



R. Corvò¹
S. Barra¹
A. Filippi²
U. Ricardi²

¹S.C. Oncologia
Radioterapica, Istituto
Nazionale per la Ricerca sul
Cancro e Università degli
Studi di Genova;
²SCDU di Radioterapia, ASO
San Giovanni Battista e
Università degli Studi di
Torino, Italy

Irradiazione corporea totale: recenti acquisizioni radiobiologiche e tecnologiche

L'irradiazione corporea totale (Total Body Irradiation - TBI) è una tecnica di radioterapia oncologica impiegata da oltre 40 anni nel condizionamento dei pazienti avviati a trapianto di midollo osseo o a trapianto di cellule staminali periferiche.¹ In specifico, il ruolo della TBI è duplice: 1. sopprimere il sistema immunitario del ricevente per prevenire il rigetto del midollo del donatore familiare o non familiare; 2. eradicare le cellule neoplastiche che residuano ai trattamenti chemioterapici.^{1,2} In genere la TBI è somministrata in 3 giorni consecutivi con un bi-frazionamento giornaliero (2 Gy, 2 volte al giorno con intervallo minimo di 6 ore tra le sedute, per 3 giorni con dose totale 12 Gy), ma molteplici modalità di frazionamento della dose (es. 3.3 Gy /die per 3 giorni consecutivi con dose totale 9.90 Gy) sono state ampiamente adottate in clinica.^{2,3} La TBI è stata impiegata nel trattamento dell'anemia aplastica (per evitare il rigetto del midollo del donatore), della β -talassemia, della leucemia mieloide cronica, delle leucemie mieloidi acute e linfatiche acute, dei linfomi-non-Hodgkin, del neuroblastoma, dei tumori di Ewing e dei sarcomi pediatrici a prognosi sfavorevole.¹ Le tecniche utilizzate per oltre 30 anni sono state relativamente semplici mediante un set-up del paziente in posizione semi-eretta,

semi-fetale o supina. Le tecniche di irradiazione prevedono un'incidenza dei fasci con campi complanari antero-posteriore e postero-anteriore o con campi complanari laterali o con 4 campi (AP-PA, LL dx, LL sn): queste tecniche considerate standard presentano il vantaggio di irradiare ampiamente tutto il distretto corporeo dal vertice ai piedi ma nello stesso tempo presentano molti limiti: 1. la dose somministrata è molto disomogenea con aree calde e aree fredde rispetto alla dose nominale: questa variazione può oscillare anche intorno al 20%; 2. gli organi critici come i polmoni, il fegato, l'intestino e i bulbi oculari ricevono una dose equivalente a quella nominale e devono pertanto essere parzialmente schermati mediante compensatori personalizzati; rimane però molto incerta la dose che viene realmente somministrata a questi organi; 3. alcuni organi, sede di un elevato carico di clonogeni tumorali, necessitano di concomitanti supplementi di dose (boost") sulle sedi cosiddette "santuario" come i testicoli o l'encefalo; 4. durante e subito dopo il termine della TBI compaiono effetti collaterali acuti (nausea, vomito, diarrea, stomatite, temporanea perdita del gusto, parotite bilaterale, eritema cutaneo) che necessitano di consolidata terapia di supporto; 5. dopo mesi o anni

dall'esecuzione della TBI si manifestano effetti tardivi come la cataratta, sterilità, deficit cognitivi, ritardo di crescita e disfunzioni ormono-correlate: questi effetti radio-indotti sono molto frequenti nel caso di pazienti pediatrici sottoposti a TBI.

Recentemente le ricerche cliniche e tecnologiche in radioterapia onco-ematologica sono state prevalentemente orientate all'esplorazione di nuove modalità (TBI sub-mieloablative, Total Lymphoid Irradiation -TLI, Total Marrow Irradiation -TMI) mirate a contenere la tossicità radio-indotta (TBI a basso dosaggio, TLI) o a concentrare la dose radiante solo su volumi bersaglio pre-definiti (TMI) riducendo l'erogazione di dosi potenzialmente dannose ad organi critici.

Total lymphoid irradiation

Nell'ultima decade sono stati sviluppati diversi programmi di condizionamento non-mieloablative al trapianto allogenico, contenenti diversi chemioterapici e diverse combinazioni chemio-radioterapiche. Dal punto di vista radioterapico la principale novità rispetto al contesto mieloablative "standard" è stata l'introduzione nella pratica clinica della Total Body Irradiation (TLI) non-mieloablative a basse dosi (2 Gy). Le esperienze pionieristiche del Fred Hutchinson Cancer Research Center di Seattle in ambito di immunologia dei trapianti ed il trasferimento di tali conoscenze dal modello animale all'uomo hanno consentito il rapido affermarsi di questa modalità di condizionamento. Il razionale, rispetto alla TBI mieloablative, è incentrato sul fatto che il principale obiettivo terapeutico della TBI in frazione singola di 2 Gy è l'immunosoppressione del ricevente. L'effetto si ottiene per la spiccata radiosensibilità dei linfociti nel loro complesso, con induzione di apoptosi anche dopo dosi basse. La fattibilità della procedura e la sua

efficacia in termini di "engraftment" sono state dimostrate in molti studi e la tecnica non è dissimile da quella ampiamente adottata nel passato (TBI mieloablative frazionata). Pertanto, nell'ambito dei programmi di condizionamento non mieloablative la TBI in singola dose 2 Gy è attualmente considerata lo standard terapeutico.⁴ Dati pre-clinici ottenuti presso la Stanford University hanno confermato l'ipotesi iniziale che un condizionamento non mieloablative al trapianto di midollo mediante Total Lymphoid Irradiation (TLI), con l'associazione di infusione di siero globulinico anti-linfocitario (ATG), fosse in grado di avere un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo della Graft-versus-Host Disease (GVHD) mediante lo sbilanciamento delle sotto-categorie di linfociti T periferici in favore dei linfociti T regolatori soppressori (in maniera specifica i linfociti T CD3⁺NK1.1⁺ o CD3⁺DX5⁺). La conferma in campo clinico dei dati sperimentali ha portato all'impiego dell'integrazione TLI - ATG per ottenere un efficace "engraftment" del donatore con ridotta GVHD acuta. Nel modello animale la somministrazione della TLI con frazionamento 80 cGy per 10 sedute (dose totale 8 Gy) in associazione a 5 dosi di ATG nel condizionamento di pazienti affetti da leucemia o linfoma ha comportato la riduzione dell'incidenza della GvHD acuta al 4%.^{5,6} In questa strategia la TLI favorisce la massima proliferazione nel ricevente di un subset di cellule radioresistenti NK-T: queste cellule sono la fonte di produzione nello stesso ricevente di Interleukina-4 (IL-4) che in sequenza temporale induce un'ulteriore produzione di IL-4 nelle cellule T-CD4⁺ del donatore. Questo processo può essere mediato dallo sviluppo di cellule T che presentano il profilo di un'aumentata secrezione di citochina Th2. Pertanto ripetute somministrazioni di basse dosi di TLI (80 cGy) mirate spazialmente alle stazioni linfonodali sopra e sottodiaframmatiche e alla milza amplificerebbero l'azione di quelle cellule

NK-T implicate nell'inibizione della secrezione da parte di cellule T-CD4⁺ o T-CD8⁺ di citochine che nel processo della GvHD acuta causano danno all'intestino, al fegato e alla cute. Dopo TLI rimarrebbe invece inalterata l'azione di Graft vs Leukemia indotta dalle cellule CD8⁺ del donatore. Solo 2 pazienti su 37 sottoposti a TLI presso la Stanford University hanno evidenziato GvHD acuta; la reazione Graft vs Tumor si è evidenziata in tutti i pazienti irradiati.⁶

