

TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE DOPO CONDIZIONAMENTI NON MIELOABLATIVI

*Andrea Bacigalupo Dipartimento di Ematologia, Ospedale San Martino
GENOVA*

INTRODUZIONE

Le basi del trapianto di midollo osseo (TMO) sono state poste nel topo negli anni 50-60, e queste sono alcune delle tappe importanti di quel percorso scientifico:

- 1) il midollo dato per via venosa è efficace nel ricostituire gli spazi midollari altrettanto del midollo dato per altra via (van Bekkum et al, 1956)
- 2) il midollo come organo immunocompetente può generare una risposta immunologica contro il ricevente, o malattia trapianto verso ospite (GvHD) (van Bekkum et al, 1967)
- 3) la reazione immunologica GvHD è determinata da fattori genetici (Uphoff et al, 1957)
- 4) il methotrexate (MTX) riduce o previene la GvHD (Lorenz et al, 1951)
- 5) la ciclofosfamide (CY) da sola produce immunosoppressione sufficiente per l'attecchimento (Santos et al, 1969)

La ciclofosfamide (CY) era stata impiegata da George Santos a Baltimora come condizionamento per il TMO: il protocollo consisteva in quattro somministrazioni giornaliere di CY alla dose di 50 mg/kg/dose per un totale di 200mg/kg (Santos et al, 1969). Il protocollo venne presto impiegato anche a Seattle, primo centro a pubblicare dati nell'uomo (Thomas et al, 1972, Storb et al, 1974).

Va fatta subito una considerazione: in quel periodo, la ciclofosfamide non veniva impiegata a questi dosaggi, e pertanto la dose di 200mg/kg veniva considerata una dose molto elevata, o addirittura una dose limite. A riprova di questo fatto una dose di CY superiore a 1.55 gr/m² produceva una cardiotossicità 25% di pazienti (letale nel 12%) contro un 3% per una dose inferiore (letale in 0%) (Goldberg et al, 1986). Anche nell'animale la cardiotossicità è praticamente assente sino a 200mg/kg, e poi la curva s'impenna rapidamente; per cui a 220mg/kg il 20% degli animali muore della tipica cardiotossicità irreversibile da CY. La dose limite quindi è 200 mg/kg o 6-7 gr/m².

Nonostante una parte dei pazienti aplastici (40%) diventasse lungo sopravvive con ripresa ematologica trilineare, molti pazienti andavano in corso a rigetto del midollo: su 73 pazienti della analisi del 1977, 21 pazienti avevano rigettato (29%) (Storb et al, 1977).

Tra questi alcuni rari casi evidenziavano ricostituzione ematologica autologa anche completa (Barrett et al, 1979)

Questa fu un'osservazione cruciale per due motivi:

- 1) dimostrava che la CY alla dose di 200mg/kg, non era mieloablativa,
- 2) in secondo luogo suggeriva il coinvolgimento del sistema immunologico del ricevente nella patogenesi della malattia.

TRAPIANTO NON MIELOABLATIVO

Il termine di condizionamento non mieloablativo è stato impiegato da Rainer Storb alla fine degli anni '70 appunto per indicare questo il protocollo usato nell'Anemia Aplastica (AA) ovvero ciclofosfamide 200 mg/kg (CY200) (Storb et al, 1978)

Recentemente, sono stati proposti protocolli di condizionamento prevalentemente immunosoppressivi, per eseguire trapianti in pazienti in età avanzata, e superare la barriera della TRM : ci si riferisce a questi trapianti con il termine di minitrapianti o trapianti senza mieloablazione. In realtà l'anemia aplastica ci offre un ottimo modello umano di trapianto non mieloablativo, con esperienza ventennale e identificazione di effetti collaterali a breve e a lungo termine.

Lezioni dal TMO non mieloablativo nelle anemie aplastiche

1. Un condizionamento non mieloablativo è in grado di indurre attecchimento persistente delle cellule del donatore (engraftment) in percentuale variabile fino al 100%.
2. L'attecchimento completo si associa spesso, ma non sempre, alla presenza di GvHD cronica
3. L'incremento della intensità del condizionamento per aumentare il grado di attecchimento si associa con un aumento delle complicazioni a breve e a lungo termine
4. Una eccezione a questa regola è l'impiego di una immunosoppressione pre-TMO non tossica: al posto della irradiazione linfonodale per esempio la globulina antilinfocitaria (ALG)
5. L'attecchimento parziale (mixed chimerism) è compatibile con una funzione emopoietica conservata
6. È possibile che in alcuni pazienti si determini una condizione di "dipendenza" dalla terapia immunosoppressiva, in assenza della quale, il trapianto viene perso
7. Non vi è rischio di tumore secondario
8. La tossicità dipende dall'età: tanto più giovane il paziente, tanto inferiore

E cosa succederebbe se usassimo il condizionamento CY200 per malattie ematologiche neoplastiche? Possiamo anticipare

- una riduzione delle complicazioni a breve termine
- una riduzione delle complicazioni a lungo termine, inclusi i tumori secondari
- una elevata percentuale di ricadute leucemiche

Purtroppo mentre quest'ultime sono "trattabili" nelle aplasie, nelle emoblastosi, finirebbero per non modificare il corso naturale della malattia.

