

# Il trapianto emopoietico e le terapie cellulari nella cura delle neoplasie ematologiche del bambino: da uno sguardo al passato alla proiezione futura

Pietro Merli<sup>1</sup>, Giuseppe Palumbo<sup>1</sup>, Stefania Gaspari<sup>1</sup>, Franco Locatelli<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica e Medicina Trasfusionale, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Pediatriche, Università degli Studi di Pavia, Pavia

## Riassunto

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (allo-TCSE) ha contribuito in modo significativo al miglioramento della prognosi di numerosi pazienti pediatrici affetti da emopatie maligne. Per molti anni, l'unico donatore di cellule staminali impiegato è stato un fratello/sorella HLA-identico. Nelle ultime due decadi, tuttavia, per i pazienti che non disponevano di un donatore familiare, sono stati largamente utilizzati donatori adulti da registro, utilizzando sia midollo osseo che cellule staminali ematopoietiche da sangue periferico, così come unità di sangue cordonale adeguatamente caratterizzate e criopreservate. Più recentemente, inoltre, il trapianto da un donatore familiare parzialmente compatibile è diventato una possibile alternativa, grazie anche all'implementazione di nuove strategie di manipolazione del trapianto e all'osservazione che l'infusione di ciclofosfamida nei giorni immediatamente successivi al trapianto è in grado di prevenire l'insorgenza delle complicanze immuno-mediate correlate all'allo-TCSE (nello specifico, rigetto e malattia da trapianto verso l'ospite). Infine, negli ultimi anni, si è assistito allo sviluppo di strategie di immunoterapia adottiva, basate sull'infusione di linfociti T patogeno-specifici, così come sull'infusione di linfociti T trasdotti con recettori chimerici in grado di riconoscere specificamente particolari antigeni tumore-associati. Questo tipo di linfociti anti-tumore rappresentano una sorta di rivoluzione nel campo dell'allo-TCSE, in particolare per il trattamento di quei pazienti affetti da tumori non responsivi a terapie citostatiche convenzionali.

## Summary

*Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Allo-HSCT) has significantly contributed to improve the prognosis of many children with life-threatening haematological malignancies. While for many years the only donor employed was an HLA-identical sibling, in the last 2 decades, unrelated adult donors of either bone marrow or peripheral blood hematopoietic stem cells, as well as cord blood units collected and cryopreserved, have been largely utilized to transplant patients lacking a compatible family donor. More recently, transplantation of hematopoietic stem cells from an HLA-partially matched relative have become a suitable alternative, also thanks to the implementation of novel strategies of graft manipulation and to the discovery that the infusion of cyclophosphamide immediately after transplantation can prevent the occurrence of immune-mediated complications related to Allo-HSCT (namely, graft rejection and graft-versus-host disease). The last few years have witnessed the emergence of strategies of adoptive cell therapy, based on the infusion of pathogen-specific immune cells and of T cells transduced with chimeric antigen receptors, able to specifically target antigens present on tumor cells. These selective anti-tumor T lymphocytes promise to represent a sort of revolution in the field of allo-HSCT, rendering this procedure even more successful and useful to treat children with malignancies not benefiting from conventional chemotherapy approaches.*

**Parole chiave:** Trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, emopatie maligne, trapianto aploidentico, immunoterapia

**Key words:** Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, haematological malignancies, HLA-haploidentical transplantation, immunotherapy

## Metodologia della ricerca bibliografica

La ricerca degli articoli rilevanti sul Trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche è stata effettuata sulla banca bibliografica Medline utilizzando come motore di ricerca PubMed (1955-presente) e come parole chiave "Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation", "Cord Blood Transplantation", "Unrelated Donor", "Haploidentical Transplantation" e "Partially Matched Relative Donor".

## Introduzione

Non vi è dubbio che il trapianto allogenico di cellule emopoietiche (allo-TCSE) abbia significativamente contribuito a modificare la prognosi

di molti pazienti pediatrici affetti da emopatie maligne, rappresentando, in alcuni casi, come per esempio nelle leucemie mielomonocitiche giovanili (JMML) (Locatelli et al., 2005), l'unica terapia salvavita e, in altri, come nelle leucemie acute ad alto rischio, la terapia elettivamente più efficace per ridurre il rischio di ricaduta di malattia nei pazienti che raggiungono una remissione (Pession et al., 2005). Altrettanto indiscutibile è l'osservazione che, nel corso degli anni, l'effetto terapeutico dell'allo-TCSE si sia progressivamente definito come principalmente attribuibile all'azione delle cellule linfocitarie appartenenti all'immunità innata o adattiva del donatore, le quali contribuiscono in maniera determinante all'eradicazione delle cellule tumorali del ricevente sopravvissute alla terapia citostatica e/o radiante impiegata in preparazione al trapianto (regime di condizionamento).

Le prime osservazioni sull'effetto antileucemico del trapianto di cellule spleniche in modelli murini risalgono alla metà degli anni '50 dello scorso secolo (Barnes and Loutit, 1957). Esperimenti successivi condotti in modelli di cane e di scimmia, hanno permesso, nel 1957, la realizzazione del primo allo-TCSE sull'uomo: 2 pazienti affetti da leucemia furono sottoposti a trapianto di midollo osseo geneticamente identico dopo irradiazione dell'organismo con dosi sovramassimali; in entrambi i casi, dopo l'attecchimento, i pazienti morirono per recidiva di malattia (Thomas et al., 1957). Solo nel 1965 si è, tuttavia, ottenuto il primo attecchimento persistente di un trapianto da fratello (Mathe et al., 1965); per questo motivo, fino alla fine degli anni '60, sono stati effettuati poche decine di trapianti di midollo, con risultati scoraggianti in termini di sopravvivenza, soprattutto a causa del mancato attecchimento dell'emopoiesi del donatore, della malattia del trapianto contro l'ospite (*Graft-versus-Host Disease*, GvHD, dovuta all'aggressione delle cellule T linfocitarie del donatore rispetto a tessuti del ricevente riconosciuti come *non-self*) e della recidiva della leucemia (Bortin, 1970). In quegli anni, l'identificazione del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*Human Leukocyte Antigen system*, sistema HLA) e la conseguente possibilità di selezionare donatori familiari immunogeneticamente identici ha portato a una notevole riduzione del rigetto e della GvHD (van Rood, 1968), dando nuovo impulso all'allo-TCSE.

Ulteriori progressi sono derivati dall'introduzione della ciclosporina per la profilassi della GvHD. La ciclosporina è un oligopeptide ad azione immunosoppressiva che agisce come inibitore dei linfociti T; è stata inizialmente impiegata nei trapianti di organo solido, ma il suo uso era principalmente limitato dalla rilevante nefrotossicità. L'aggiustamento delle dosi sulla base della farmacocinetica ne ha reso possibile l'estensivo uso clinico (Powles et al., 1978), tanto che, tuttora, in associazione con il Methotrexate, essa costituisce il *gold standard* per la profilassi della GvHD.