Intensity modulated-total marrow irradiation

Mediante moderni acceleratori lineari dotati di accessori tecnologici per eseguire trattamenti ad intensità modulata o mediante la tomoterapia elicoidale è possibile oggi eseguire irradiazioni focalizzate al volume bersaglio (cavità midollari) evitando l'irradiazione degli organi a rischio limitrofi.^{7,8} Questa tecnica, chiamata: Intensity-Modulated Total Marrow Irradiation (IM-TMI), vede come organi bersaglio (Clinical Target Volume-CTV) le sedi ossee dove attiva è la produzione di cellule ematopoietiche (cranio, mandibola, sterno, coste, vertebre, ali iliache, teste femorali e 1/3 superiore delle diafisi dei femori). Gli organi a rischio

che sono identificati per non ricevere la dose di radioterapia sono i cristallini, l'encefalo, i polmoni, il fegato i reni e il cuore. Studi preliminari eseguiti con tomoterapia elicoidale hanno permesso di ottenere una riduzione di 1.3-4.5 volte della dose somministrata agli organi a rischio rispetto alla TBI standard (vedi Figura 1). Inoltre con la tomoterapia elicoidale viene migliorata la conformità della dose ai target pre-definiti e migliore è anche l'omogeneità della dose somministrata. La tomoterapia elicoidale è la più moderna e sofisticata tecnica di radioterapia a fasci esterni, chiamata con questo acronimo perché unisce la tecnologia di radioterapia ad intensità modulata (IMRT) con la tecnica della tomografia computerizzata spirale:^{9,10} il trattamento radiante viene erogato in modalità elicoidale grazie al movimento rotazionale del "gantry" con il concomitante movimento longitudinale del lettino porta-paziente; la tomoterapia è inoltre dotata di un sistema guidato dall'immagine (Image-Guided-System- IGRT), completamente integrato, che permette una corretta registrazione del paziente mediante la valutazione diretta di immagini volumetriche ricavata da una TC ad alto voltaggio incorporata nell'attrezzatura. La sorgente di rilevazione della Tomoterapia è un acceleratore lineare che emette fotoni X da 6 Mv posto su un

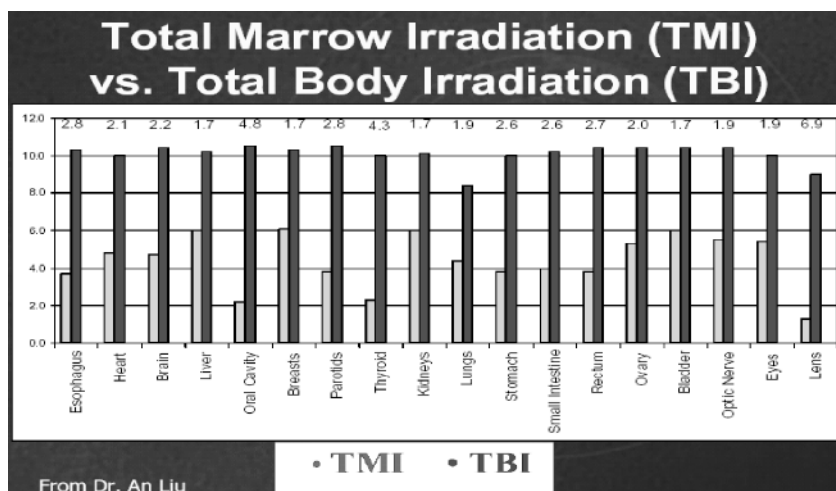


Figura 1. Confronto delle dosi radianti somministrate a vari organi critici dopo l'utilizzo di due diverse tecniche di radioterapia (TBI versus TMI) (da Won JY, Liu A. *et al.*, ref 3).

gantry circolare simile ad uno scanner TC, ruota in sincronia con i movimenti longitudinali continui del lettino porta-paziente creando un fascio ad intensità modulata con andamento elicoidale che viene modulato da un collimatore multilamellare (MLC).⁹ In campo trapiantologico è inoltre possibile con acceleratore lineare dedicato o con tomoterapia elicoidale somministrare simultanei supplementi di dose (Simultaneous integrated Boost- SIB) ad aree sedi di un elevato carico di cellule clonogene maligne.

Bibliografia

1. Thomas ED, Lochte HI, Cannon JH et al. Supraletal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-16.
2. Copelan EA. Hematopoietic Stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354:1813-26.
3. Corvò R, Lamparelli T, Bruno S et al. Low-dose fractionated total body irradiation adversely affects prognosis of patients with leukemia receiving an HLA-matched UD-BMT. *Bone Marrow Transplantation* 2002;30:717-23.
4. Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation after fludarabine and 2 Gy Total Body Irradiation for relapsed and refractory mantle cell lymphoma. *Blood* 2004;104:3535-42.
5. Strober S. Protective conditioning against GVHD and Graft rejection after combined organ and hematopoietic cell transplantation. *Blood Cells, Molecules and Disease* 2008;40:48-54.
6. Lowsky R, Takahashi T, Liu P et al. Protective conditioning for acute graft versus host disease. *New Engl J Med* 2005;353:1321-31.
7. Wong JY, Liu A, Schultheiss T et al. Targeted total marrow irradiation using 3-D image-guided tomographic intensity modulated radiation therapy: an alternative to standard total body irradiation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12: 306-15.
8. Aidogan B, Mundt AJ, Roeske JC : Linac-based intensity modulated total marrow irradiation (IM-TMI). *Technology in Cancer Research and Treatment* 2006;5: 513-9.
9. Hui SK, Kaputoes J, Fowler J et al. Feasibility study of helical tomotherapy for total body or total marrow irradiation. *Med Phys* 2005;32: 3214-24.
10. Welsh JS, Lock M, Harari PM et al. Clinical implementation of adaptive helical tomotherapy: a unique approach to image-guided intensity modulated radiotherapy. *Tech Cancer Res Treat* 2006;5:465-79.

A. Rambaldi

USC Ematologia, Ospedali
Riuniti di Bergamo, Italy

I regimi di condizionamento mieloablativi



Il trapianto di progenitori staminali emopoietici autologhi o alloge-nici rappresenta un trattamento potenzialmente guaritivo per alcune neoplasie del sistema emolinfopoietico altrimenti resistenti a dosi convenzionali di chemio-radioterapia. Per entrambe le tipologie di trapianto il successo della procedura dipende da fattori legati al paziente (età, sesso, performance status, stato virologico), alla malattia (diagnosi, fase di malattia, chemiosensibilità, etc.), al donatore (sesso, sorgente delle cellule staminali, compatibilità HLA, stato virologico) e infine alla qualità del team medico che realizza il trapianto. Inoltre vi sono fattori legati alla modalità di esecuzione della procedura trapiantologia che includono: il regime di condizionamento (a piena o ridotta intensità mieloablativa), la dose di cellule staminali, la profi-lassi della malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD).

I regimi di condizionamento mieloablativi

Il rationale all'impiego di dosi mieloablative di chemio o chemio-radioterapia viene dalla evidenza clinica e di laboratorio che molte neoplasie ematologiche mostrano una risposta dose dipendente all'effetto dei farmaci alchilanti e/o della radioterapia. Il tra-

pianto di progenitori staminali emopoietici normali ottenuti dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal cordone ombelicale rende possibile il superamento della tossicità indotta dal regime di condizionamento anche sulla componente emopoietica normale. Inizialmente, i regimi di condizionamento al trapianto si sono basati sull'impiego combinato di ciclofosfamide 60 mg/kg/die x 2 giorni e della irradiazione corporea totale alla dose di 1200 cGy (TBI). Tuttavia, la TBI presenta numerose tossicità (a livello polmonare, intestinale, oculare, del sistema neuroendocrino, etc..) che anche a lungo termine e specialmente nei bambini, possono pregiudicare la qualità di vita e favorire l'insorgenza tardiva di neoplasie secondarie. Da ultimo non vanno dimenticate le difficoltà logistico/organizzative che molti centri di trapianto devono affrontare per utilizzare la TBI come regime di condizionamento. Nel corso degli anni alcuni importanti studi clinici controllati sono stati condotti per cercare di definire gli eventuali vantaggi di una tra queste due modalità terapeutiche.^{1,2} Nel 2001 Socié ha pubblicato un aggiornamento di questi 4 studi concludendo che entrambi i regimi (Bu-CY e CY-TBI) garantiscono una simile probabilità di cura per i pazienti con CML. Nei pazienti con AML sottoposti a

Tabella 1. Studi clinici controllati di confronto fra regimi di condizionamento mieloablativi contenenti TBI o Busulfano orale.

