

**IMMUNOTERAPIA ADOTTIVA DOPO TRAPIANTO DI
MIDOLLO OSSEO ALLOGENICO**

Francesco Dazzi

*Department of Hematology, Imperial College School of Medicine at Hammersmith
Hospital, London, UK.*

Il trapianto allogenico di midollo osseo è il trattamento di scelta per diverse neoplasie del tessuto emopoietico quando è disponibile un donatore compatibile. Il valore di tale approccio è tuttavia limitato da due ordini di fattori: la estesa compromissione del sistema immune indotta dal condizionamento chemio-radioterapico e il rischio di indurre la malattia del trapianto contro l'ospite (graft-versus-host disease, GVHD). Nonostante ciò, entrambe queste complicazioni sono intimamente associate ad effetti utili. L'immunodeficienza è infatti necessaria ad instaurare lo stato di tolleranza dell'ospite verso il trapianto, mentre la GVHD è strettamente associata ad un effetto anti-leucemico definito come graft-versus-leukaemia (GVL). Pertanto, dopo il trapianto di midollo osseo allogenico, l'infusione di linfociti del donatore originario di midollo nel ricevente (donor lymphocyte infusion, DLI) può essere impiegata per generare una risposta immune contro il tumore e/o per restaurare lo stato di immunocompetenza. Infatti, i linfociti del donatore non sono sottoposti a terapie immunosoppressive e non sono stati inattivati dai meccanismi di evasione tumorale che hanno facilitato la ricaduta nel paziente.

Uso della DLI nelle ricadute di neoplasia dopo trapianto allogenico

Leucemia mieloide cronica. Nel 1990 Kolb e coll. osservarono per primi che il trasferimento adottivo di linfociti ottenuti dal donatore originario di midollo consentivano di ripristinare la remissione completa in pazienti con leucemia

mieloide cronica (LMC) in ricaduta dopo trapianto di midollo allogenico [1]. L'efficacia della DLI in questi pazienti è stata da allora ampiamente confermata e studiata in dettaglio da numerosi gruppi [2-4]. Una vasta percentuale di pazienti (dal 60 al 73%) ottengono una remissione completa e la possibilità di rilevare la ricaduta in fase precoce mediante l'analisi PCR dei trascritti di BCR-ABL [5] consente di incrementare la percentuale di successi fino alla quasi totalità dei casi. Infatti, è stato dimostrato che l'unico fattore in grado di predire la risposta è lo stadio di malattia al momento della DLI. I pazienti la cui ricaduta è identificata soltanto a livello molecolare o citogenetico rispondono in misura maggiore rispetto ai pazienti nei quali la terapia viene cominciata quando la malattia è in fase ematologica [2]. Inoltre, tra le ricadute ematologiche, i pazienti in fase avanzata hanno scarse possibilità di rispondere [3-4].

Nessuna correlazione è stata osservata tra efficacia e tipo di donatore impiegato per la DLI. Il tasso di risposta ottenuto con la trasfusione di cellule da donatori consanguinei non sembra differire da quello ottenuto impiegando cellule da donatori volontari HLA-compatibili [6]. Tuttavia, dati preliminari sembrano indicare che la dose di cellule necessaria alla remissione completa sia inferiore per questi ultimi rispetto ai primi [7].

Due distinte cinetiche di risposta sono state identificate. In alcuni pazienti la riduzione dei livelli di dei trascritti di BCR-ABL è piuttosto rapido (meno di 6

mesi dopo la DLI); in altri pazienti la PCR risulta negativa soltanto dopo diversi mesi (di solito >12) [8]. Non è chiaro se queste diverse cinetiche siano il risultato di una diversa sensibilità delle cellule leucemiche o dipendano dall'efficienza dei linfociti del donatore.

