

# ALTE DOSI E AUTOTRAPIANTO NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

Ignazio Majolino, Rosanna Scimè, Stefania Tringali e Alessandra Santoro

*Divisione di Ematologia e Trapianti di Midollo Osseo,  
Azienda Ospedaliera V.Cervello, Palermo*

La leucemia linfatica cronica (LLC), la più diffusa forma di leucemia nei paesi occidentali, è caratterizzata dalla proliferazione clonale e dall'accumulo di B-linfociti che esprimono gli antigeni CD19, CD20, CD5 e, debolmente, Ig di superficie. Da un punto di vista molecolare, il clone neoplastico è contraddistinto da riarrangiamenti genici, specifici di ogni singolo paziente, a carico della catena pesante delle immunoglobuline. L'età media alla diagnosi è di 65 anni. Il 40% dei pazienti ha meno di 60 anni e solo il 10-15% meno di 50.<sup>1</sup>

Il decorso clinico è variabile con forme indolenti o "smouldering," che non richiedono trattamento ed in cui la sopravvivenza è sovrapponibile a quella della popolazione generale <sup>1</sup>, e forme più aggressive con sopravvivenza inferiore a 3 anni. Lo stadio clinico, che è espressione diretta dell'estensione della malattia, rappresenta il fattore prognostico più rilevante <sup>2, 3</sup>. Tuttavia, altri parametri biologici hanno mostrato rilevanza prognostica indipendente: tra questi il tempo di raddoppiamento linfocitario <sup>4</sup>, il pattern di infiltrazione midollare <sup>5</sup>, la presenza di anomalie cromosomiche <sup>6, 7</sup> e la risposta alla terapia.

## **Dalla terapia convenzionale alle alte dosi**

La diagnosi di LLC non comporta automaticamente la necessità di un trattamento. Per le forme "attive" le terapie convenzionali, sia con chlorambucil che con associazioni poli-chemioterapiche (ad esempio ChOP) possono determinare risposte ematologiche e cliniche anche di lunga durata, ma che raramente si traducono in vere remissioni complete <sup>8</sup>. L'introduzione della fludarabina ha determinato un significativo incremento del numero di risposte, sia complete che parziali <sup>9</sup>, con un vantaggio anche nei confronti di schemi contenenti ciclofosfamide e antracicline <sup>10, 11</sup>. La fludarabina appare capace di produrre e mantenere lunghe remissioni cliniche, ritardando il tempo alla progressione. Ma ciò si traduce solo in un modesto aumento della sopravvivenza <sup>12</sup>.

Parallelamente all'introduzione della fludarabina è iniziata l'esperienza con alte dosi seguite da trapianto autologo, dapprima solo in pazienti a prognosi sfavorevole ed in stadio avanzato. Il miglioramento delle tecniche trapiantologiche e l'impiego delle cellule staminali circolanti (CSC) ha consentito una riduzione della mortalità e della morbilità legate alla procedura. Confrontando i dati del trapianto autologo con quelli dell'allogeneico, Michallet e coll <sup>13</sup> mostrano per quest'ultimo una mortalità

trapiantologica particolarmente elevata (50%), che rende poco attraente questa opzione nonostante la bassa probabilità di recidiva.

### **Esperienze di autotrapianto**

Negli ultimi anni Il registro EBMT ha registrato una crescita rapida del numero di trapianti autologhi per LLC. Infatti, dei 193 autotrapianti riportati nel periodo 1988-1998 solo l'1% è stato effettuato prima del 1990, ed oltre il 50% dopo il 1995 <sup>13</sup>.

Ad oggi sono riportati oltre 170 pazienti con LLC trattati con alte dosi di chemio-radioterapia seguite da autotrapianto, la maggior parte nell'ambito di protocolli locali. L'analisi retrospettiva EBMT li comprende quasi tutti <sup>13</sup>. Nella tabella 1 abbiamo raccolto i dati relativi alle esperienze più numerose sinora pubblicate, omettendo il lavoro basato sui dati di Registro EBMT. Quasi tutti reclutavano pazienti in stadio avanzato (B o C di Binet), fino a 65 anni di età e con lungo intervallo dalla diagnosi, ma con malattia ancora responsiva al trattamento. Il regime mieloablativo di più frequente impiego era TBI-ciclofosfamide <sup>14-16</sup>, immediatamente seguito da BEAM e da busulfano-melphalan <sup>17, 18</sup>. La sorgente di cellule staminali era inizialmente il midollo osseo, ma più recentemente sono state impiegate le CSC. Una forma di *purging* era applicata nella metà degli studi. La mortalità riportata era ragionevolmente bassa (da 0 a 13%). La probabilità di remissione completa dopo il trapianto oscillava nelle varie casistiche tra il 50-80%. Solo in pochi studi è disponibile un follow-up molecolare, che pur utilizzando metodi di differente sensibilità, mostra indiscutibilmente che è possibile ottenere la negativizzazione molecolare del midollo osseo in più della metà dei casi (Fig 1), un dato che è naturalmente in relazione con la sensibilità del metodo impiegato <sup>18, 19</sup>. Nei paragrafi che seguono verranno analizzati aspetti particolari della tecnica di autotrapianto nella LLC.