I progressi ottenuti in termini di profilassi e terapia delle complicanze infettive, attraverso la disponibilità di nuovi antibiotici ad ampio spettro, di farmaci antivirali e la sintesi di nuovi antifungini hanno ulteriormente migliorato l'efficacia clinica dell'allo-TCSE.

A partire dai primi anni '70, l'istituzione di Registri di Midollo Osseo per il trattamento di quei pazienti che non avevano a disposizione un donatore HLA-identico all'interno del nucleo familiare, ha reso possibile l'accesso alla procedura trapiantologica per un numero sempre crescente di soggetti. Oggi, i Registri, collegati tra loro in rete, annoverano oltre 20.000.000 di potenziali donatori, cui vanno sommate le oltre 600.000 unità di sangue cordonale in tutto il mondo adeguatamente caratterizzate in termini immunogenetici e di contenuto cellulare e criopreservate. Gli straordinari risultati clinici ottenuti negli anni grazie all'allo-TCSE hanno dato impulso alla ricerca di tecniche innovative che consentono di offrire questa possibilità terapeutica anche a quei pazienti che non hanno a disposizione, nella fratria o al di fuori di essa, un donatore HLA identico. Tra queste attività di ricerca traslazionale, molto rilevanti sono state quelle che hanno portato all'identificazione di tecniche innovative di manipolazione estensiva delle cellule che vengono ad essere trapiantate e che, oggi, consentono una buona sicurezza ed efficacia anche per allo-TCSE realizzati impiegando un donatore familiare HLA-parzialmente compatibile (trapianto aploidentico) (Aversa et al., 1994).

### Il trapianto da donatore non consanguineo HLA-identico (*Matched Unrelated Donor*, MUD)

Considerando la modalità co-dominante della ereditarietà del sistema HLA, la probabilità di reperire per un paziente un germano

compatibile è del 25%. È, quindi, evidente che solo una minoranza dei pazienti che potrebbero beneficiare di un trapianto possiede un donatore HLA-identico all'interno del nucleo familiare. La probabilità di reperire un donatore HLA-identico tramite i Registri Internazionali dei donatori di midollo osseo o le banche di raccolta e conservazione del sangue cordonale è stimabile oggi nell'ordine del 60-70%, dipendendo, tuttavia, in larga parte dalle caratteristiche immunogenetiche e dall'etnia del ricevente. Pazienti di origine caucasica hanno, infatti, una probabilità di identificare un donatore compatibile maggiore rispetto a pazienti di origine africana o ispanica, in quanto i gruppi etnici da cui originano questi pazienti sono assai meno rappresentati nei registri rispetto al gruppo caucasico.

Mentre nei primi anni d'impiego di donatori non consanguinei l'*outcome* dei pazienti sottoposti a questo tipo di trapianto era inferiore rispetto ai trapianti da un donatore germano a causa di un aumentato rischio di complicanze immunologiche (GvHD e rigetto), a loro volta motivate dai limiti delle tecniche di tipizzazione HLA, la tipizzazione genomica ad alta risoluzione in atto dal 1998 ha di fatto attualmente completamente annullato le differenze tra trapianto da donatore familiare e da donatore MUD (Locatelli et al., 2002; Bernardo et al., 2012). La tipizzazione del sistema HLA viene, infatti, oggi realizzata utilizzando metodiche di tipizzazione molecolare ad alta risoluzione per gli alleli di classe I e II del sistema HLA. Generalmente i pazienti vengono tipizzati per cinque loci HLA: HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1. Il donatore ideale è quello identico per tutti e cinque i loci. Tuttavia, sono utilizzati con buona probabilità di successo donatori non familiari che differiscono dal ricevente per un singolo allele. È stato dimostrato che alcuni alleli sono più permissivi di altri, e, quindi, la disparità di questi non costituisce un ostacolo assoluto all'efficacia dell'allo-TCSE. Ad esempio, la disparità allelica sul locus HLA-B è meglio tollerata rispetto a quella sui loci HLA-A, HLA-C o HLA-DRB1, mentre la disparità di HLA-DQB1 non comporta alcun rischio aggiuntivo, se non associata ad altre disparità alleliche (Lee et al., 2007; Petersdorf et al., 2004). È stato, inoltre, dimostrato che mutazioni specifiche di aminoacidi nella catena pesante delle molecole HLA di classe I correlano con incidenze più elevate di GvHD e con maggior rischio di mortalità correlata alla procedura (Ferrara et al., 2001).

### Il trapianto da cellule di sangue cordonale (*Unrelated Cord Blood Transplantation*, UCBT)

Dal primo trapianto di sangue cordonale, eseguito da Gluckman e collaboratori nel 1988 in un paziente affetto da Anemia di Fanconi (Gluckman et al., 1989), numerosi studi ne hanno dimostrato l'efficacia come fonte alternativa di cellule staminali ematopoietiche per quei pazienti che necessitano di trapianto allogenico, sia nel contesto di patologie maligne che benigne (Barker et al., 2001; Locatelli et al., 2013; Locatelli et al., 1999; Rocha et al., 2001; Rocha et al., 2000; Wagner et al., 1995). In particolare, studi condotti in pazienti pediatrici hanno evidenziato una sopravvivenza globale ed una sopravvivenza libera da malattia sovrapponibili al trapianto da MUD (Barker et al., 2001), con lo svantaggio rispetto a questo di un attecchimento più lento (specialmente per quanto riguarda il recupero delle piastrine), ma con il vantaggio di una minor incidenza e severità di GvHD acuta e cronica (Rocha et al., 2001; Rocha et al., 2000). Ad oggi, nel mondo, come già menzionato, sono conservate più di 600.000 unità di sangue cordonale e sono stati eseguiti più di 30.000 trapianti di questo tipo (Ballen et al., 2013).

I due principali fattori che determinano il successo di questo tipo di trapianto sono la dose cellulare infusa (normalmente espressa in termini di cellule nucleate totali per Kg del ricevente, TNC/Kg) (Lo-

catelli et al., 1999; Gluckman, 2004) e il *matching* HLA (espresso in termini di *matching* HLA per i loci A,B e DR (x/6) o per i loci A, B, C e DR (x/8)) (Wagner et al., 2002): i due fattori sono intimamente connessi (Barker et al., 2007; Eapen et al., 2007), per cui, in linea generale, in presenza di una disparità immunogenetica maggiore nella coppia donatore/ricevente è necessario disporre di una maggiore dose cellulare per raggiungere un *outcome* comparabile; per questo motivo, sono stati sviluppati appositi algoritmi di selezione delle unità di sangue cordonale, un esempio dei quali è riportato in Figura 1 (Barker et al., 2011; Eapen et al., 2013).