Leucemia acute. Nonostante i successi nella LMC abbiano portato a sperare uguali risultati nelle leucemie acute, le prime esperienze hanno rapidamente convinto del contrario. Anche se il numero di pazienti trattati non è stato elevato, gli studi multicentrici europeo e nord-americano hanno riportato una bassa percentuale di risposte nelle leucemia acute sia di origine linfoide (0 to 18%) che mieloide (15 to 29%) [3-4]. Inoltre, i pochi pazienti con LMA che rispondono alla DLI spesso ricadono a livello extra-midollare. È verosimile che lo scarso effetto dell'immunoterapia nelle leucemie acute sia da imputarsi all'elevata attività proliferativa e quindi al numero di cellule leucemiche che impedirebbero un efficace stimolazione dei linfociti alloigenici.

Mieloma multiplo e linfomi. Un possibile ruolo della DLI nel trattamento del mieloma multiplo (MM) è stato di recente confermato da Lokhorst e coll. [9]. Di 13 pazienti ricaduti per MM dopo trapianto allogenico, 8 (61%) hanno risposto anche se soltanto 4 hanno ottenuto una remissione completa. Il problema maggiore è che questi pazienti hanno richiesto dosi piuttosto elevate di DLI (>10⁸ T cellule/Kg) inducendo pertanto una elevata incidenza di GVHD severa.

Un'ulteriore limite all'impiego della DLI è che, nonostante essa possa essere utile nel ripristinare la remissione a livello midollare, sembra inefficace sulle lesioni osteolitiche e non è in grado di prevenire successive ricadute extramidollari.

L'uso dell'immunoterapia adottiva con i linfociti del donatore nel trattamento dei linfomi rimane ancora limitata a casi sporadici, ma un effetto "graft-versus-lymphoma" è stato documentato di recente anche con l'impiego di tecniche molecolari [10].

Tumori non ematologici. L'esistenza di un effetto analogo alla GVL nei tumori solidi è ancora da dimostrarsi, principalmente perchè il trapianto di midollo osseo allogenico è praticato in mirusa aneddótica in questi casi. Alcuni risultati incoraggianti sono emersi nel trattamento del tumore della mammella [11].

Questioni irrisolte nel trattamento delle leucemia con DLI

Durata della risposta alla DLI. Sebbene rimangano pochi dubbi sull'efficacia della DLI, la sua capacità di indurre remissioni durature è ancora oggetto di studio. Infatti, il breve follow-up dei pazienti trattati non consente per ora di trarre conclusioni definitive. Esistono tuttavia dati preliminari che suggeriscono tale possibilità. Un recente studio dell'Hammersmith Transplant Group ha osservato

che nessuno di 66 pazienti in remissione molecolare dopo DLI sono ricaduti dopo un follow-up di 4-77 mesi [12].

Effetti indesiderati. Il trattamento con DLI non è privo di complicazioni. Il più frequente e grave è la GVHD acuta e cronica che si verifica in un 40-60% dei pazienti [3-4], prevalentemente in quelli che ricevono le cellule da donatori volontari [6]. Tuttavia, lo Sloan-Kettering transplant group ha riportato che l'incidenza di GVHD può essere significativamente ridotta se i linfociti vengono trasfusi in dosi a scalare fino a quando si ottiene la remissione [13]. Tale approccio consente di evitare la somministrazione di dosaggi non necessari. Un recente studio su una larga popolazione di pazienti sembra confermare la superiorità di questa strategia [14].

Approcci alternativi per ridurre la GVHD, basati sulla manipolazione ex vivo delle cellule da trasfondere, sono stati proposti ma non ancora formalmente testati in clinica. La deplezione dai linfociti del donatore delle cellule CD8+ [15] o dei linfociti alloreattivi [16], sembrerebbe ridurre significativamente il numero delle cellule effettrici della GVHD. Inoltre, una strategia molto elegante per modulare la GVHD si basa sull'introduzione, nei linfociti del donatore, di un gene (HSV-tk) che li rende suscettibili all'azione del ganciclovir [17]. Tuttavia, questa tecnica non risparmia i mediatori dell'effetto GVL e potrebbe invalidare l'efficacia dell'immunoterapia.

L'altra relativamente frequente complicazione della DLI è l'insufficienza midollare. Caratterizzata da una pancitopenia di grado variabile, nei casi irreversibili può essere trattata con successo mediante l'infusione di cellule staminali emopoietiche del donatore [6]. La pancitopenia è causata dall'effetto GVH sull'emopoiesi del ricevente [18].