Autore	Pazienti Numerosità età mediana (range)	Patologia	TRM tardiva TBI/oral Bu	Sopravvivenza TBI/oral Bu	LFS/DFS TBI/oral Bu
Blaise <i>et al.</i> 1992/2001	101 33 (14-49)	AML, CR1 Malattia precoce	16% vs. 27% $p=0.06$	58% vs. 44 $p<0.05$	57% vs. 36% $p<0.05$
Ringden <i>et al.</i> 1994	167 36 (10-54)	AL, NHL, CML malattie precoci e avanzate:	9% vs. 28% $p=0.006$	76% vs. 62% $p<0.002$	Uguale
			M precoce = Uguale M avan= TBI>oral BU 12% vs. 62% $p=0.002$	M precoce= Uguale M avan TBI>oral BU 66% vs. 21% $p=0.002$	
Clift <i>et al.</i> 1994	142 37	CML malattia precoce	6% vs. 4%	Equal a 3 anni	71% vs. 68% a 3 anni
Devergie <i>et al.</i> 1995	120 36	CML malattia precoce	29% vs. 38% $p=0.44$	Uguale	Uguale

condizionamento con BuCy si è registrato una sopravvivenza lievemente inferiore (del 10%, non significativa). L'incidenza di complicanze tardive è stata simile anche se con un rischio maggiore di cataratta per i pazienti trattati con TBI e di alopecia per i pazienti trattati con BuCy.³ Pertanto, come mostrato in Tabella 1, il confronto tra questi due regimi di condizionamento non ha permesso di evidenziare un sicuro vantaggio/svantaggio per uno di questi programmi che rimangono a tutt'oggi da considerare lo standard di riferimento almeno per i pazienti affetti da leucemia acuta e di età inferiore ai 40 anni.

Tuttavia, non può essere dimenticato che le gravi tossicità correlate a questi regimi di condizionamento hanno sostanzialmente limitato l'applicabilità complessiva di questi schemi terapeutici ai soli pazienti più giovani e con buone condizioni di performance. A questo proposito, i gruppi cooperatore di Belgio e Olanda (Hovon) in collaborazione con quello svizzero (SAKK) hanno recentemente pubblicato i risultati di un'analisi donor/no-donor condotta in pazienti con AML in prima remissione. Tali

risultati hanno confermato che mentre nei pazienti di età inferiore a 40 anni la disponibilità di un donatore si associava a un evidente vantaggio in termini di sopravvivenza (con l'eccezione dei pazienti con malattia con cariotipo favorevole), nei pazienti di età superiore a 40 anni tale beneficio era perso.⁴ L'analisi ha evidenziato che la perdita del beneficio associato al trapianto era causata interamente dall'incremento della mortalità trapiantologica nei pazienti appartenenti a questa fascia di età. Per questo motivo, negli ultimi 10 anni si sono sviluppati molti programmi di condizionamento non mieloablativi in cui il prevalente effetto antileucemico della procedura era affidato all'effetto *Graft versus Leukemia*. Tuttavia dopo un grande entusiasmo iniziale, almeno per quanto riguarda le leucemia acute, è divenuto progressivamente evidente che tali regimi di condizionamento si associano ad un rischio assai più elevato di recidiva di malattia. Pertanto, per i pazienti di età compresa fra i 40 e i 65 anni il beneficio fornito dai regimi di condizionamento non mieloablativi è oggi posto fortemente in dubbio.

Tabella 2. Principali studi condotti con il regime di condizionamento Busulfano e Fludarabina.

Autore	Diagnosi	Pazienti	Tipo di trapianto	TRM	OS
Shagnessy <i>et al.</i> 2002	Neoplasie ematologiche	30	HLA id sib	28% (1 anno)	52%
Martino <i>et al.</i> 2002	AML (17) MDS (20)	37	HLA id sib and MUD	5% (1 anno)	
Blaise <i>et al.</i> 2005	AML	33	HLA id sib and MUD	9% (2 anni)	79%
Alyea <i>et al.</i> 2005	Neoplasie ematologiche	71	MUD	32% a 30 mesi	39%
Shimoni <i>et al.</i> 2006	AML, MDS	26	HLA id sib and MUD	8% (20 mesi)	48%
Chae <i>et al.</i> 2007	Neoplasie ematologiche	40	HLA id sib and MUD	10%	87%
Andersson <i>et al.</i> 2008	AML, MDS	148	HLA id sib and MUD	17%	78%

Regimi di condizionamento a ridotta tossicità

Per questo motivo più recentemente molti ricercatori hanno cercato di sviluppare programmi di condizionamento che, ancorché meglio tollerati rispetto ai convenzionali protocolli Cy-TBI o BuCy2, ritenessero tutto o gran parte del potenziale mieloablattivo di questi ultimi. Ciò ha portato allo sviluppo del concetto di programmi a ridotta tossicità piuttosto che di ridotta intensità. Capofila di questi protocolli è senz'altro quello basato sulla associazione della formulazione endovenosa di busulfano (0.8 mg/kg/ ogni 6 ore per 4 giorni) con la fludarabina (30 mg/m²/die per 4 giorni). Questo programma si caratterizza per l'intatto potere mieloablattivo del busulfano che, associato alla minore tossicità della fludarabina rispetto alla ciclofosfamida, risulta essere solitamente molto meglio tollerato. La riduzione dell'attività antileucemica complessiva sembra modesta mentre i primi risultati (ancorché provenienti da piccoli studi retrospettivi o di fase II), sembrano indicare una significativa riduzione della mortalità trapiantologica. Il risultato netto sembra essere associato ad un significativo incremento della sopravvivenza complessiva.⁵⁻⁸ La Tabella 2 riassume alcuni degli studi fino ad ora condotti con questo o simili

schemi di condizionamento.

In conclusione il regime di condizionamento che precede il trapianto di cellule staminali emopoietiche rimane un punto cruciale nella strategia terapeutica di questa procedura. Il potenziale mieloablattivo di tali programmi rimane ancora oggi un presupposto fondamentale per il successo della procedura in molti casi ed in particolare per le leucemie acute. Nuove strategie e nuove combinazioni di farmaci sembrano promettere ulteriori progressi sia in termini di efficacia che di minore tossicità. Studi clinici controllati sono in corso e potranno fornire la verifica di queste ipotesi.

Bibliografia

1. Clift RA, Buckner CD, Thomas ED, Bensinger WI, Bowden R, Bryant E, et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide. *Blood* 1994;84:2036-43.
2. Blaise D, Maraninchi D, Michallet M, Reiffers J, Jouet JP, Milpied N, et al. Long-term follow-up of a randomized trial comparing the combination of cyclophosphamide with total body irradiation or busulfan as conditioning regimen for patients receiving HLA-identical marrow grafts for acute myeloblastic leukemia in first complete remission. *Blood* 2001;97:3669-71.
3. Socie G, Clift RA, Blaise D, Devergie A, Ringden O, Martin PJ, et al. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood* 2001;98:3569-74.
4. Cornelissen JJ, van Putten WL, Verdonck LF, Theobald M, Jacky E, Daenen SM, et al. Results of a

A. Rambaldi

- HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood* 2007;109:3658-66.
5. Blaise DP, Michel Boiron J, Faucher C, Mohty M, Bay JO, Bardoux VJ, et al. Reduced intensity conditioning prior to allogeneic stem cell transplantation for patients with acute myeloblastic leukemia as a first-line treatment. *Cancer* 2005;104:1931-8.
 6. Chae YS, Sohn SK, Kim JG, Cho YY, Moon JH, Shin HJ, et al. New myeloablative conditioning regimen with fludarabine and busulfan for allogeneic stem cell transplantation: comparison with BuCy2. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:541-7.
 7. Shaughnessy PJ, Ornstein D, Ririe D, Callander N, Anderson JE, Pollack MS, et al. Phase II study of a moderate-intensity preparative regimen with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for hematologic diseases: the Texas Transplant Consortium experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:420-8.
 8. Shimoni A, Kroger N, Zabelina T, Ayuk F, Hardan I, Yeshurun M, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation from unrelated donors in elderly patients (age >55 years) with hematologic malignancies: older age is no longer a contraindication when using reduced intensity conditioning. *Leukemia* 2005;19:7-12.