### **Mobilizzazione e collezione di CSC nella LLC**

Negli studi di autotrapianto sinora riportati la sorgente di cellule staminali è stata in prevalenza il midollo osseo. Solo recentemente sono state adottate tecniche di mobilizzazione dei progenitori emopoietici con chemioterapia e fattori di crescita. Appare consolidato il dato che la LLC è una condizione in cui la mobilizzazione è più difficile che in altre patologie. Le ragioni possono risiedere nella natura stessa della malattia, che presenta midollo costantemente invaso, nel numero e tipo dei trattamenti precedenti ed infine nella contemporanea raccolta di linfociti neoplastici.

Dreger e coll (Dreger P., personal communication) in 53 pazienti con LLC utilizzavano per la mobilizzazione la combinazione Dexa-BEAM impiegata per indurre una risposta clinica. Avevano l'11% di fallimenti. Con 3 leucaferesi ottenevano una mediana di  $18 \times 10^6/\text{kg}$  CD34, ma il 90% dei pazienti erano vergini da trattamento. L'intervallo dalla diagnosi era conseguentemente breve. Scimè e coll <sup>20</sup> in un campione di 17 pazienti prevalentemente già trattati, ma con malattia sensibile alla fludarabina o al DEXA-BEAM, mobilizzavano le CSC con ciclofosfamide  $4 \text{ g}/\text{m}^2$  seguita da G-CSF  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Con un target di  $>1 \times 10^6/\text{kg}$  CD34 avevano 3 fallimenti, uno dei quali dovuto ad assenza di un picco determinabile di CD34. La mediana di CD34 raccolte era di  $2.2 \times 10^6/\text{kg}$  (0.5-4.3 ). Il

numero di progenitori era significativamente superiore nella classe di pazienti in remissione completa al momento della mobilizzazione. Meloni et al <sup>17</sup> utilizzavano in 20 pazienti la classica mega-dose di ciclofosfamide (7g/m<sup>2</sup>) seguita da G-CSF, ed avevano 4 fallimenti nella mobilizzazione. Sulla base di questi dati è pertanto preventivabile una percentuale di fallimenti del 10-20%. E' probabile che una diversa selezione dei pazienti porti ad un miglioramento dei risultati.

### **Purificazione dei progenitori**

Sebbene non vi siano dati certi sull'utilità del *purging*, la LLC è certamente una malattia in cui la contaminazione del campione midollare o periferico è costante. Tutti i ricercatori pertanto vorrebbero poter impiegare una sorgente di progenitori sicura, ma poche esperienze sono ad oggi disponibili in questo campo. Pionieri nella purificazione nella LLC sono i ricercatori del Dana-Farber di Boston <sup>14, 19</sup>. Utilizzando midollo osseo autologo ed un cocktail di anticorpi monoclonali (anti-CD20, -CD10), essi ottenevano una negativizzazione PCR in 11 dei 28 campioni processati. I pazienti erano tutti rispondenti, con malattia minima al momento della collezione. Una tecnica diversa, di selezione positiva delle CD34 con anticorpi monoclonali legati a colonna, era impiegata in almeno due studi pubblicati, quello di Paulus e coll <sup>21</sup>, e quello di Scimè e coll <sup>20</sup>. Nel primo di questi venivano utilizzati in sequenza, con il sistema Isolex, due step di selezione, la prima positiva e la seconda negativa. Gli autori ottenevano un recupero complessivo di CD34+ del 40% con una deplezione di cellule leucemiche di circa 6 log. Nella seconda esperienza il recupero di CD34 era complessivamente deludente (30%), e ciò sembra da attribuire alla cattiva performance del sistema Ceparate in confronto ad Isolex. Complessivamente si otteneva una deplezione di 2.7 log di cellule CD5/CD20+, ma non si otteneva mai una negativizzazione molecolare dei campioni aferetici.