Insuccesso del trattamento. Gli insuccessi della DLI possono essere classificati in tre principali categorie:

1. malattie tipicamente refrattarie all'effetto GVL (leucemie acute e fase blastica di LMC).
2. selezione di cloni leucemici resistenti (ricadute extramidollari)
3. risposte parziali e/o transitorie [19].

In questi casi, la somministrazione di interleuchina-2 (IL2) insieme ai linfociti sembra contribuire a migliorare l'entità della risposta nei pazienti convenzionalmente resistenti [20] e anche nei pazienti con risposte parziali alla DLI [21].

Trattamento con DLI per le complicazioni non tumorali del trapianto allogenico

La ricaduta del tumore non è la sola complicazione del trapianto di midollo allogenico, suscettibile di trattamento con linfociti del donatore. I linfociti del donatore consentono di migliorare l'attecchimento midollare delle cellule emopoietiche del donatore inibendo la reazione di rigetto [22] e di ricostituire lo stato di immunodeficienza post-trapianto. Numerosi studi hanno dimostrato l'utilità di linfociti T del donatore generati in vitro contro specifici antigeni virali nel trattare e/o prevenire quelle malattie virali che sono la causa più frequente della mortalità correlata al trapianto. In particolare, tale approccio è stato praticato nelle infezioni da cytomegalovirus (CMV) [23] e nelle malattie linfoproliferative indotte dal virus di Epstein-Barr (EBV) [24]. Di grande interesse è la recente dimostrazione che anche l'infusione di piccole dosi di linfociti del donatore senza alcuna previa manipolazione possono rapidamente ripristinare il numero e la funzione delle cellule T dopo il trapianto e trattare le malattie indotte da CMV e EBD con trascurabile incidenza di GVHD [25].

Conclusioni

La comprensione dei meccanismi responsabili dell'efficacia del trapianto di midollo osseo allogenico ha dimostrato il ruolo chiave del sistema immune nella eradicazione delle cellule neoplastiche. Anche se l'impiego di terapie basate sul trasferimento adottivo di linfociti del donatore non è procedura priva di rischi, è

verosimile che la identificazione di antigeni tumore-specifici permetterà lo sviluppo di strategie sicure e ancor più efficaci.

REFERENCES

1. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm Ch, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W: Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990, 76:2462-2465.
2. Van Rhee F, Lin F, Cullis JO, Spencer A, Cross NCP, Chase A, Garicochea B, Bungey J, Barrett J, Goldman JM: Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood* 1994, 83: 3377-3383.
3. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermuller J, de Witte T, Holler E, Ansari H: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995, 86: 2041-2050.
4. Collins RH, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralt S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J: Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997, 15:433-444.
5. Lin F, van Rhee F, Goldman JM, Cross NCP: Kinetics of increasing BCR-ABL transcript numbers in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. *Blood* 1996, 87:4473-4478.
6. van Rhee F, Savage D, Blackwell J, Orchard K, Dazzi F, Ling F, Chase A, Bungey J, Cross NCP, Apperley J, Szydlo R, Goldman JM: Adoptive immunotherapy for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: equal efficiency of lymphocytes from sibling and matched unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 1998, 21:1055-1061.
7. Dazzi F, Craddock C, Szydlo R, Kaeda J, Montefusco V, Kanfer E, Cross NCP, Apperley J, Goldman JM: Adoptive immunotherapy with donor lymphocytes for relapse of chronic myeloid leukemia (CML) after allogeneic stem cell transplant (SCT): factors influencing the effective cell dose (ECD). *Blood* 1998, 92(S1):494.
8. Raanani P, Dazzi F, Sohal J, Szydlo RM, van Rhee F, Reiter A, Ling F, Goldman JM, Cross NCP: The rate and kinetics of molecular response to