Data, quindi, l'importanza della dose cellulare, è ovvio come questa, specialmente nei pazienti adulti, ma anche nei pazienti pediatrici con un peso elevato, sia un fattore limitante per il successo del trapianto. In virtù di questa osservazione, vari gruppi di ricerca hanno investigato strategie atte a migliorare l'attecchimento dell'unità cordonale.

Il primo approccio preso in considerazione è stato quello del trapianto contemporaneo di 2 unità cordonali diverse: nonostante vi siano evidenze del vantaggio di questo approccio nel paziente adulto (Scaradavou et al., 2013), l'analisi preliminare di uno studio prospettico randomizzato ha evidenziato come, nel contesto pediatrico, il co-trapianto di 2 unità non manipolate di sangue cordonale non solo non porti ad un vantaggio in termini di sopravvivenza, ma comporti anche un rischio di GvHD acuta maggiore (Wagner et al., 2012).

Un'altra strategia adottata di recente è rappresentata dall'espansione *ex-vivo* di un'unità di sangue cordonale su un *layer* di cellule stromali mesenchimali (MSCs) (Robinson et al., 2006), dato che tali cellule concorrono a costituire la nicchia ematopoietica. In un recente lavoro, de Lima e collaboratori hanno dimostrato come questa metodica permetta un'espansione delle cellule nucleate di 12 volte e delle cellule CD34<sup>+</sup> di circa 30 volte (de Lima et al., 2012): l'infusione del prodotto, insieme ad una seconda unità di sangue cordonale non manipolata, determinava, inoltre, un attecchimento più rapido. È interessante notare che lo studio del chimerismo ha mostrato che, come osservato in altri studi di co-trapianto di 2 unità di sangue cordonale di cui una era stata manipolata, l'unità espansa era responsabile dell'attecchimento precoce, mentre quella non manipolata sosteneva l'attecchimento a lungo termine: non è ancora chiaro se ciò sia dovuto ad una minor presenza di cellule favorevoli all'attecchimento (dato che la maggior parte delle piattaforme di espansione comportano la deplezione dei linfociti) o ad un esaurimento della capacità di autorinnovamento delle cellule staminali.

Un approccio simile dal punto di vista concettuale è costituito dalla co-infusione di un'unità di sangue cordonale con MSCs: tale strategia non ha però mostrato un vantaggio in termini di attecchimento, pur dimostrando una minor incidenza di GvHD di grado III-IV (Bernardo et al., 2011).

Dal momento che una percentuale significativa delle cellule infuse non raggiunge il midollo osseo (soprattutto a causa dell'intrappolamento a livello del filtro polmonare), Frassoni e collaboratori hanno

sperimentato l'infusione diretta nel midollo osseo (a livello delle creste iliache) dell'unità di sangue cordonale: è stato dimostrato come tale approccio permetta il superamento dell'effetto-dose, anche in presenza di una elevata disparità immunogenetica fra donatore e ricevente (Frassoni et al., 2008).

Sono allo studio approcci ulteriori attualmente volti al miglioramento dell'attecchimento e dell'immunoricostruzione, quali:

il co-trapianto di sangue cordonale e cellule staminali periferiche da donatore aploidentico (Lui et al., 2011) o MUD (Bautista et al., 2009); il miglioramento dell'*homing* delle cellule staminali e dei progenitori cordonali infusi, attraverso la fucosilazione delle cellule (Robinson et al., 2013), l'inibizione dell'enzima Dipeptididipeptidasi 4 (DPP4) (Christopherson et al., 2004) e il pretrattamento con prostaglandina E modificata (Cutler et al., 2012).

## Il trapianto da donatore aploidentico

Per donatore aploidentico, s'intende un donatore che condivide con il ricevente la metà dei geni HLA (che essendo localizzati sul braccio corto del cromosoma 6 vengono ereditati in blocco): questi donatori sono solitamente rappresentati dai genitori, da fratelli o dalla prole del ricevente. Il trapianto da donatore aploidentico (o donatore familiare HLA-parzialmente compatibile) presenta, rispetto ad altri tipi di trapianto, indubbi vantaggi, tra i quali: l'immediata disponibilità, almeno virtualmente, per tutti i pazienti (con conseguente ottimizzazione del *timing* del trapianto stesso); la possibilità di scelta del miglior donatore tra tutti i familiari disponibili; e la possibilità di far ricorso al donatore in caso di necessità di terapie cellulari (Reisner et al., 2011).

Come è intuitivamente immaginabile, tuttavia, questo tipo di trapianto presenta diverse problematiche, principalmente concernenti il superamento della barriera HLA nella coppia donatore/ricevente. Da esse sono derivate, per anni, un'aumentata incidenza di rigetto del trapianto e di sviluppo di quadri straordinariamente severi di GvHD. La messa a punto di tecniche in grado di ottenere una deplezione estensiva dei T linfociti dall'inoculo trapiantato e la possibilità di ottenere numeri assai elevati di progenitori emopoietici dal sangue periferico dei donatori hanno consentito di superare in larga parte questi ostacoli. In particolare, l'ottenimento di 4 logaritmi di T-deplezione del *graft* (eseguita nella maggior parte dei casi con un metodo "indiretto", cioè attraverso la selezione positiva delle cellule staminali emopoietiche CD34<sup>+</sup>) e l'infusione di una mega-dose di progenitori emopoietici (definita come l'infusione di un numero di cellule CD34<sup>+</sup> superiore a 10-12 x 10<sup>6</sup>/Kg) (Aversa et al., 1994; Aversa et al., 1998; Aversa et al., 2005; Bachar-Lustig et al., 1995) si sono dimostrate cruciali per garantire un'elevata probabilità di attecchimento dell'emopoiesi del donatore, senza concomitante sviluppo di GvHD. Nonostante la rimozione quasi completa dei linfociti T, l'effetto immunologico del trapianto contro eventuali cellule maligne residue (*Graft-versus-Leukemia*, GvL) può essere mantenuto dalle cellule