Per superare questo ostacolo, senza aumentare l'aggressività del condizionamento, sarebbe necessario impiegare dosi midollari enormi, che nell'uomo sono ancora oggi poco praticabili (la dose di $20-40 \times 10^6$ cellule midollari impiegata nel topo con condizionamenti non mieloablativi, equivale nell'uomo a 40 volte la dose che comunemente usiamo in clinica, quindi a circa 120×10^8 cellule midollari/kg).

Idealmente per eseguire un trapianto senza mieloablazione occorre

- forte immunosoppressione pre-TMO
- elevatissimo numero di cellule staminali
- elevato numero di linfociti (anche se un numero elevato di linfociti espone al rischio di GvHD acuta, e quindi l'impiego di linfociti trasdotti con geni suicidi potrebbe essere utile)

-modica immunosoppressione post-TMO, possibilmente di breve durata (per evitare il rischio di dipendenza)

Primi risultati clinici dei trapianti senza mieloablazione

I primi risultati dei trapianti senza mieloablazione o minitrapianti nelle emoblastosi, confermano queste previsioni: la tossicità è limitata, persistono alcune complicanze come la GvHD specie per la estrema variabilità e intensità dei condizionamenti.

Fludarabina- ciclofosfamide (FLU-CY)

Il protocollo di Houston fludarabine- ciclofosfamide originariamente sviluppato per la terapia delle leucemie linfatiche croniche resistenti, si è rivelato estremamente immunosoppressivo e capace di indurre chimerismo in un elevato numero di pazienti. A Genova, abbiamo utilizzato questo protocollo in 19 pazienti con varie malattie ematologiche: abbiamo confermato un buon livello di attecchimento, specie nelle malattie croniche e nelle aplasie midollari, ma la recidiva leucemica è un problema che andrà affrontato. La nostra impressione è che nelle leucemie acute, specie se avanzate sia inefficace.

In altri Centri hanno impiegato la FLU in associazione con basse dosi di busulfano (Jerusalem, S Slavin), con basse dosi di melphalan (Londra, S McKinnon), basse dosi di tiotepa (Milano, P Corradini), con alte dosi di ciclofosfamide (Bethesda, J Barrett). I risultati sono globalmente incoraggianti ma molto preliminari.

Irradiazione total corporea (TBI) 2 Gy

Protocollo sviluppato da Rainer Storb a Seattle nel modello canino, ora attivo nell'uomo con profilassi della GvHD ciclosporina e micofenolato mofetil (MMF): nei primi 30 casi si è osservato un buon livello di chimerismo, ed un buon controllo della malattia specie in pazienti con malattie croniche

Irradiazione total corporea (TBI) 1 Gy

Il gruppo di P Quesenberry sta utilizzando una dose molto piccola di TBI (1 Gy) che nel topo riduce dell'80% il compartimento staminale: i primi due pazienti preparati con TBI 1 Gy e ATG

Irradiazione timica e ciclofosfamide.

Protocollo di Boston (G Spitzer) con 7 Gy di irradiazione timica e CY 150 mg/kg con ATG. Sembra induca un certo grado di chimerismo e 15 pazienti sono entrati nello studio, in prevalenza linfomi non Hodgkin recidivati.

Prime conclusioni

Le prime conclusioni in accordo con un recente Workshop sono le seguenti:

1. il termine minitrapianto è improprio e piu' appropriato sarebbe trapianto con condizionamento di ridotta intensità
2. il minitrapianto è una terapia sperimentale: la tossicità è limitata, ovvero ridotta rispetto ad un trapianto convenzionale, ma non assente
3. non conosciamo la efficacia dei minitrapianti nella cura di malattie neoplastiche
4. il minitrapianto puo' essere proposto a pazienti altrimenti non elegibili per un trapianto allogenico convenzionale
5. pazienti con leucemia acuta non sono probabilmente buoni candidati
6. pazienti con malattie croniche (CLL, CML, linfomi) possono essere trattati
7. è dubbio l'effetto nei tumori solidi, ma dovrebbe essere esplorato
8. sarà necessario seguire attentamente questi pazienti per valutare effetti a breve e lungo termine

9. la grande esperienza acquisita con le aplasie midollari trattate con la ciclofosfamida sola, può dare indicazioni importanti su alcuni di questi effetti a breve e lungo termine. Fra queste il rapporto fra intensità del condizionamento, numero di cellule staminali e di linfociti trapiantati, intensità della immunosoppressione in vivo post-trapianto: queste variabili determinano il grado di attecchimento, del chimerismo e la stabilità della funzione ematopoietica