P. Iacopino
R. Fedele
G. Messina

Programma Regionale
Trapianti di Cellule Staminali
e Terapie Cellulari,
Regione Calabria;
Centro Unico Regionale
Trapianti di Midollo Osseo e
Terapie Cellulari Alberto Neri
Azienda Ospedaliera "Bianchi
Melacrino Morelli", Reggio
Calabria, Italy

Chemioterapici immunosoppressori



A B S T R A C T

Le nuove conoscenze sull'immunobiologia dei trapianti hanno portato a una rapida evoluzione nel disegno dei regimi di condizionamento negli ultimi quindici anni. Dopo una prima fase principalmente orientata alla riduzione della tossicità e all'estensione dei criteri di eleggibilità al trapianto con impiego di programmi non mieloablativi, i nuovi condizionamenti puntano ad ottenere un effetto mieloablativo mantenendo una bassa tossicità. L'ottimizzazione, basata su dati di farmacocinetica, dell'uso dei chemioterapici immunosoppressori tradizionali, come la ciclofosfamida, e l'utilizzo degli analoghi della purina, come la fludarabina, sono strategici per ottenere tale risultato. Anche se i risultati preliminari di alcuni studi sono promettenti, nella pratica clinica la misurazione dei parametri cinetici della ciclofosfamida ha un'utilità ancora marginale. La fludarabina invece, in associazione con farmaci mieloablativi, sta offrendo le migliori opportunità sia per quanto riguarda i trapianti da donatore familiare sia per quelli da donatore alternativo.

Introduzione

I regimi di condizionamento sono disegnati allo scopo di ridurre le cellule neoplastiche e midollari del ricevente e di indurre l'immunosoppressione indispensabile all'attecchimento linfoemopoietico delle cellule del donatore. L'effetto citotossico del condizionamento, inoltre, espone e mette in circolo antigeni tumorali che attivano i linfociti T del donatore, con il contributo delle cellule presentanti l'antigene (APC). La risposta immune che ne deriva (graft-versus-malignancy, GVM) è in grado di diminuire ulteriormente il numero delle cellule maligne eventualmente sopravvissute all'effetto citotossico prodotto dalla chemio/radioterapia usata per il condizionamento.¹ I regimi standard mieloablativi raggiungono tali scopi associando la total body irradiation (TBI) o il busulfano con la ciclofosfamida (CY), ma la tossicità ha per molto tempo limitato l'indicazione del trapianto ai soggetti giovani con un buon performance status.

Fortunatamente, le migliori conoscenze sull'immunobiologia dei trapianti hanno indotto una rivoluzione concettuale nel disegno dei regimi di condizionamento negli ultimi dieci anni.¹ Molti condizionamenti prevedono la riduzione dell'intensità di dose (regimi a intensità ridotta, RIC, o esclusivamente immunosoppressivi), particolarmente utile in alcune emopatie maligne caratterizzate da un decorso non aggressivo. Nelle patologie ad alto rischio di recidiva, piuttosto che alla riduzione dell'intensità di dose, è opportuno puntare al disegno di regimi di condizionamento che, insieme, mantengano un potente effetto citoriduttivo e siano dotati di minore tossicità (regimi a ridotta tossicità, RTC). A tal fine è possibile sfruttare la disponibilità di farmaci dotati di una minore tossicità ma che hanno dimostrato o un potente effetto citoriduttivo (busulfano endovena, treosulfano, thiotepea) o immunosoppressivo (fludarabina, pentostatina). Una strategia utile può anche essere il disegno di regimi basati sulle nuove acquisizioni in tema di

farmacocinetica e farmacodinamica. Limitatamente ai chemioterapici immunosoppressori, è noto che la loro tossicità varia considerevolmente in ragione della dose impiegata. Tale variabilità è inoltre attribuibile all'interazione con altre molecole e al possibile ruolo delle diversità individuali nel loro metabolismo. Nella presente rassegna sono presentate le caratteristiche farmacologiche e il razionale dell'impiego della CY e della fludarabina (FLU), due dei chemioterapici immunosoppressori più frequentemente utilizzati nei programmi di condizionamento al trapianto.

Ciclofosfamide

Pur essendo un farmaco impiegato da quasi quaranta anni, le agenzie governative (FDA e EMEA) non hanno mai stato registrato la CY per la terapia di condizionamento del trapianto. Solo recentemente l'AIFA ha riconosciuto e autorizzato l'utilizzo off-label della CY, da sola o in associazione, in regimi di condizionamento pre-trapianto e in protocolli di mobilizzazione dei progenitori emopoietici.

Meccanismo d'azione

La CY (2-[bis(2-cloroetilamino)tetraidro-2H-1,3,2-ossazafosforina 2-ossidemo-noidrato]) è un chemioterapico con un ampio spettro d'azione antitumorale, un buon indice terapeutico e proprietà immunosoppressive. È un farmaco che è biotrasformato in metaboliti attivi. Essi hanno la proprietà di trasferire gruppi alchilici e, in tal modo, stabilire legami anomali delle catene di DNA, del DNA-RNA, del DNA-proteine, ecc... Tuttavia il meccanismo d'azione che è considerato più importante consiste nell'alchilazione dell'azoto in posizione 7 della guanina. Esso comporta alterazioni della sequenza nucleotidica e legami crociati (cross-linking) tra due residui guaninici presenti sui due filamenti appaiati del DNA.

Le conseguenze sono la rottura delle eliche del DNA, l'inibizione della sua sintesi e altri danni alla trascrizione e trasduzione del materiale genetico che portano all'apoptosi, alla modulazione del ciclo cellulare e ad altri effetti antiproliferativi. Come per gli altri agenti alchilanti, l'azione citotossica della CY è specifica per il ciclo cellulare, ma non fase-specifica, ed è dose-dipendente.

Metabolismo

Circa il 70-80% della CY è bio-ossidata in 4-idrossi-CY (4OHCY) dalle ossidasi dei citocromi (CYP) del sistema microsomiale epatico P-450. Numerosi sono i CYP (2A6, 2B6, 3A4, 3A5, 2C9, 2C18, 2C19, e 2B6) coinvolti in vario modo nei processi di attivazione e inattivazione metabolica della CY. Tali processi sono piuttosto complicati, ma sufficientemente conosciuti. Anzitutto, la 4OHCY, che è non citotossica ma molto instabile, si decompone con un equilibrio non enzimatico in aldofosfamide, tautomero dell'aldeide chiamato in causa quale responsabile principale della cardiotossicità. L'aldofosfamide è, poi, in parte catabolizzata in fosforamide mostarda, alchilante bifunzionale che è la forma attiva del farmaco, e in parte in acroleina, che viene escreta intatta nelle urine ed è responsabile della tipica cistite emorragica indotta dalla CY. Contrariamente alla 4OHCY, la fosforamide non è in grado di penetrare nelle cellule, sicché si ritiene che solo quella derivata dalla 4OHCY intracellulare sia responsabile dell'effetto citotossico. Parti della 4OHCY e dell'aldofosfamide sono deattivate in cheto-CY e carbossi-CY (CEPM) da reazioni ossidative, nelle quali sono implicati rispettivamente un alcool deidrogenasi e un'aldeide deidrogenasi (ALDH), e dalla coniugazione con il glutatone (GSH), *via* GSH S-transferasi (GST). La formazione del CEPM sembra essere la più importante via di detossificazione della 4OHCY. Elevati livelli di CEPM, misurati

mediante la curva concentrazione-dose (AUC), sono stati associati ad un incremento del rischio di malattia veno-occlusiva epatica (VOD) e della TRM in pazienti trattati con CY+TBI.² Un'ulteriore via di detossificazione della CY è l'ossidazione mediata dal citocromo CYP3A4, che porta alla formazione del metabolita inattivo decloro-etil-CY e di un'equimolare quantità di cloro-aceta-aldeide.^{3,4}