<sup>1</sup> L'alloreattività NK fu descritta per la prima volta più di 20 anni fa da Moretta e colleghi (Moretta A et al 1990), i quali osservarono la lisi *in vitro* di blasti leucemici allogeneici da parte di particolari *subsets* di cellule NK caratterizzate dall'espressione/assenza di alcune molecole di superficie, identificate successivamente come recettori specifici per molecole HLA di classe I. Le cellule Natural Killer possiedono specifici recettori, distribuiti clonalmente, denominati *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs) che riconoscono specifici determinanti antigenici (KIR ligandi), condivisi da alcuni gruppi allelici di molecole HLA di classe I (HLA-C: alleli di gruppo 1 e 2; HLA-B alleli che condividono la specificità Bw4). Durante il loro sviluppo, dopo l'interazione tra KIR e ligandi *self*, le cellule NK diventano "educate/licenziate" ad esercitare l'alloreattività contro bersagli allogeneici che non esprimano KIR ligandi *self*. Nel *setting* del trapianto aploidentico, dunque, l'alloreattività NK (*donor-versus-recipient*) viene esercitata da cellule NK del donatore "licenziate" (maturando a livello del midollo osseo dopo il trapianto, esse vengono esposte prevalentemente a molecole HLA del donatore, presenti sulle cellule ematopoietiche), cioè cellule NK che esprimono il proprio repertorio KIR, i cui ligandi sono, almeno in parte, non espressi sui bersagli allogeneici. L'alloreattività mediata dalle cellule NK si esplica su tre tipi cellulari, con altrettanti effetti benefici in termini clinici (Moretta et al., 2008): in primo luogo l'eliminazione dei linfociti T del ricevente residui è in grado di prevenire il rigetto delle cellule del donatore, migliorando, quindi, la probabilità di attecchimento; in secondo luogo, l'eliminazione delle cellule dendritiche del ricevente (con conseguente *priming* inefficace dei linfociti T alloreattivi del donatore) diminuisce l'incidenza di GvHD; infine, l'effetto più importante per l'*outcome* clinico, si esplica attraverso l'azione litica sulle cellule leucemiche residue con conseguente riduzione del rischio di recidiva della leucemia.

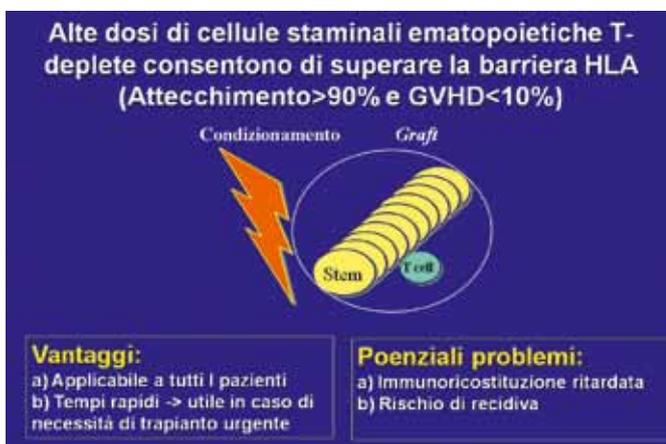


**Figura 1.** Algoritmo di selezione di unità di sangue cordonali (CIBMTR, Center for International Blood and Marrow Transplant Research). TNC: cellule nucleate totali

*Natural Killer* alloreattive<sup>1</sup> (vedi anche Fig. 2) (Ruggieri et al., 2002). Allo stato attuale, dunque, dal punto di vista immunologico, il problema maggiore da cui è gravato il trapianto aploidentico è costituito dalla ritardata ricostituzione immunologica (Oevermann et al., 2012), dovuta al ridotto numero di linfociti T trasferiti con il *graft*, che si traduce poi sul piano clinico in una marcata incidenza di patologia infettiva e, in assenza di alloreattività delle cellule NK, in un maggior rischio di recidiva della malattia di base (Fig. 2) (Horowitz et al., 1990). In virtù di questa osservazione, sono, tutt'ora, in fase di sperimentazione diverse strategie per superare il problema di un ritardo del processo di ricostituzione immunologica; tra tutte queste, si possono riconoscere due importanti filoni di ricerca che ineriscono all'ambito del trapianto aploidentico cosiddetto "T-repleto" (in cui cioè il *graft* non viene T-depletato) e strategie nell'ambito del trapianto aploidentico cosiddetto "T-depleto" (Seggewiss et al., 2010).

**Il trapianto aploidentico T-repleto**

Negli ultimi anni, ha acquistato sempre maggior interesse la possibilità di eseguire trapianti da familiare aploidentico senza eseguire una manipolazione del *graft* (senza eseguire cioè una deplezione dei linfociti T, con evidenti vantaggi in termini di fattibilità e di costi), ma intervenendo sul ricevente (e/o sul donatore) per prevenire la GvHD.



**Figura 2.** Trapianto aploidentico: vantaggi e svantaggi.

Le principali strategie a questo scopo attualmente in studio sono:

- 1) G-CSF primed graft
- 2) Profilassi della GvHD con rapamicina
- 3) Profilassi della GvHD con ciclofosfamide ad alte dosi

**G-CSF primed graft**

Questo approccio si basa sull'evidenza che il *priming* del donatore con G-CSF polarizza i linfociti T a livello del midollo osseo da un fenotipo Th1 ad un fenotipo Th2, con conseguente minor incidenza di GvHD (Jun et al., 2004). Allo stato attuale, sono stati sviluppati diversi protocolli basati su questa metodica, cui va, comunque, associata una rilevante immunosoppressione, che comprende la combinazione, oltre che di siero antilinfocitario (ATG), di numerosi farmaci (quali ad esempio ciclosporina, methotrexate, micofenolato e basiliximab (Di Bartolomeo et al., Blood 2013;Huang et al., 2009;Wang et al., 2009).

**Profilassi della GvHD con rapamicina**

La rapamicina è un immunosoppressore che, a differenza degli inibitori della calcineurina, promuove la differenziazione di linfociti T regolatori (Treg) una sottopopolazione di linfociti T con proprietà immunomodulanti che non necessitano di un *priming* antigenico (Ciceri et al., 2011). Recentemente, è stato dimostrato come l'infusione di Treg dopo trapianto aploidentico prevenga la GvHD e favorisca la ricostituzione immunologica (Di Ianni et al., 2011). Ad oggi, tuttavia, solo pochi studi hanno indagato l'utilizzo della rapamicina nel *setting* trapiantologico aploidentico (Peccatori et al., 2010).

**Profilassi della GvHD con ciclofosfamide ad alte dosi**

Negli anni '70, Owens e Santos hanno dimostrato nel modello murino che cicli brevi di ciclofosfamide nelle immediate vicinanze del trapianto di midollo osseo colpivano i linfociti T alloreattivi sia del donatore che del ricevente (Owens and Santos, 1971). L'osservazione che la ciclofosfamide non è tossica per le cellule staminali ematopoietiche grazie all'elevata espressione nel loro citoplasma dell'enzima detossificante aldeide deidrogenasi (Jones et al., 1995), insieme alla dimostrazione che alte dosi di ciclofosfamide sono in grado, nel topo, di ridurre l'incidenza di GvHD e rigetto, senza alterare l'attecchimento delle cellule staminali ematopoietiche, hanno portato un nuovo interesse sull'utilizzo clinico di questa strategia (Prigozhina et al., 1997).

I due studi principali sono stati condotti dal gruppo del Johns Hopkins di Baltimora e del Fred Hutchinson Cancer Research Center di Seattle, su una popolazione complessiva di 210 pazienti, sia bambini che adulti, affetti da leucemia acuta e cronica ed altre neoplasie ematologiche (Luznik et al., 2008; Munchel et al., 2011).

