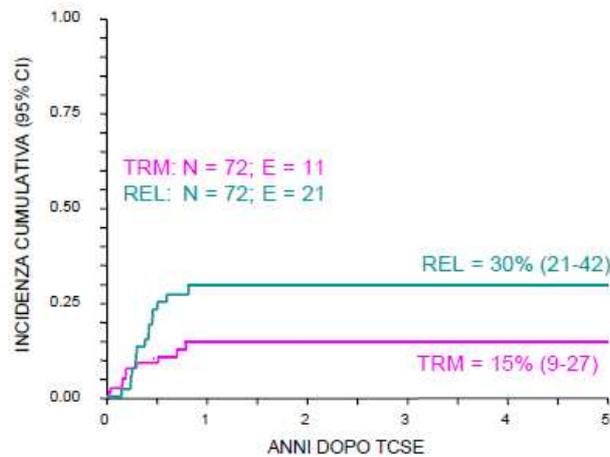


Figura 4. Mortalità legata al trapianto (TRM), e incidenza di ricadute (REL) nella coorte analizzata.

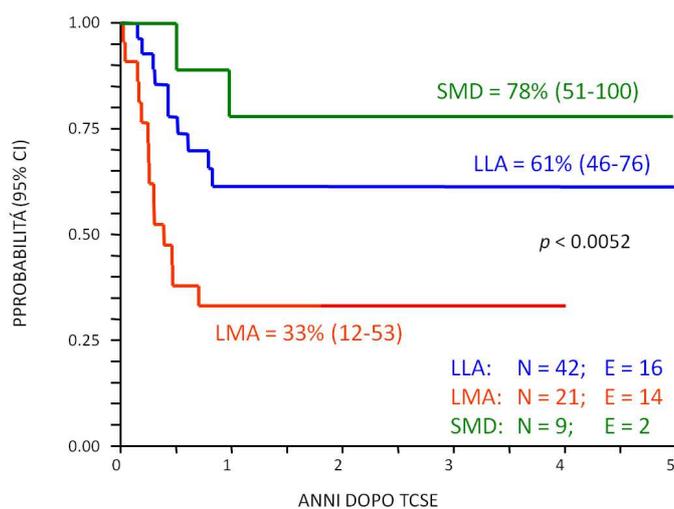


Figura 5. Sopravvivenza libera da malattia in base al tipo di neoplasia ematologica.

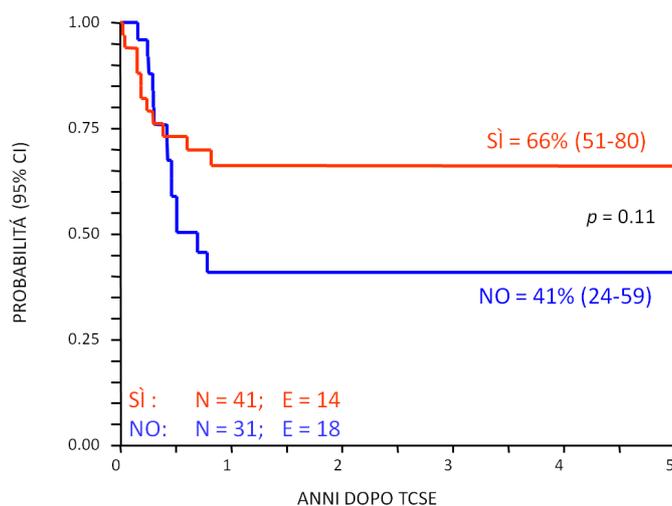


Figura 6. Sopravvivenza libera da malattia di tutta la coorte analizzata in base alla alloreattività NK del donatore.

Bibliografia

1. Thomas ED. Marrow transplantation for malignant disease. *J Clin Incol* 1983;1:517-531.
2. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999;94:333-339.
3. Anasetti C, Amos D, Beatty PG et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med* 1989;320:197-204.
4. Beatty PG, Mori M, Milford E. Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. *Transplantation* 1995;60:778-792.
5. Kernan NA, Flomemberg N, Dupont B et al. Graft rejection in recipients of T cell depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia: identification of host derived anti-donor cytotoxic T lymphocytes. *Transplantation* 1987;43:842-847.
6. Klingebiel T, Handgretinger R, Lang P et al. Haploidentical transplantation for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Blood Reviews* 2004;18:181-192.
7. Rowe JM, Lazarus HM. Genetically haploidentical stem cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:669-676.
8. Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF et al. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev* 2006;214:202-218.
9. Arcese W, Aversa F, Bandini G et al. Clinical use of allogeneic hematopoietic stem cells from sources other than bone marrow. *Haematologica* 1998;83:159-182.
10. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 1994;84:3948-3955.
11. Reisner Y, Lapidot T, Singer TS et al. The host barrier in animal models of T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Serono Symposia Review* 1988;13:37.
12. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007;110:2764-2767.
13. Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donor for pediatric patients. *Bone Marrow Transplantation* 2008;41:207-214.
14. Ball LM, Lankester AC, Bredius RGM et al. Graft dysfunction and delayed immune reconstitution following haploidentical peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:S35-S38.
15. Perruccio K, Tosti A, Burchielli E et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood* 2005;106:4397-4406.
16. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* 2006;134:64-76.
17. Comoli P, Basso S, Zecca M et al. Preemptive treatment of EBV-related post-transplant lymphoproliferative disorders after pediatric haploidentical stem cell transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:1648-1655.

18. Locatelli F, Comoli P, Montagna D et al. Innovative approaches of adoptive immune cell therapy in paediatric recipients of haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004;17:479-492.
19. Aversa F, Tabilio A, Velardi A et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Eng J Med* 1998;339:1186-93.
20. Lee LA, Sergio JJ, Sykes M. Natural killer cells weakly resist engraftment of allogeneic, long-term, multilineage-repopulating hematopoietic stem cells. *Transplantation* 1996;61:125-132.
21. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999;94:333-339.
22. Lang P, Handgretinger R. Haploidentical SCT in children: an update and future perspectives. *Bone Marrow Transplantation* 2008;42:S54-S59.
23. Anasetti C, Hansen JA. Effect of HLA incompatibility in marrow transplantation from unrelated and HLA-mismatched related donors. *Transfus Sci* 1994;15:221-230.
24. Aversa F, Terenzi A, Felicini R et al. Mismatched T cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation for children with high-risk acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:S29-S32.
25. Henslee-Downey PJ, Abhyankar SH, Parrish RS et al. Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. *Blood* 1997;89:3864-3872.
26. Stern M, Ruggeri L, Mancusi A et al. Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor. *Blood* 2008;112:2990-2995.