Farmacocinetica

Dopo la somministrazione orale o endovenosa, la CY è rapidamente distribuita nell'organismo, legata per meno del 20% (0-30%) alle proteine plasmatiche. Un più rilevante legame con le proteine è caratteristico dei suoi metaboliti (è il 60% circa per la 4OHCY). Nell'adulto la *clearance* plasmatica (tempo di dimezzamento, t_{1/2}) della CY immo-dificata è di 5-9 ore, mentre nei bambini è più breve. Il volume di distribuzione, riportato di 30-50 litri nei normotipi, è aumentato negli obesi. Ciò comporta un aumento del t_{1/2} che richiede aggiustamenti delle dosi da somministrare. Numerosi studi suggeriscono che la CY supera la barriera emato-encefalica, con un rapporto plasma/liquor pari a 0,2-4,0. I metaboliti attivi, invece, hanno una limitata diffusione attraverso la barriera a causa del loro legame con le proteine plasmatiche e della loro diversa polarità. Ciò potrebbe spiegare la bassa neurotossicità della CY. Per quanto riguarda le vie di eliminazione: il 5-25% della CY è escreta immo-dificata nelle urine, la restante parte come metaboliti.^{4,5,6}

Autoinduzione

La CY induce il proprio metabolismo nelle somministrazioni ripetute, vale a dire dopo le prime dosi aumenta la *clearance* del farmaco nello stesso paziente (autoinduzione). Per tale motivo, differenti schedule della stessa dose totale possono produrre differenti profili

dell'AUC. Ad esempio, le infusioni in bolo di CY determinano un'AUC assai differente da quella che si è evidenziato dopo le somministrazioni continue e prolungate.⁷ L'autoinduzione si osserva tipicamente fra il primo e i successivi giorni di trattamento, mentre negli schemi di terapia ciclica i sistemi metabolici vengono pienamente ripristinati durante l'intervallo. La dimensione del fenomeno dell'autoinduzione ha però una marcata e non prevedibile variabilità individuale, dipendendo da fattori genetici, interazioni farmacologiche, età, tipo di malattia. Appare, inoltre, non ancora chiaro se il fenomeno dell'autoinduzione produca o no un incremento dell'esposizione ai metaboliti citotossici. Importante, a tal proposito, è rilevare che, dopo un'infusione in bolo di CY (5 min-2 h), il picco di concentrazione della 4OHCY e della fosforamide si raggiunge entro 0,5-3,0 ore.

Escalation dose

La CY possiede una curva dose-risposta che lo rende un farmaco ideale per la dose-escalation. Per tale motivo è frequentemente somministrato ad alte dosi, seguito o meno da un rescue di cellule staminali ematopoietiche. La posologia, quando è impiegato in schemi di chemioterapia convenzionale o come immunosoppressore, varia da 500 mg a 1500 mg/m² con somministrazione ogni 3-4 settimane. Da sola o in combinazione è utilizzata fino alla dose totale di 6-7 gr/m² nei regimi di condizionamento o di mobilizzazione di PBSC. La dose totale è in genere distribuita in 2-4 giorni con infusioni di 1-2 ore. Quando utilizzata ad alte dosi, la CY mostra una curva cinetica di eliminazione non lineare caratterizzata da una convessità rivolta verso il basso, probabilmente dovuta alla saturazione degli enzimi coinvolti nel suo metabolismo.⁸ Come prima ricordato, le somministrazioni ripetute comportano la riduzione del tempo medio di eliminazione della CY e un aumento della sua *clearance*.

Interazioni farmacologiche

Un'interazione della farmacocinetica della CY è stata dimostrata con molti farmaci. L'inibizione o l'attivazione del sistema dei citocromi P450 è alla base di tali interazioni. Fra i farmaci frequentemente impiegati durante il trapianto, un effetto inibente il metabolismo della CY mediato dai CYP è stato dimostrato per busulfano, azolici, clorpromazina, ciprofluoxacina, ranetidina e thiotepa. Un effetto di induzione è stato suggerito, invece, per desametasone, prednisone, fenobarbitale, fenitoina e per alcuni antiemetici come l'on-dansetron.^{3,4}

Non solo il sistema enzimatico dei CYP, ma anche quello dell'ALDH può essere influenzato dal concomitante uso di altri farmaci. Ad esempio la carmustina, farmaco impiegato frequentemente nel condizionamento pre-trapianto autologo, è un inibitore competitivo dell'ALDH1, soprattutto se impiegata ad alte dosi.⁹

Le interazioni sono spesso bidirezionali perché anche la CY è in grado di influenzare la farmacocinetica e farmacodinamica dei farmaci co-somministrati. Tipico esempio è quello del thiotepa che inibisce l'attivazione della CY diminuendone l'efficacia e la tossicità, ma è a sua volta indotto dalla CY alla trasformazione nel suo metabolita attivo tepa.³ Modifiche della farmacocinetica indotta dalla CY sono state riportate anche per la digossina e le antracicline.⁴

Occorre, comunque, sottolineare come trasferire nella pratica le informazioni sulla maggior parte delle interazioni prima riportate sia alquanto difficile anche perché il loro significato clinico non è ancora chiaro. D'altra parte, considerata la complessità dei meccanismi di detossicazione e attivazione della CY, è da attendersi che le sue modifiche farmacocinetiche si possano associare anche a variazioni significative della *clearance* dei suoi metaboliti attivi o tossici. Può accadere, ad esempio,

che alla riduzione della *clearance* renale della CY possa seguire un aumento di quella dei suoi metaboliti e viceversa.^{3,4}

Variabilità interindividuale

L'esposizione sistemica ai metaboliti della CY dopo una dose fissa di CY può variare fino a 10 volte fra un paziente e l'altro.³ Se somministrata a dosi elevate come avviene nel condizionamento TBI+CY, con l'infusione di CY prima della TBI, può essere osservata una differenza interpaziente di 17 volte per quanto riguarda il rapporto AUC4OHCY/AUCcy.⁷ Questa marcata variabilità individuale della cinetica e della biotrasformazione è in parte riferita al polimorfismo e ai livelli di espressione degli enzimi CYP coinvolti nel metabolismo della CY.^{3,13} Anche variazioni che riguardano i livelli di espressione degli altri sistemi di detossicazione (ALDH e GSH S-transferasi) possono essere responsabili della variabilità individuale della cinetica della CY e dei suoi metaboliti.²⁻⁴

Accanto alla variabilità genetica e prescindendo dalle interazioni farmacologiche, numerosi altri fattori (età, peso, variazioni circadiane, ecc.) possono influenzare i livelli di attività enzimatica e perciò il metabolismo della CY. In particolare, l'età può avere una significativa influenza, dal momento che i bambini mostrano un incremento della formazione dei metaboliti attivi.^{10,11}

La malattia di base è un altro fattore rilevante per la farmacocinetica della CY. Nei modelli sperimentali, topi portatori di tumore mostrano una maggiore capacità di inibire l'attivazione della CY rispetto ai controlli sani. Nell'uomo è stato osservato che i bambini con Anemia di Fanconi presentano una minore *clearance* della CY, probabilmente per un'alterata azione del sistema enzimatico CYP.¹² Recentemente, infine, è stato segnalato che il rischio di recidiva dei linfomi non-Hogkin aumenta nei bambini con l'inadeguata attiva-

zione della CY.¹³

La disfunzione degli organi coinvolti nel metabolismo potrebbe influenzare significativamente l'attivazione e la *clearance* della CY. Per quanto riguarda il fegato, non è mai stata trovata una significativa correlazione fra i parametri di funzione epatica e la farmacocinetica della CY. In altre parole, non sembra che la disfunzione del fegato sia in grado di influenzare l'efficacia e la tossicità della CY. Pertanto, nessuna modifica di dose è richiesta in presenza di un danno epatico. La funzione renale, invece, influenza la farmacocinetica della CY perché nei soggetti con *clearance* della creatinina ridotta si è osservata, anche se non in tutti gli studi, una ridotta *clearance* della CY e una prolungata esposizione ai metaboliti. Non c'è evidenza, comunque, di una tossicità clinica nei pazienti con insufficienza renale. La riduzione della dose è però raccomandata in pazienti con grave insufficienza renale, specialmente se si tratta di bambini. Tenuto conto che il farmaco è dializzabile, è raccomandata la sua infusione 12 ore prima della dialisi per mantenerne l'efficacia.