### **Alte dosi, risultati clinici**

E' ancora presto per definire l'utilità clinica delle alte dosi con autotrapianto nella LLC. Infatti gli studi sinora pubblicati sono fondati su casistiche limitate, e sono disomogenei per selezione dei pazienti, sorgente delle cellule staminali e loro purificazione, regimi di mobilizzazione e di condizionamento, durata del follow-up ed eventuali terapie successive al trapianto. Tuttavia, l'interesse nel trattamento ad alte dosi ed il suo impiego nella LLC fanno sì che un numero crescente di pazienti sono ormai avviati a questa procedura, che può considerarsi ormai fattibile e sicura (tab.2). Limitatamente ai pazienti in fase avanzata di malattia, e tenendo come criterio quello della chemiosensibilità, si può considerare avviabile al trapianto autologo il 50% circa di essi, <sup>22</sup>. Dei pazienti elegibili, il 70% circa ottiene una collezione di PBSC adeguata ad un trapianto sicuro (>1 x 10<sup>6</sup>/kg CD34). Il recupero ematologico, che è sempre in rapporto con i progenitori infusi, è riportato uniformemente rapido con l'impiego di PBSC. Nell'esperienza di Scimè et al <sup>18</sup>, utilizzando progenitori periferici purgati, i pazienti recuperavano 0.5 x 10<sup>9</sup> /l granulociti al giorno +15 e 25 x10<sup>9</sup> /l piastrine al giorno +20. Atteccimenti più rapidi sono riportati da Meloni e coll <sup>17</sup> che impiegano però CSC non manipolate, 12 e 15 giorni

rispettivamente per  $0.5 \times 10^9$  /l granulociti e  $25 \times 10^9$  /l piastrine. Analizzando le risposte cliniche appare che la probabilità di ottenere la remissione completa con il trapianto è legata prevalentemente alla sensibilità della malattia alla terapia a dosi convenzionali. Nell'esperienza iniziale del Dana Farber, successivamente confermata in una serie più vasta, viene riportato l'83% di remissioni complete durature in pazienti con malattia minima<sup>23</sup>. Il gruppo di Khouri riporta, in una serie di pazienti resistenti o ricaduti, una quota di remissioni complete del 50% con una DFS del 20%<sup>15</sup>. L'intervallo dalla diagnosi al trapianto e l'ottenimento di una risposta molecolare dopo il trapianto, oltre alla chemiosensibilità sembrerebbero influenzare la risposta<sup>15, 16, 24</sup>.

**Tab.1**  
**Esperienze di autotrapianto nella leucemia linfatica cronica**

Autori	N.	Età	Stadio	Status	Dx-TMO (mesi)	Fonte di staminali
Rabinowe, 1993	12	50 (27-54)	I/II =7 III=3 IV=2	Mal. Min.	28 (12-115)	MO°
Khouri, 1994	11	59 (37-66)	0=5 I/II=3 III=3	Ricaduti / Resist.	48 (15-198)	MO°
Dreger, 1999	38	51 (29-61)	NA	Mal. Min	NR	CSC°°
Meloni, 1999	20	46 (21-58)	Avanzato	RC	NR	PCSC
Scimè, 1999	17	54 (34-63)	BI=1 BII=13 CIV=2	11 RC 6 RP	27 (7-94)	CSC ^

*Legenda: NR = non riportato; MO= midollo osseo; Mal. Min. = malattia minima; CSC = cellule staminali circolanti; \* = Purging nel 37% dei casi con selezione negativa, 13% selezione positiva; ° = purging nel 100% dei casi con ab monoclonali, ab monoclonali + complemento; °° = purging nel 100% dei casi con doppia selezione; ^ = purging nel 100% dei casi con selezione positiva.*

### **La malattia residua**

Lo studio della malattia minima residua (MMR) ha assunto un ruolo crescente nel monitoraggio biologico dei pazienti in remissione completa e nel valutare l'efficacia delle alte dosi. Pertanto sono state sviluppate tecniche molecolari in grado di aumentare notevolmente la sensibilità dell'indagine. Nella LLC il metodo più sensibile per lo studio della MRD consiste nell'analisi del riarrangiamento dei geni che codificano per la regione variabile (VDJ) della catena pesante delle immunoglobuline (IgH). Si tratta di un marcatore molecolare di "lineage" clone-specifico, utilizzabile in più del 90% dei pazienti<sup>25</sup>. La costruzione di primers o sonde paziente-specifiche, disegnate in accordo alla

sequenza dei CDR3 del clone neoplastico d'esordio, rende più sensibile la rilevazione delle cellule tumorali e può essere utilizzato successivamente per lo studio della MRD dopo alte dosi <sup>26</sup>.