**Trapianto aploidentico T-depleto**

Come detto in precedenza la T-deplezione rappresenta un'efficace strategia per prevenire la GvHD nel trapianto aploidentico, tanto che, dopo il trapianto, non è necessaria alcuna profilassi farmacologica della stessa. Attualmente, nella maggior parte dei casi, la procedura di T-deplezione viene condotta mediante selezione positiva delle cellule CD34<sup>+</sup>.

Le principali strategie volte al miglioramento dell'immunoricostruzione nel trapianto aploidentico T-depleto sono costituite da:

- 1) Infusione di linfociti T patogeno-specifici
- 2) Infusione di linfociti T "ingegnerizzati" con geni suicidi
- 3) Infusione di linfociti T regolatori (Treg)

### Infusione di linfociti T patogeno-specifici

Diversi gruppi hanno messo a punto, partendo da cellule mononucleate del donatore, protocolli per la generazione di linee cellulari o cloni T specifici per i principali agenti patogeni responsabili di complicanze gravi o addirittura fatali dopo il trapianto. Perruccio e collaboratori hanno generato cloni di T linfociti diretti contro antigeni di aspergillo e di cytomegalovirus (Perruccio et al., 2005). Con un approccio simile, sono state generate linee dirette verso antigeni di adenovirus ed EBV (Comoli et al., 2007). L'elevato impegno richiesto, tuttavia, in termini di tempo, costi ed esperienza tecnica, per la generazione di queste linee o cloni, ne limita l'impiego su larga scala.

### Infusione di linfociti T "ingegnerizzati" con geni suicidi

Un altro recente approccio al miglioramento della ricostituzione immunologica consiste nell'infusione di linfociti T policlonali ingegnerizzati per esprimere geni suicidi, attivabili da farmaci o sostanze inerti nel caso, dopo l'infusione, si sviluppi GvHD non controllabile con le terapie convenzionali.

Ciceri e collaboratori hanno infuso linfociti policlonali del donatore transfettati con il gene suicida HSV tirosina chinasi (HSV-TK), attivabile grazie all'infusione di ganciclovir, farmaco assai efficace nelle infezioni/riattivazioni d'infezione da cytomegalovirus (Ciceri et al., 2009). È tuttora in corso uno studio randomizzato di fase 3 sul trapianto aploidentico T depleto con o senza infusione di linfociti T HSV-TK in pazienti adulti con leucemia ad alto rischio (NCT00914628).

Il gruppo del *Baylor College of Medicine* di Houston ha, più recentemente, sviluppato un'altra strategia sfruttando il *pathway* dell'apoptosi indotta dalle caspasi: le cellule T del donatore sono, infatti, state transfettate con un transgene codificante per una caspasi 9, la cui attivazione è inducibile mediante una molecola inerte (AP1903). L'infusione di questa molecola determina l'apoptosi del 90% dei linfociti T modificati entro 30 minuti dall'infusione con controllo della GVHD e senza alcuna ricorrenza della stessa (Di Stasi et al., 2011).

### Infusione di linfociti T regolatori (Treg)

Un'ulteriore strategia per migliorare l'immunoricostituzione consiste nell'infusione sequenziale di Treg seguita da quella di linfociti T convenzionali (Tcon). In modelli murini, infatti, l'infusione di Treg determina una soppressione della GvHD senza inibire l'effetto GvL e una più rapida ricostituzione di linfociti Tcon (Edinger et al., 2003). Recentemente, sono stati riportati i risultati, molto incoraggianti, di questo approccio (Di Ianni et al., 2011).

### Deplezione TCR $\alpha\beta$ /CD19

A cavallo tra il trapianto T-repleto e quello T-depleto è stata recentemente sviluppata una terza strategia: la deplezione dei linfociti TCR $\alpha\beta$ /CD19. Questo approccio si basa sulla sola eliminazione, dal *graft*, delle cellule effettrici della GvHD, ovvero i linfociti T $\alpha\beta^2$ , mantenendo al contempo

nell'inoculo altre popolazioni cellulari utili ai fini dell'*outcome* trapiantologico (principalmente cellule NK, linfociti T $\gamma\delta^3$  e, in misura minore, cellule dendritiche). Dato che tali cellule sono funzionalmente mature, esse possono esplicare il loro effetto benefico immediatamente dopo il trapianto (cosa che non succede nel trapianto "convenzionale" T-depleto, in cui la maturazione delle cellule NK richiede dalle 6 alle 8 settimane di tempo (vedi anche Fig. 3) (Locatelli et al., 2013)).