Effetti immunologici

Accanto all'effetto antineoplastico la CY è capace di produrre modifiche della sorveglianza immunologica, assai diverse in ragione delle dosi e delle schedule di somministrazione.¹⁴ In particolare, la citotossicità delle alte dosi diretta contro i linfociti, specie quelli recentemente attivati e proliferanti, produce l'eradicazione dell'autoimmunità, previene l'alloimmunizzazione e induce immuno-tolleranza nell'animale. Essa, per contro, risparmia le cellule staminali primitive perché hanno elevati livelli di ALDH, un enzima che come prima riportato conferisce resistenza alla CY, intervenendo nei processi di detossificazione. Relativamente ai meccanismi di induzione della tolleranza, è stato suggerito che con la dose di 200 mg/kg si realizzano tre fasi succes-

sive: 1) nella prima fase, la distruzione clonale delle cellule T proliferanti e attivate dall'antigene; 2) nella fase intermedia, la delezione clonale intratimica; 3) nella fase tardiva, l'espansione delle cellule regolatorie, specie le NKT.¹⁵ Queste proprietà rendono ragione, nell'uomo, dell'impiego della CY nel condizionamento del trapianto allogenico (specie anemia aplastica) e nel trapianto autologo per le malattie autoimmuni. Recentemente, inoltre, tenuto conto che con il trapianto allogenico si induce l'attivazione bidirezionale (GVH e HVG) dei linfociti T e che le cellule attivate sono particolarmente sensibili alle alte dosi, la CY (50 mg/kg/die a +3 e +4) è stata impiegata con successo per depletare *in vivo* le cellule alloreattive del donatore, dopo trapianto fra familiari non HLA-compatibili.¹⁶ È interessante notare che in questo programma è stato impiegato un regime di condizionamento nonmieloablattivo che prevedeva la somministrazione di CY (14,5 mg/kg/die x 2), FLU (30 mg/m²/die x 5) e TBI 200.

Fludarabina

Molti regimi di condizionamento non mieloablattivi utilizzano gli analoghi delle purine (FLU o pentostatina), associati agli agenti alchilanti (CY, melfalan, busulfano) o alla radioterapia a basso dosaggio (TBI200, TBI400) o alla Total Lymphoid Irradiation (TLI), per la loro capacità di indurre a dosi standard un'immunosoppressione sufficiente all'attecchimento. Il più estesamente studiato e impiegato è la FLU (9-beta-D-arabinosil-2-fluoradenine-50-monofosfato), un profarmaco sintetico analogo dell'adenosina, strutturalmente simile alla citosina arabinoside (ara-C) e alla vidarabina (ara-A). Allo scopo di conferire all'ara-A caratteristiche di resistenza all'adenosina deaminasi (ADA), è stata sintetizzata la 9-β-arabinosil-2-fluoroadenina (F-

ara-A), un derivato fluorinato relativamente insolubile. Nella forma di monofosfato, cioè come FLU, è invece idrosolubile e come tale è stata sviluppata per l'uso clinico.¹⁷ Anche nel caso della FLU, l'AIFA ne ha solo recentemente riconosciuto e autorizzato l'utilizzo off-label, da sola o in associazione, in regimi di condizionamento pre-trapianto nell'adulto e nel bambino.

Metabolismo e meccanismo d'azione

Prima di entrare nelle cellule, la FLU è rapidamente defosforilata in F-ara-A dall'ectonucleosidasi (CD73) della membrana e trasportata all'interno da alcune specifiche proteine di membrana chiamate nucleotide transporters (hNTs).¹⁸ Gli hNTs e, in particolare, la proteina CNT3 sembra siano determinanti critici dell'omeostasi cellulare e importanti regolatori della farmacocinetica della F-ara-A. Varianti genetiche della CNT3 potrebbero essere alla base di alcuni meccanismi di resistenza al farmaco e della variabile tossicità, specie neurologica, osservata durante il trattamento.

L'attivazione della F-ara-A richiede la sua trasformazione in una forma trifosfata, cioè, la F-ara-ATP. Il processo di attivazione inizia per opera della deossicitidina chinasi (dCK). Molti degli enzimi implicati nella sintesi e nella riparazione del DNA (DNA polimerasi alfa, DNA primasi, DNA ligasi, ribonucleotide reduttasi e topoisomerasi II) sono coinvolti nei meccanismi d'azione della FLU, che ha effetto citotossico sia contro le cellule in fase di divisione sia contro quelle quiescenti.

Nelle cellule in fase S, la F-ara-ATP compete con deossadenosin-5O-trifosfato (dATP) per l'incorporazione nei siti dell'adenina del DNA, mediata dalla DNA polimerasi alfa. Una volta incorporata nella catena del DNA, la F-ara-ATP funziona da segnale di terminazione, producendo l'interruzione della sintesi dell'acido nucleico e la perdita di materiale genetico. La F-ara-ATP è anche un potente inibito-

re della ribonucleotide reduttasi e, perciò, produce la deplezione del pool intracellulare di dATP, che è essenziale sia per i processi di replicazione che di riparazione del DNA.³⁰⁻³²

Nelle cellule quiescenti, l'inibizione dei processi di riparazione del DNA appare il principale meccanismo della citotossicità. Innanzitutto, l'incorporazione della F-ara-ATP nel DNA, è resistente all'azione di escissione dei nucleotidi esercitata dalla esonucleasi associata alla DNA polimerasi. Poiché l'escissione è essenziale per la riparazione del DNA, si determina un danno irreversibile che porta all'apoptosi mediata dalla proteina p53 o dalla attivazione della poly-(ADP-ribosio)-polimerasi (PARP). In particolare, l'attivazione di PARP comporta il consumo della nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), che è il suo substrato, e la deplezione totale della dATP (con la quale si lega), con conseguente morte cellulare.

Numerosi altri meccanismi sono responsabili della citotossicità della FLU nelle cellule quiescenti. Ad esempio, la F-ara-ATP viene incorporata nel RNA compromettendo i processi di trascrizione e di sintesi delle proteine. Questa azione è anche potenziata dall'inibizione della RNA polimerasi e dal fatto che la F-ara-ATP è un potente attivatore dell'APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) che forma l'apoptosoma, interagendo con il citocromo C e la dATP. Questo, a sua volta, attiva le vie apoptotiche delle caspasi 9 e 3. Contribuisce a favorire l'apoptosi indotta dalla FLU, anche la downregolazione della sintesi della proteina anti-apoptotica Bcl-2.¹⁹

Farmacocinetica

Poiché la FLU ha una *clearance* plasmatica piuttosto rapida (2-4 minuti) non sono praticabili gli studi di farmacocinetica. È stato, invece, oggetto di numerosi trial clinici lo studio della farmacocinetica della F-ara-A (dopo FLU somministrata per via orale o sottocutanea o endovenosa, in bolo o infusione continua, da

sola o in associazione con altri chemioterapici).²⁰ Dopo la somministrazione endovenosa di dosi standard (25-30 mg/m², in infusione di 30 minuti per 5 giorni), si raggiunge una concentrazione plasmatica di F-ara-A di circa 3 µmol/L alla fine della prima infusione, con un ampio volume di distribuzione tissutale (44-96 l/m²). Al quinto giorno i livelli plasmatici aumentano di un fattore 2 (4,8 µmol/L) senza evidenza di accumulo in cicli successivi. La curva cinetica di eliminazione della F-ara-A è di tipo lineare con andamento trifasico. L'emivita iniziale è di circa 5 minuti, l'intermedia di 1-2 ore, la finale di circa 20 ore. La F-ara-A viene eliminata prevalentemente per via renale, anche mediante processi di escrezione e secrezione che coinvolgono l'azione delle hNTs delle cellule dell'epitelio renale.²¹ *In vitro* si lega poco alle proteine plasmatiche (<20%).