Questo approccio metodologico è schematizzato nella Fig 1. L'amplificazione di VDJ con il primer corrispondente alla regione FR3 può fallire a causa della presenza di mutazioni che non permettono un corretto "annealing". Un'alternativa si basa sull'amplificazione di un segmento di DNA più grande utilizzando il primer FR1 corrispondente alle 7 famiglie di geni VH. Utilizzando questo schema, Catania et al <sup>27</sup> hanno ottenuto una sequenza informativa in oltre il 90% di pazienti inseriti in un programma di alte dosi.

**Tab.2**  
**Risultati clinici dell'autotrapianto nella leucemia linfatica cronica**

Autori	Condiz	ANC >0.5 (gg)	Plt > 25 (gg)	RC %	TRM %	OS %	DFS %	Risposta Molec. (%)
Rabinowe, 1993	TBI+CY ^	21 (18-30)	29 (16-69)	83	7	NA	71	77*
Khoury, 1994	TBI+CY	21 (10-28)	35 (14-59)	50	18	NA	27	55
Dreger, 1999	TBI +CY	9 (8-13)	11 (7-214)	NR	5	95	86	NR*
Meloni, 1999	BEAM°	12 (9-24)	15 (10-115)	NR	5	85	54	62
Scimè, 1999	BU /MPH°	12 (9-15)	20 (16-68)	66	11	77	70	63*

*Legenda: ^= irradiazione corporea + ciclofosfamide; ° = BCNU, Etoposide, Aracytin, Melphalan; ° = Busulfano, Melphalan; NR= dato non riportato; \* IgH-PCR con oligo-paziente-specifico (sensibilità 10<sup>-4</sup> 10<sup>-6</sup>).*

### Conclusioni e prospettive

Le esperienze sinora condotte hanno dimostrato la fattibilità e la tollerabilità della procedura di autotrapianto nella LLC come documentano le basse percentuali di TRM uniformemente riportate. L'altro dato che emerge è la possibilità di ottenere un numero elevato di risposte complete anche molecolari in una quota di pazienti a prognosi sfavorevole. La risposta molecolare emerge come il fattore prognosticamente più rilevante per la probabilità di recidiva. I candidati ideali sono i pazienti responsivi al trattamento convenzionale. Il trapianto andrebbe collocato precocemente nel corso della malattia, soprattutto in relazione alla possibilità di ottenere una buona mobilitazione di PBSC. I dati presentati in questa rassegna sono stati la base per l'avvio di uno studio randomizzato di fase III, che si propone di determinare il ruolo dell'autotrapianto nella terapia della LLC attraverso un confronto con la sola fludarabina. Lo studio si svolge in ambito GIMEMA-GITMO.

Tuttavia, nonostante il numero elevato di remissioni complete, i pazienti continuano a recidivare dopo l'autotrapianto. Questa consapevolezza ha stimolato la ricerca in altri settori. Si va dallo studio delle alterazioni del ciclo cellulare attraverso lo studio della p53 e della p27<sup>28</sup>, all'impiego di nuovi farmaci inducenti l'apoptosi come i flavopiridoli<sup>29</sup>, alla terapia con anticorpi monoclonali. In particolare il Campath 1-H sta producendo incoraggianti risultati in pazienti refrattari alla fludarabina<sup>30</sup>