- donor leukocyte transfusions in chronic myeloid leukaemia patients treated for relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1997, 99: 945-950.
9. Lokhorst HM, Schattenberg A, Cornelissen JJ, Thomas LLM, Verdonck LF: Donor leucocyte infusions are effective in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997, 90:4206-4211.
 10. Mandingers CMPW, Meijerink JPP, Raemaekers JMM, Schattenberg AVMB, Mensink EJB: Graft-versus-lymphoma effect of donor leucocyte infusion shown by real-time quantitative PCR analysis of t(14;18). *Lancet* 1998, 352:1522-1523.
 11. Eibl B, Schwaighofer H, Nachbaur D, Marth C, Gachter A, Knapp R, Bock G, Gassner C, Schiller L, Petersen F, Niederwieser D: Evidence for a graft-versus-tumor effect in a patient treated with marrow ablative chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for breast cancer. *Blood* 1996, 88:1501-1508.
 12. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Olavarria E, Kaeda J, Cross NCP, Kanfer E, Van Rhee F, Yong A, Apperley JF, Goldman JM (1999) Donor lymphocyte infusions (DLI) for patients who relapse after allogeneic bone marrow transplantation (BMT) for chronic myeloid leukaemia (CML): the use of RT-PCR for BCR-ABL transcripts to predict durability of response and survival. *Haematologica* 84(S1):141.
 13. Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, Reich L, Collins NH, Boulad F, Castro-Malaspina H, Childs BH, Gillio AP, Kernan NA, Small TN, Young JW, O'Reilly RJ: Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukaemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukaemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995, 86: 1261-1268.
 14. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Olavarria E, Kaeda J, van Rhee F, Cross NCP, Apperley NCP, Goldman JM: Adoptive immunotherapy for patients who relapse after allografting for chronic myeloid leukemia: a comparison of two regimens for donor lymphocyte infusion. *Blood* 1998, 92(S1):653.
 15. Giralt S, Hester J, Huh Y, Hirsh-Ginsberg C, Rondon G, Seong D, Lee M, Gajewski J, van Besien K, Khouri I, Mehra R, Prsepiorka D, Korbling M, Talpaz M, Kantarjian H, Fisher H, Deisseroth A, Champlin R: CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after bone marrow transplantation. *Blood* 1995, 86:4337-4343.

16. Montagna D, Yvon E, Calcaterra V, Comoli P, Locatelli F, Maccario R, Fisher A, Cavazzana-Calvo M: Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood* 1999, 93:3550-3557.
17. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C: HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997, 276:1719-1724.
18. Keil F, Haas OA, Fritsch G, Kalhs P, Lechner K, Mannhalter C, Reiter E, Niederwieser D, Hoecker P, Greinix HT: Donor leukocyte infusion for leukemia relapse after allogeneic marrow transplantation: lack of residual donor hematopoiesis predicts aplasia. *Blood* 1997, 89:3113-3117.
19. Dazzi , Raanani P, Van Rhee F, Olavarria E, Murphy KM, Philpott NJ, Apperley JF, Cross NCP, Goldman JM: Responses to donor lymphocyte infusion (DLI) in CML patients in relapse after BMT may be partial and transient: further evidence for a dose-response effect. *Blood* 1997, 90(S1):518.
20. Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Samuel S, Kapelushnik J, Brautbar C, Or R: Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996, 87:2195-2204.
21. Dazzi F, Kaeda J, Kanfer E, Apperley J, Goldman JM: Interleukin-2 may induce complete remission in patients who respond only partially to donor lymphocyte infusion (DLI) for relapse following allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1998, 102(S1):287.
22. Godder KT, Abhyankar SH, Lamb LS, Best RG, Geier SS, Pati AR, Gee AP, Henslee-Downey PJ: Donor leukocyte infusion for treatment of graft rejection post partially mismatched related donor bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 1998, 22:111-113.
23. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR: Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995, 333: 1038-1044.
24. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin SK, Sixbey JW, Gan Y, Srivastava DK, Bowman LC, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE: Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 1998, 92:1549-1555.

25. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, Black P, Castro-Malaspina H, Childs BH, Collins N, Gillio A, George D, Jakubowski A, Heller G, Fazzari M, Kernan N, MacKinnon S, Szabolcs P, Young JW, O'Reilly RJ: Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood* 1999, 93:467-480.