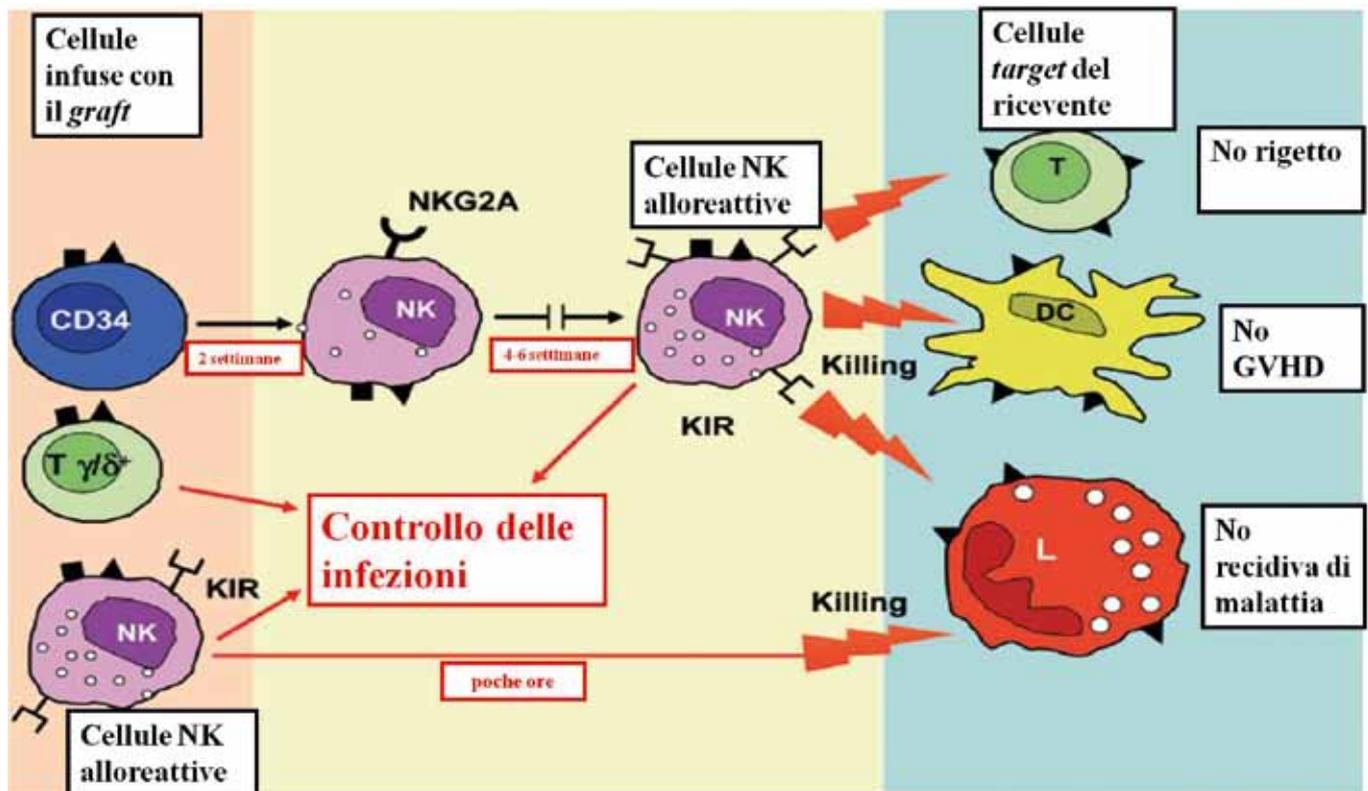
Tale tecnica è stata resa possibile dallo sviluppo di una metodica per la deplezione dei linfociti TCR $\alpha\beta^+$  e CD19 $^+$  da cellule mononucleate (PBMCs) mobilizzate, utilizzabile a livello clinico (Chaleff et al., 2007). Ad oggi sono disponibili dati preliminari, provenienti dai gruppi di Tubinga e Roma, su pazienti pediatrici sottoposti a trapianto aploidentico TCR $\alpha\beta$ /CD19 depleto: in particolare, il primo studio clinico (Handgretinger et al., 2011), condotto su 23 pazienti affetti da leucemia acuta ad alto rischio ha evidenziato non solo un attecchimento del 100% e un'immunoricostituzione molto rapida, ma anche una mortalità legata al trapianto (TRM) estremamente bassa. Questa procedura trapiantologica è stata di recente utilizzata anche in pazienti affetti da patologie non maligne, per i quali non era disponibile un altro tipo di donatore, con ottimi risultati (Bertaina et al., 2013).

### Uno sguardo al futuro: l'infusione di cellule geneticamente modificate con attività anti-tumorale

Gli ultimi anni sono stati caratterizzati da approcci di immunoterapia adottiva, basati sull'infusione di cellule dell'immunità innata o adottiva, opportunamente selezionate e attivate *ex vivo*. Come ben noto, l'avvento di tecniche d'ingegneria genetica ha permesso anche di sviluppare approcci terapeutici basati sull'introduzione di geni in cellule somatiche. Esempi di applicazione clinica coronata da successo in questo ambito sono rappresentati dal trattamento di bambini affetti da forme gravi d'immunodeficienza primitiva (*severe combined immuno-deficiency*, SCID) (Aiuti et al., 2009) o da Sindrome di Wiskott-Aldrich (Aiuti et al., 2013). Più recentemente, importanti sforzi di ricerca si sono concentrati sull'introduzione in T linfociti di sequenze geniche che codificano per recettori specifici diretti contro molecole espresse sulla superficie di elementi tumorali (*chimeric antigen receptors*, CAR) (Hoyos et al., 2012). In ambito pediatrico, è di recentissima pubblicazione il trattamento di 2 pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (uno dei quali sottoposto ad allo-TGSE e infuso con cellule di derivazione del donatore) trattati con successo attraverso l'impiego di T linfociti trasdotti con un CAR specifico per la molecola CD19, espressa sulla superficie di cellule leucemiche a differenziazione B linfocitaria (Grupp et al., 2013). L'associazione di questi CAR con sequenze in grado di mediare un segnale co-stimolatorio che ottimizza l'attivazione T linfocitaria ne aumenta in maniera considerevole l'attività, promuovendone sia la capacità di espansione/persistenza in vivo, sia la capacità litica sui bersagli tumorali.

<sup>2</sup> È nota da tempo l'elevata suscettibilità allo sviluppo di malattie proliferative EBV-correlate in pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche T-depletate: dato che tali disordini linfoproliferativi originano prevalentemente dalle cellule B del donatore, in questo approccio si preferisce B-depletare l'inoculo di cellule che verranno infuse.

<sup>3</sup> I linfociti T $\gamma\delta$  (denominati anche linfociti T innate-like o transazionali) sono una sottopopolazione linfocitaria che possiede determinate caratteristiche proprie del compartimento innato del sistema immunitario (Bonneville et al., 2010): infatti, in modo simile ad altri linfociti T non convenzionali, essi riconoscono antigeni non-peptidici conservati che sono iperespressi da cellule sottoposte a stress, la cui distribuzione e modalità di espressione assomigliano a quelle dei PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) e DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns*), riconosciuti dai PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Inoltre i linfociti T $\gamma\delta$  acquisiscono, in una fase molto precoce del loro sviluppo, un fenotipo pre-attivato, caratterizzato dall'espressione di *markers* di memoria: questo stato pre-attivato permette una rapida induzione delle funzioni effettrici dopo il riconoscimento dello stress cellulare. Numerosi studi, in vitro ed in vivo, hanno suggerito come i linfociti T $\gamma\delta$  possano essere effettori potenzialmente efficaci nel contesto del trapianto di cellule staminali. In particolare, Godder e colleghi hanno analizzato prospetticamente l'immunoricostituzione dei linfociti T $\gamma\delta$  in una coorte di pazienti sottoposti a trapianto aploidentico (Godder et al., 2007): è stato evidenziato un netto incremento della sopravvivenza in pazienti che presentavano un alto numero di linfociti T $\gamma\delta$  nel sangue periferico rispetto ai pazienti con un numero normale/basso.



**Figura 3.**

Una nuova strategia per il TCSE da donatore aploidentico: deplezione dei linfociti T  $\alpha/\beta$  (modificata da Locatelli et al., 2013).

Riserve legate a questa strategia ineriscono alla possibile emergenza di cellule tumorali che riducono o aboliscono l'espressione dell'antigene verso il quale il CAR è diretto e all'eccesso di attivazione e proliferazione di cellule coinvolte in una risposta infiammatoria. Per quest'ultimo aspetto, l'introduzione nel costrutto genico che si viene a trasdurre di una sequenza che codifica per un gene suicida, come per esempio quello della caspasi 9

precedentemente menzionato, può rappresentare un'utile strategia in grado di migliorare la sicurezza dell'approccio. Negli anni a venire, questi sofisticati approcci di bioingegneria cellulare troveranno vasta arena clinico-applicativa e certamente contribuiranno a rendere sempre più vicino il *sogno* di tutti gli oncologi pediatri: rendere il cancro una malattia guaribile in tutti i bambini che ne ammalano.