Infine, al confine tra immunoterapia e regimi ad alte dosi appare promettente la strategia del gruppo dell'MD-Anderson che, utilizzando regimi di condizionamento non mieloablativi in trapianti allogenici, riduce significativamente la tossicità e la mortalità per sfruttare meglio l'effetto GVL di successive infusioni di linfociti del donatore<sup>31</sup>. Per queste e per altre linee di ricerca è possibile intravedere un sostanziale cambiamento nel modo di considerare la terapia di una malattia, la leucemia linfatica cronica, sinora ritenuta incurabile.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lee J, Dixon D, Kantarjian H, Keating M, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987; 69:1929-36.
2. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1981; 48:198-206.
3. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46:219-234.
4. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; 60:2712-16.
5. Montserrat E, Gomis F, Vallespi T, et al. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1991; 78:1545-1551.
6. Cuneo A, Bigoni R, Castoldi G. Towards a clinically relevant cytogenetic classification of chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Haematologica* 1998; 83:577-579.
7. Juliusson G, Gahrton G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1990; 45:143-160.
8. O'Brien S, Del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; 85:307-318.
9. Keating MS, O'Brien S, Kantarjian H, et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine as single agent. *Blood* 1993; 81:2878-2784.
10. French Cooperative Group on CLL, Johnson S, Smith AG, et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 1996; 347:1432-1438.
11. Spriano M, Chiurazzi F, Cassiba V, et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine vs. chlorambucil and prednisone in previously untreated patients with

- active B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): conclusive report. *Haematologica* 1999; 84 (EHA-4 Abstract Book):259.
12. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 1998; 4:1165-1171.
  13. Michallet M, Van Biezen G, Bandini G, et al. Allografts and autografts in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Bone Marrow Transplant* 1999; 23 (suppl 1):S 170.
  14. Rabinowe SN, Soiffer RJ, Gribben JG, Nadler LM. Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for poor prognosis patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 82:1366-1376.
  15. Khouri IF, Keating MJ, Vriesendorp HM, Reading CL, Champlin RE. Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia: preliminary results. *J Clin Oncol* 1994; 12:748 -58.
  16. Dreger P, von Neuhoff N, Sonnen R, et al. Factors determining the feasibility and outcome of autologous stem cell transplantation for CLL. *Ann Oncol* 1999; 10 (suppl 3):S 072.
  17. Meloni G, Proia A, Mauro F, et al. Autograft as postremission treatment after fludarabine therapy in 20 chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients. *Haematologica* 1999; 84 (EHA-4 Abstract Book):27.
  18. Scimè R, Santoro A, Tringali S, et al. Autologous PBSC transplantation in CLL. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23 (suppl 1):S 173.
  19. Provan D, Bartlett-Pandite L, Zwicky C, et al. Eradication of polymerase chain reaction-detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88:2228-2235.
  20. Scimè R, Indovina A, Santoro A, et al. PBSC mobilization, collection and positive selection in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22:1159-1165.
  21. Paulus U, Dreger P, Viehmann K, et al. Combined positive/negative purging of heavily contaminated PBSC grafts from patients with B-CLL: efficacy in a clinical setting. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19 (suppl 1):S11.
  22. Milligan DW, Davies F, Morgan GJ, et al. Fludarabine followed by stem cell autografting for younger patients with CLL: preliminary results from the MRC pilot study. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23 (suppl1):S 171.
  23. Bartlett-Pandite L, Gribben JG, Soiffer R, et al. Potential for cure of B-CLL and SLL: prolonged disease free survival and molecular remissions following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88 (suppl 1):S 2718.
  24. Sutton L, Maloum K, Gonzalez H, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation as salvage treatment for advanced B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1998; 12:1699-707.
  25. Gribben JC. Minimal residual disease in non Hodgkin's lymphoma. *Forum* 1995; 5:650.
  26. Corradini P, Voena C, Astolfi M, et al. High-dose sequential chemoradiotherapy in multiple myeloma: residual tumor cells are detectable in bone marrow and peripheral blood cell harvests and after autografting. *Blood* 1995; 85:1596-1602.
  27. Catania P, Santoro A, Scimè R, et al. Patients specific primers for residual disease assessment in CLL autografting. V Congresso Nazionale SIES 1998; Abstract Book:S 33.
  28. Cobo F, Pinyol M, Hernandez L, et al. Cell cycle regulators in chronic lymphocytic leukemia (CLL): molecular implications for Richter's syndrome (RS). *Haematologica* 1999; 84 (EHA-4 Abstract Book):81.

29. Byrd JC, Shinn C, Waselenko JK, et al. Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p-53. *Blood* 1998; 92:3804-3816.
30. Keating M, Rai K, Flinn I, et al. Multicenter study of Campath- 1H in patients with chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) refractory to fludarabine. *Haematologica* 1999; 84 (EHA-4 Abstract Book):259.
31. Champlin R. Immunotherapy using non myeloablative regimens for allogeneic hematopoietic transplantation. *Haematologica* 1999; 84 (EHA-4 Abstract Book):127.