Bibliografia pertinente

1. Barrett AJ. Allogeneic bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia-the London experience. *Clin Lab Haematol* 1 (2): 95-107; 1979.
2. Bortin MM, Gale RP and Rimm AA for the Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry: Allogeneic Bone Marrow Transplantation for 144 patients with Severe Aplastic Anemia. *JAMA* vol. 245, n°11; 1981.
3. Champlin RE, Ho WG, Nimer SD, et al. Bone Marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Transplantation* 49: 720-724; 1990.
4. Champlin R, Khouri I, Kornblau S, Molldrem J, Giralt S: Reinventing bone marrow transplantation: reducing toxicity using nonmyeloablative, preparative regimens and induction of graft-versus-malignancy. *Curr Opin Oncol* 11: 87-95; 1999.
5. Gluckman E, Sociè G, Devergie A, Bourdeau-Esperou H, Traineau R, Cosset JM. Bone marrow transplantation in 107 patients with severe aplastic anemia using cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning: long-term follow-up. *Blood* 78: 2451-2455; 1991.
6. Goldberg MA, Antin JH, Guinan EC, et al. Cyclophosphamide cardiotoxicity: an analysis of dosing as a risk factor. *Blood* 68: 1114-1118; 1986.
7. Khouri IF, Keating M, Korbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, Giralt S, Ippoliti C, von Wolff B, Gajewski J, Donato M, Claxton D, Ueno N, Andersson B, Gee A, Champlin R: Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 16: 2817-2824; 1998.
8. Lochte HL Jr, Levy AS, Guenther DE, Thomas ED, Ferrebee JW. Prevention of delayed foreign marrow reaction in lethally irradiated mice by early administration of methotrexate. *Nature* 196: 1110-1111; 1962.
9. McCann SR, Bacigalupo A, Gluckman E, Hinterberger W, Hovs J, Ljungman P, Marin P, Nissen C, van't Veer Kerthof E, Raghavashar A, Sociè G, Frickhofen N, Locasciulli A, Schrezenmeier H: Graft rejection and Second Bone Marrow Transplants for Acquired Aplastic Anaemia: a report from the Aplastic Anaemia Working Party of the European Bone Marrow Transplant Group. *Bone Marrow Transpl* 1994; 13: 233-237.
10. McGlave PB, Haake R, Miller W, Kim T, Kersey J, Ramsay NKC. Therapy of severe aplastic anemia in young adults and children with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 70: 1325-1330; 1987.
11. Santos GW, Owens AH Jr. Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice. *Transplant Proc* 1: 44-46; 1969
12. Slavin S, Naparstek E, Aker M, Cividalli G, Engelhard D, Hardan Y, Bromiker R, Brautbar C, Weshler Z, Or R. The use of total lymphoid irradiation (TLI) for prevention

- of rejection of T-lymphocyte depleted bone marrow allografts in non-malignant hematological disorders. *Transplant Proc* 21 (1 Pt 3): 3053-3054; 1989.
13. Sociè G, Henry-Amar M, Cosset JM, Devergie A, Girinsky T, Gluckman E: Increased incidence of solid malignant tumors after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Blood* 78: 277-279, 1991.
 14. Storb R, Thomas ED, Buckner CD, et al: Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anaemia: a follow up on long-term survivors. *Blood* 48: 817-841; 1976.
 15. Storb R, Prentice RL and Thomas ED. Marrow transplantation for treatment of Aplastic Anemia. An Analysis of Factors Associated with Graft Rejection. *New England Journal of Medicine* vol.296: 61-65; 1977.
 16. Storb R, Thomas ED for the Seattle Marrow Transplant Team: Marrow Transplantation for treatment of Aplastic Anaemia. *Clinics in Haematology* vol.7, n°3; 1978.
 17. Storb R, Erzioni R, Anasetti C, Appelbaum FR, Buckner CD, Besinger W, Bryant E, Clift R, Deeg HJ, Doney K, Flowers M, Hansen J, Martin P, Pepe M, Sale G, Sanders J, Singer J, Sullivan KM, Thomas ED, Winterspoon RP: Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia. *Blood* 84: 941-949; 1994.
 18. Storb R, Yu C, Sandmaier BM, Mcsweeney PA, Georges G, Nash RA, Woolfrey A: Mixed hematopoietic chimerism after marrow allografts. Transplantation in the ambulatory care setting. *Ann N Y Acad Sci* 872: 372-375; 1999.
 19. Thomas ED, Buckner CD, Storb R, et al: Aplastic Anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet* 1: 284-289; 1972.
 20. Uphoff DE. Genetic factors influencing irradiation protection by bone marrow. I. The F1 hybrid effect. *J. Natl Cancer Inst* 19: 123-125; 1957.
 21. Uphoff DE. Alteration of homograft reaction by Amethopterin in lethally irradiated mice treated with homologous marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 99: 651-653; 1958.
 22. Van Bekkum DW, Vos O, Weyzen WWH, Homo- et hétérogrefte tissues hématopoiétiques chez la souris. *Rev. D'Hémat* 11: 477-485; 1956.