Anche se esiste un certo grado di variabilità individuale, la concentrazione della F-ara-ATP nelle cellule leucemiche raggiunge il picco di 20 µmol/L alla terza-quarta ora e declina monofasicamente con un t/2 di 15-23 ore. Considerato il picco plasmatico della F-ara-A, è evidente la tendenza all'accumulo nelle cellule target. E' stata inoltre dimostrata una correlazione lineare fra i livelli plasmatici di F-ara-A e di F-ara-ATP intracellulare.

Pazienti pediatrici

Gli studi di farmacocinetica sono scarsi e riguardano bambini affetti da leucemie refrattarie o tumori solidi.³⁴ Il farmaco è tuttavia largamente impiegato con lo stesso dosaggio utilizzato negli adulti, sia negli schemi di terapia convenzionale sia nel condizionamento pre-trapianto. In particolare, una recente rivalutazione dell'EBMT Paediatric Working Party ha riportato che la FLU fa parte di quasi tutti i regimi non mieloablativi impiegati nei bambini.²² È importante rilevare, inoltre, che un regime di condizionamento con FLU (120 mg/m²),

CY (1200 mg/m²) e ATG (15 mg/kg) ha prodotto risultati eccellenti in bambini di età inferiore ai 15 anni, affetti da aplasia midollare.²³

Interazioni farmacologiche

Numerosi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che la FLU ha un effetto sinergico o additivo, quando impiegata in combinazione con molti farmaci (CY, ara-C, melfalan, busulfano, idarubicina, anticorpi monoclonali, G-CSF). Ad esempio, è noto che la FLU modula il metabolismo cellulare dell'ara-C, potenziandone l'effetto antileucemico attraverso l'accumulo di Ara-CTP.⁴¹ Altre associazioni sono, invece, particolarmente tossiche. Quella con la pentostatina determina un rischio inaccettabile di danno polmonare severo.^{18,19}

Pazienti sottoposti a trapianto

La FLU e gli altri analoghi delle purine inibiscono i meccanismi di riparazione del danno del DNA indotto dagli agenti alchilanti, senza aumentarne la tossicità clinica.²⁵ Per tale motivo, la combinazione di un analogo delle purine con un alchilante è frequentemente impiegata per ottenere l'attecchimento del trapianto con una limitata tossicità extramidollare. Le dosi utilizzate nei vari regimi di condizionamento sono variabili (120-250 mg/m²) e sono somministrate in 4-5 giorni in infusione endovenosa di 30 minuti.²⁶⁻²⁸ È stata impiegata con successo anche la somministrazione per via orale.²⁹ Il profilo farmacocinetico sembra simile a quello descritto nei pazienti che ricevono una chemioterapia convenzionale. In particolare, non sono state riscontrate variazioni farmacocinetiche indotte dal busulfano, farmaco spesso associato alla FLU in regimi mieloablativi o RIC.³⁰ È importante notare che i regimi mieloablativi che includono FLU e busulfano, con quest'ultimo agente utilizzato per via endovenosa o per via orale, con aggiustamento della dose, hanno una tossicità tale da consentirne l'applicazione anche nei pazienti anziani.^{30,30}

Una complicanza tipica del trapianto allogenico, specie se eseguito con regimi di condizionamento intensivi e da donatore non familiare, è la microangiopatia trombotica.³² Contrariamente alle attese, la microangiopatia non è diminuita con l'uso di condizionamenti a intensità ridotta comprendenti la FLU, forse a causa del fatto che le cellule endoteliali sono uno specifico target per la tossicità del farmaco, mediato dalle CTL alloreattive.³³

Effetti immunologici

La FLU inibisce la risposta proliferativa dei linfociti ai mitogeni e agli alloantigeni.³⁴ L'effetto antiproliferativo e citotossico è prevalentemente diretto contro le cellule CD4⁺ e CD8⁺, che si dimostrano più sensibili alla FLU rispetto alle cellule CD20⁺. Nei pazienti con malattie linfoproliferative, infatti, i linfociti T si riducono del 90% dopo un singolo ciclo di FLU, mentre la riduzione delle cellule B è di circa il 50%.³⁵ Tutto ciò indica una preferenziale citotossicità verso i linfociti T che è responsabile dell'immunosoppressione e ha effetto sinergico con l'ATG e l'alemtuzumab nel promuovere l'attecchimento di CD34⁺, T-deplete *in vivo* o *ex vivo*, aploidentiche.^{36,37} C'è controversia su quale delle due popolazioni cellulari T sia più sensibile all'apoptosi indotta dal farmaco. Comunque, dopo esposizione *ex vivo* alla FLU, è stata osservata un'ampia variabilità dell'accumulo intracellulare di F-ara-ATP sia nei CD4⁺ (10,5 volte) sia nei CD8⁺ (12,5 volte) dei soggetti avviati al trapianto, rispetto a quella osservata nei soggetti normali (rispettivamente, 1,6 e 1,9 volte). La quantificazione dell'accumulo *ex vivo*, perciò, potrebbe costituire uno strumento per prevedere la sensibilità e/o la tossicità alla FLU *in vivo*.³⁸

È stato riportato che la FLU è in grado influire sulla produzione di numerose citochine e può sinergizzare con l'azione di alcune molecole immunoregatorie come l'interferone. Frank *et al.*³⁹ hanno per primi dimostrato che la

FLU inibisce nei mononucleati del sangue periferico il signal transducers and activator proteins 1 (STAT1), ma non gli altri componenti della famiglia degli STAT. Recentemente, tuttavia, è stato precisato che la FLU produce un alterato rapporto STAT1-alfa/STAT1-beta e che l'interferone gamma ha un effetto sinergico nel promuovere l'apoptosi.⁴⁰ Nishioka *et al.*⁴¹ hanno sottolineato il possibile ruolo del blocco del nuclear factor κ B (NF- κ B), fattore di trascrizione in grado di regolare l'espressione di molti geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e nell'inibizione dell'apoptosi. Il blocco di NF- κ B, fra l'altro, comporta l'arresto della produzione di citochine infiammatorie.

Che gli effetti della FLU non siano solo dipendenti dalla linfopenia e che debba essere considerato un farmaco in qualche modo immunomodulatore, deriva anche da alcune osservazioni cliniche. Per esempio, la riportata possibile insorgenza di anemia emolitica autoimmune potrebbe essere indicativa di uno squilibrio indotto dalla FLU fra le cellule B e le sottopopolazioni di cellule T. Un altro esempio è la possibile insorgenza di GVHD dopo trasfusione di sangue nei pazienti che ricevono FLU in programmi di chemioterapia convenzionale. Questa complicanza potrebbe essere il risultato dell'inibizione selettiva della capacità dei pazienti di eliminare le cellule alloreattive dei donatori di sangue.

Nell'ambito del trapianto l'azione immunomodulante della FLU potrebbe influenzare le APC e i monociti o avere un effetto polarizzante sui linfociti Th1 e Th2, producendo come risultato finale la riduzione dell'incidenza della GVHD acuta. In effetti, mentre nell'uomo i dati sull'incidenza della GVHD acuta sono non univoci, nei modelli animali è stata provata la capacità del farmaco di ridurre la GVHD e mantenere o, perfino, aumentare l'effetto GVM, tanto da suggerirne l'impiego sia come profilassi sia come terapia della

GVHD.⁴² In particolare, Giver *et al.*⁴³ hanno dimostrato che, rispetto ai non trattati, gli splenociti trattati *ex vivo* con FLU, oltre a favorire l'attecchimento delle cellule midollari allogene T-deplete, riducono l'incidenza e la severità della GVHD e mantengono l'effetto GVM. Il meccanismo suggerito a spiegazione della dissociazione fra GVHD e GVM è la resistenza alla FLU delle cellule T-memoria del donatore che potrebbero, insieme, non avere effetto GVHD e sostenere la GVM.