## Box di orientamento

### **Cosa si sapeva prima**

*Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche ha contribuito in modo significativo al miglioramento della prognosi dei pazienti pediatrici affetti da emopatie maligne ad alto rischio; per lungo tempo, tuttavia, l'unica fonte di cellule staminali è stata costituita da un fratello HLA-identico.*

### **Cosa sappiamo adesso**

*L'introduzione della tipizzazione HLA ad alta risoluzione per donatori non consanguinei, la sempre maggiore disponibilità di unità di sangue cordonale (insieme ad una migliore conoscenza delle indicazioni a questo tipo di trapianto e alle strategie di "potenziamento" dello stesso), così come lo sviluppo di programmi di trapianto T-depleto o T-repleto da donatore familiare parzialmente compatibile, hanno enormemente espanso le possibilità di offrire ad ogni paziente l'opzione terapeutica trapiantologica. Infine l'introduzione di terapie cellulari adottive ha ulteriormente aumentato le possibilità terapeutiche per i bambini affetti da emopatie maligne.*

### **Quali ricadute sulla pratica clinica**

*Ad oggi è virtualmente possibile reperire un donatore adatto per ogni paziente che necessiti di un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.*

## Bibliografia

- Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. *Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome*. *Science* 2013;341:1233151.
- Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. *Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency*. *N Engl J Med* 2009;360:447-58.
- 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;84:3948-55.
- \*\* In questo lavoro il gruppo di Perugia ha dimostrato per la prima volta la fattibilità e l'efficacia del trapianto aploidentico nell'uomo.
- 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 Engl J Med* 1998;339:1186-93.
- Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. *Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse*. *J Clin Oncol* 2005;23:3447-54.
- Bachar-Lustig E, Rachamim N, Li HW, et al. *Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice*. *Nat Med* 1995;1:1268-73.
- Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. *Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond*. *Blood* 2013;122:491-8.
- Barker JN, Byam C, Scaradavou A. *How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts*. *Blood* 2011;117:2332-9.
- Barker JN, Davies SM, DeFor T, et al. *Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis*. *Blood* 2001;97:2957-61.
- Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE. *Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies*. *Blood* 2010;115:1843-9.
- Barnes DW, Loutit JF. *Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow*. *Br J Haematol* 1957;3:241-52.
- Bautista G, Cabrera JR, Regidor C, et al. *Cord blood transplants supported by co-infusion of mobilized hematopoietic stem cells from a third-party donor*. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:365-73.
- Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, et al. *Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation*. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:200-7.
- Bernardo ME, Piras E, Vacca A, et al. *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major: results of a reduced-toxicity conditioning regimen based on the use of treosulfan*. *Blood* 2012;120:473-6.
- Bertaina A, Messina C, Masetti R, et al. *HLA haploidentical stem cell transplantation after removal of alpha/beta plus T-lymphocytes and B-lymphocytes: a new transplant option for children with life-threatening, non-malignant disorders lacking a HLA-identical donor*. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:S50.
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. *Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity*. *Nat Rev Immunol* 2010;10:467-78.
- Bortin MM. *A compendium of reported human bone marrow transplants*. *Transplantation* 1970;9:571-87.
- Chaleff S, Otto M, Barfield RC, et al. *A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation*. *Cytotherapy* 2007;9:746-54.
- \* Prima descrizione della deplezione T  $\alpha\beta$ .
- Christopherson KW, 2nd, Hangoc G, Mantel CR, et al. *Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26*. *Science* 2004;305:1000-3.
- Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, et al. *Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haematopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study*. *Lancet Oncol* 2009;10:489-500.
- Ciceri F, Bregni M, Peccatori J. *Innovative platforms for haploidentical stem cell transplantation: the role of unmanipulated donor graft*. *J Cancer* 2011;2:339-40.
- Comoli P, Basso S, Zecca M, et al. *Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation*. *Am J Transplant* 2007;7:1648-55.
- Cutler C, Multani P, Robbins D, et al. *Prostaglandin-modulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood* 2013;122:3074-81.
- de Lima M, McNiece I, Robinson SN, et al. *Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture*. *N Engl J Med* 2012;367:2305-15.
- \* In questo lavoro de Lima e colleghi hanno dimostrato come la coltura *ex-vivo* su MSCs di un'unità di sangue cordonale comporti un'elevata espansione delle TNC e delle cellule CD34+, ponendo le basi per il superamento del problema della dose cellulare.
- Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, et al. *Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies*. *Blood* 2013;121:849-57.
- Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. *Adoptive Immunotherapy with Tregs and Tcons Ensures Low TRM and a Low Incidence of Post Transplant Leukemia Relapse After HLA Haploidentical Transplants for Acute Leukemia*. *Blood* 2011;118:76.
- Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. *Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation*. *Blood* 2011;117:3921-8.
- Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. *Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy*. *N Engl J Med* 2011;365:1673-83.
- \*\*L'utilizzo di linfociti T trasdotti con il gene suicida per la caspasi 9 permette l'infusione di linfociti convenzionali nel contesto del trapianto aploidentico, con un adeguato controllo della aGvHD.
- Eapen M, Klein JP, Ruggeri A, et al. *Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy*. *Blood* 2013 [epub ahead of print].
- Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. *Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study*. *Lancet* 2007;369:1947-54.
- Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. *CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. *Nat Med* 2003;9:1144-50.
- Ferrara GB, Bacigalupo A, Lamparelli T, et al. *Bone marrow transplantation from unrelated donors: the impact of mismatches with substitutions at position 116 of the human leukocyte antigen class I heavy chain*. *Blood* 2001;98:3150-5.
- Frassoni F, Gualandi F, Podesta M, et al. *Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study*. *Lancet Oncol* 2008;9:831-9.
- \*\* Frassoni e colleghi hanno dimostrato come l'iniezione intraossea del sangue cordonale permetta il superamento dei problemi della dose cellulare e del mismatch.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling*. *N Engl J Med* 1989;321:1174-8.
- Gluckman E, Rocha V. *Cord blood transplantation for children with acute leukaemia: a Eurocord registry analysis*. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:271-3.
- Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, et al. *Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation*. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:751-7.
- Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. *Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia*. *N Engl J Med* 2013;368:1509-18.
- \*\* Primo studio clinico basato sull'impiego in pazienti pediatriche di T linfociti trasdotti con un CAR specifico per la molecola CD19 espressa su cellule di leucemia linfoblastica acuta.
- Handgretinger R, Lang P, Feuchtinger TF, et al. *Transplantation of TcR alpha beta/CD19 Depleted Stem Cells From Haploidentical Donors: Robust Engraftment and Rapid Immune Reconstitution In Children with High Risk Leukemia*. *Blood* 2011;118:460.
- \*\* Primo studio clinico basato sulla tecnica di TcR $\alpha\beta$ + /CD19+ deplezione.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*. *Blood* 1990;75:555-62.
- Hoyos V, Savoldo B, Dotti G. *Genetic modification of human T lymphocytes for the treatment of hematologic malignancies*. *Haematologica* 2012;97:1622-31.
- Huang XJ, Liu DH, Liu KY, et al. *Treatment of acute leukemia with unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and bone marrow transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:257-65.
- Jones RJ, Barber JP, Vala MS, et al. *Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells*. *Blood* 1995;85:2742-6.
- Jun HX, Jun CY, Yu ZX. *In vivo induction of T-cell hyporesponsiveness and alteration of immunological cells of bone marrow grafts using granulocyte colony-stimulating factor*. *Haematologica* 2004;89:1517-24.

- Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. *High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation*. Blood 2007;110:4576-83.
- Liu H, Rich ES, Godley L, et al. *Reduced-intensity conditioning with combined haploidentical and cord blood transplantation results in rapid engraftment, low GVHD, and durable remissions*. Blood 2011;118:6438-45.
- Locatelli F, Kabbara N, Ruggeri A, et al. *Outcome of patients with hemoglobinopathies given either cord blood or bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling*. Blood 2013;122:1072-8.
- Locatelli F, Nollke P, Zecca M, et al. *Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial*. Blood 2005;105:410-9.
- Locatelli F, Pende D, Mingari MC, et al. *Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells*. Front Immunol 2013;4:15.
- Locatelli F, Rocha V, Chastang C, et al. *Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia*. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. Blood 1999;93:3662-71.
- Locatelli F, Zecca M, Messina C, et al. *Improvement over time in outcome for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission given hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors*. Leukemia 2002;16:2228-37.
- \*\*** Questo studio ha mostrato per la prima volta come la tipizzazione molecolare ad alta risoluzione permetta di ottenere nei bambini con leucemia, trapiantati da un MUD, risultati simili a quelli ottenuti impiegando come donatore un germano HLA-identico.
- Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. *HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide*. Biol Blood Marrow Transplant 2008;14:641-50.
- Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. *Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results*. Cancer Res 1965;25:1525-31.
- Moretta A, Bottino C, Pende D, et al. *Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition*. J Exp Med 1990;172:1589-98.
- \*** In questo studio Moretta e colleghi hanno descritto per la prima volta il fenomeno dell'alloreattività NK.
- Moretta A, Locatelli F, Moretta L. *Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias*. Immunol Rev 2008;224:58-69.
- \*\***In questo lavoro viene discusso come l'effetto GvL è mantenuto anche nel trapianto aploidentico grazie all'azione delle cellule NK alloreattive.
- Munchel A, Kesslerwan C, Symons HJ, et al. *Nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high dose, post-transplantation cyclophosphamide*. Pediatr Rep 2011;3 Suppl 2:e15.
- Oevermann L, Lang P, Feuchtinger T, et al. *Immune reconstitution and strategies for rebuilding the immune system after haploidentical stem cell transplantation*. Ann N Y Acad Sci 2012;1266:161-70.
- Owens AH, Jr., Santos GW. *The effect of cytotoxic drugs on graft-versus-host disease in mice*. Transplantation 1971;11:378-82.
- Peccatori J, Clerici D, Forcina A, et al. *In-vivo T-regs generation by rapamycin-mycophenolate-ATG as a new platform for GvHD prophylaxis in T-cell repleted unmanipulated haploidentical peripheral stem cell transplantation: results in 59 patients*. Bone Marrow Transplant 2010;45:S3-S4.
- Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, et al. *Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation*. Blood 2005;106:4397-406.
- Pession A, Masetti R, Rizzari C, et al. *Results of the AIEOP AML 2002/01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia*. Blood 2013;122:170-8.
- Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, et al. *Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation*. Blood 2004;104:2976-80.
- Powles RL, Barrett AJ, Clink H, et al. *Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man*. Lancet 1978;2:1327-31.
- Prigozhina TB, Gurevitch O, Zhu J, et al. *Permanent and specific transplantation tolerance induced by a nonmyeloablative treatment to a wide variety of allogeneic tissues: I. Induction of tolerance by a short course of total lymphoid irradiation and selective elimination of the donor-specific host lymphocytes*. Transplantation 1997;63:1394-9.
- Reisner Y, Hagin D, Martelli MF. *Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives*. Blood 2011;118:6006-17.
- Robinson SN, Ng J, Niu T, et al. *Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Bone Marrow Transplant 2006;37:359-66.
- Robinson SN, Thomas MW, Simmons PJ, et al. *Fucosylation with fucosyltransferase VI or fucosyltransferase VII improves cord blood engraftment*. Cytotherapy 2013 [epub ahead of print].
- Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al. *Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia*. Blood 2001;97:2962-71.
- Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA, et al. *Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling*. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. N Engl J Med 2000;342:1846-54.
- \***In questo lavoro si dimostra per la prima volta in modo inequivocabile la minor incidenza di GvHD acuta e cronica nei pazienti sottoposti a trapianto di sangue cordonale rispetto a quelli sottoposti a trapianto da sangue midollare.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. Science 2002;295:2097-100.
- Scaradavou A, Brunstein CG, Eapen M, et al. *Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia*. Blood 2013;121:752-8.
- Seggewiss R, Einsele H. *Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update*. Blood 2010;115:3861-8.
- Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, et al. *Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy*. N Engl J Med 1957;257:491-6.
- van Rood JJ. *The detection of transplantation antigens in leukocytes*. Semin Hematol 1968;5:187-214.
- Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, et al. *Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival*. Blood 2002;100:1611-8.
- Wagner JE, Eapen M, Carter SL, et al. *No Survival Advantage After Double Umbilical Cord Blood (UCB) Compared to Single UCB Transplant in Children with Hematological Malignancy: Results of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN 0501) Randomized Trial*. Blood 2012;120.
- \*\*** Questa analisi preliminare dello studio randomizzato BMT CTN 0501 dimostra che il trapianto di 2 unità di cordone non comporta vantaggi nei pazienti pediatrici.
- Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, et al. *Allogeneic sibling umbilical-cord blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease*. Lancet 1995;346:214-9.
- Wang HX, Yan HM, Duan LN, et al. *Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in child hematologic malignancies with G-CSF-mobilized marrow grafts without T-cell depletion: a single-center report of 45 cases*. Pediatr Hematol Oncol 2009;26:119-28.

## Corrispondenza

Franco Locatelli, Dipartimento di Onco-Ematologia Pediatrica e Medicina Trasfusionale IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù Piazza S. Onofrio 4 00165 ROMA. Tel.: +39 06 68592678. Fax: +39 06 68592292. E-mail: franco.locatelli@opbg.net