Figura 1: Studio della malattia minima residua nella LLC con l'impiego della PCR per il riarrangiamento IgH delle immunoglobuline. Primers paziente-specifici. Casistica del Gruppo collaborativo italiano (Scimè et al, 1999)

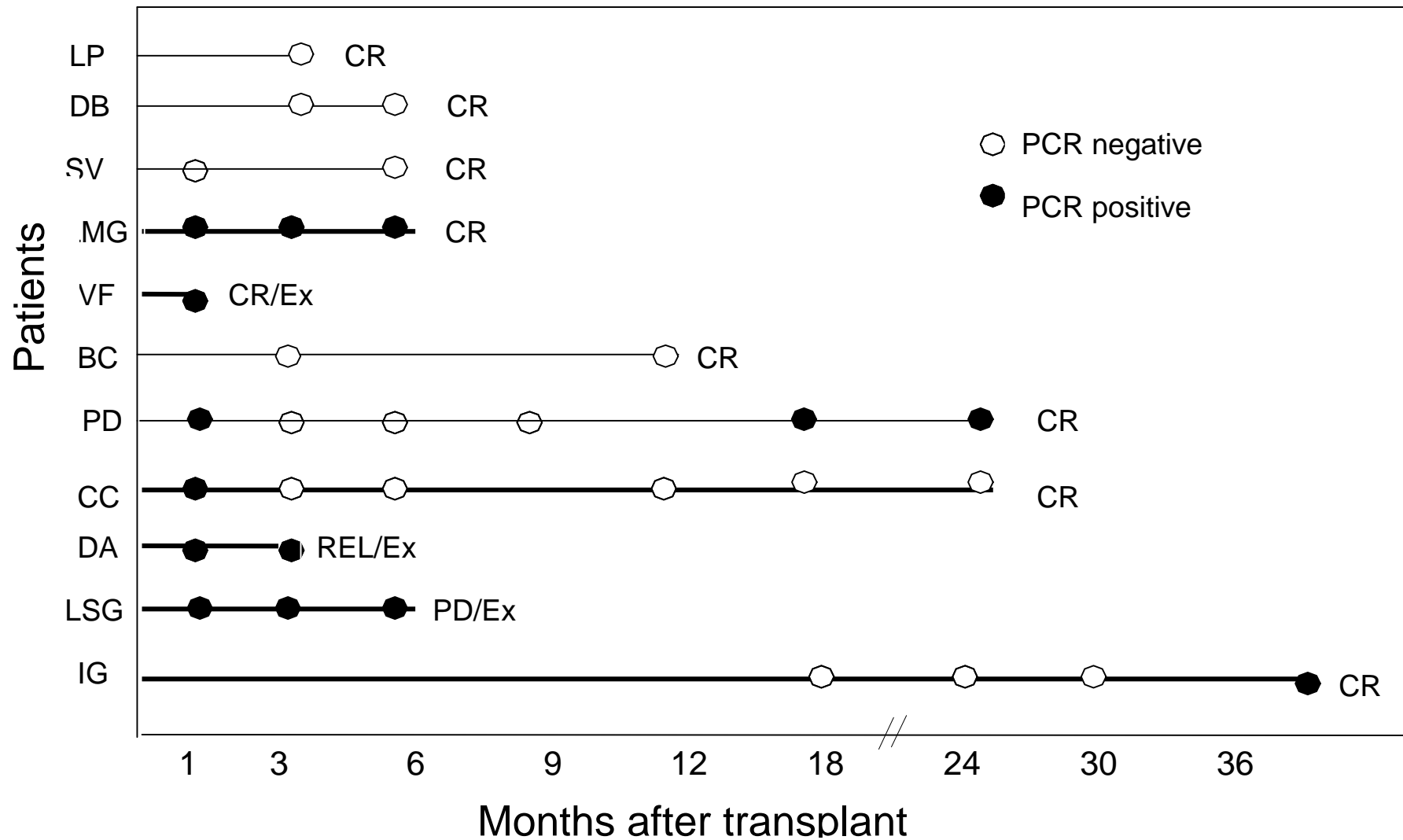


Fig.2 Studio del riarrangiamento IgH nella LLC . Esperienza del Gruppo collaborativo italiano rappresentata come diagramma di flusso per mostrare la metodologia impiegata e le probabilità di ottenere sequenze informative(Catania et al, 1998).