Conclusioni

Gli studi di farmacocinetica hanno chiarito molti aspetti della tossicità e fornito il razionale per un'ottimizzazione dell'uso di alcuni farmaci impiegati nei condizionamenti. Considerata l'ampia variabilità individuale del suo metabolismo, la CY è uno degli agenti per il quale maggiormente si avverte la necessità di poterne determinare i livelli plasmatici (o quello dei suoi metaboliti tossici, come ad esempio il CERM) al fine di ridurne la tossicità. Purtroppo, questa possibilità è ancora più teorica che reale a causa della laboriosità e complessità dei metodi di monitoraggio farmacologico. Sono state, difatti, riportate solo rare seppur promettenti esperienze pratiche di aggiustamento delle dosi della CY.^{2,3,44} Vi è inoltre il problema della definizione dei livelli plasmatici ottimali da raggiungere non essendo disponibili trial di fase III che abbiano studiato le relazioni fra livelli plasmatici/efficacia o livelli plasmatici/tossicità. Al momento, perciò, nella pratica clinica la misurazione dei parametri cinetici ha un'utilità marginale per l'individualizzazione della posologia. Meno complicato è, invece, l'aggiustamento delle dosi dei farmaci impiegati in associazione con la CY, come il busulfano.⁴⁵

Un approccio alternativo per diminuire la tossicità della CY è di ridurne in tutti i pazien-

ti la dose di somministrazione, soprattutto quando essa è associata ad agenti con tossicità sinergica o additiva; ciò potrebbe però portare a mancati attecchimenti e ad un maggior rischio di recidiva.

Un terzo approccio, che al momento ha la maggiore diffusione, è di sostituire la CY con farmaci, come la FLU, con caratteristiche di minore tossicità ma comparabile, se non maggiore, attività immunosoppressiva ed antineoplastica.^{2,31}

Bibliografia

1. Lake RA, Robinson BW. Immunotherapy and chemotherapy a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 2005;5:397-405.
2. McDonald GB, Slattery JT, Bouvier ME, et al. CY metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;101:2043-8.
3. de Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:1135-64.
4. Zhang J, Tian Q, Zhou S. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Curr Drug Therapy* 2006;1:55-84.
5. Chabner BA et al. Antineoplastic agents. In Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th ed. J Brunton LL, Lazo JS, and Parker KL, eds New York, NY: McGraw Hill 2006;1322-8.
6. Mouridsen HT, Faber O, Skovsted L. The metabolism of cyclophosphamide. Dose dependency and the effect of long-term treatment with cyclophosphamide. *Cancer* 1976;37:665-70.
7. Nieto Y, Xu X, Cagnoni PJ, et al. Nonpredictable pharmacokinetic behavior of high-dose cyclophosphamide in combination with cisplatin and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Clin Cancer Res* 1999;5:747-51.
8. Chen TL, Passos-Coelho JL, Noe DA, et al. Nonlinear pharmacokinetics of cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer receiving high-dose chemotherapy followed by autologous bone marrow transplantation. *Cancer Res* 1995;55:810-6.
9. Ren S, Slattery JT. Inhibition of carboxyethylphosphoramide mustard formation from 4-hydroxycyclophosphamide by carmustine. *AAPS Pharm Sci* 1999;1:E14.
10. Nakajima M, Komagata S, Fujikia Y, et al. Genetic polymorphisms of CYP2B6 affects the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. *Pharmacogen Genom* 2007;7:431-45.
11. Yule SM, Boddy AV, Cole M, et al. Cyclophosphamide pharmacokinetics in children. *Br J Clin Pharmacol* 1996;41:13-9.
12. Yule SM, Price L, Cole M, et al. Cyclophosphamide metabolism in children with Fanconi's anaemia. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:123-8.
13. Yule SM, Price L, McMahon AD, et al. Cyclophosphamide metabolism in children with non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:455-60.
14. Iwai T, Tomita Y, Okano S, et al. Regulatory roles of NKT cells in the induction and maintenance of cyclophosphamide-induced tolerance. *J Immunol* 2006;177:8400-

- 9.
15. Motoyoshi Y, Kaminoda K, Saitoh O, et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Onc Rep* 2006;16:141-6.
16. Brodsky RA, Luznik L, J Bolanos-Meade J, et al. Reduced intensity: HLA-haploidentical BMT with post transplantation cyclophosphamide in nonmalignant hematologic diseases. *Bone Marrow Transplant* 14 July 2008, advance online publication.
17. Montgomery JA, Hewson K. Nucleosides of 2-fluoroadenine. *J Med Chem* 1969;12:498-504.
18. Gandhi V, Plunkett W. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:93-103.
19. Montillo M, Ricci F, Tedeschi A. Role of fludarabine in hematological malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6:1141-61.
20. Kuo GM, Boumpas DT, Illei GG, et al. Fludarabine pharmacokinetics after subcutaneous and intravenous administration in patients with lupus nephritis. *Pharmacotherapy* 2001;21:528-33.
21. Elwi AN, Damaraju VL, Baldwin SA, et al. Renal nucleoside transporters: physiological and clinical implication *Biochem Cell Biol* 2006;84:844-58.
22. Yaniv I and Stein J on behalf of the EBMT Paediatric Working Party. Reduced-intensity conditioning in children: a reappraisal in 2008. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:S18-S22.
23. Bacigalupo A, Locatelli F, Lanino E, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and antithymocyte globulin for alternative donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a report from the EBMT-SAA Working Party. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:947-50.
24. Ahlmann M, Lanvers C, Lumkemann K, et al. Modulation of ara-CTP levels by fludarabine and hydroxyurea in leukemic cells. *Leukemia* 2001;15:69-73.
25. Li L, Liu X, Glassman AB, et al. Fludarabine triphosphate inhibits nucleotide excision repair of cisplatin-induced DNA adducts in vitro. *Cancer Res* 1997;57:1487-94.
26. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91:756-63.
27. Giralt S. Reduced-intensity conditioning regimens for hematologic malignancies: what have we learned over the last 10 years? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005, 384-9.
28. Russell JA, Tran HT, Quinlan D, et al. Once-daily intravenous busulfan given with fludarabine as conditioning for allogeneic stem cell transplantation: study of pharmacokinetics and early clinical outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:468-76.
29. von dem Borne PA, Starrenburg CW, Barge RM, et al. Comparable engraftment and chimerism kinetics using oral and intravenous fludarabine as part of a reduced intensity conditioning regimen *Bone Marrow Transplant* 2008;42:137-8.
30. M Bonin, S Pursche, T Bergeman, et al. F-ara-A pharmacokinetics during reduced-intensity conditioning therapy with fludarabine and busulfan. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:201-6.
31. Russell JA, Duan Q, Chaudhry MA, et al. Transplantation from matched siblings using once-daily intravenous busulfan/fludarabine with thymoglobulin: A myeloablative regimen with low nonrelapse mortality in all but older patients with high-risk disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:888-95.
32. Iacopino P, Pucci G, Arcese W, et al. Severe thrombotic microangiopathy: an infrequent complication of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:47-51.
33. Eissner G, Multhoff G, Gerbitz A, et al. Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. *Blood* 2002;100:334-40.
34. Cheson BD. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13:2431-48.
35. Dighiero G. Potential immunological action of purine nucleoside analogues. *Drugs* 1994;47(Suppl. 6):57-62.
36. 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. *New Engl J Med* 1998;339:1186-93.
37. Rizzieri DA, Piu Koh L, Long GD et al. Partially matched, nonmyeloablative allogeneic transplantation: clinical outcomes and immune reconstitution. *J Clin Oncol* 2007;25:690-7.
38. Woodahl EL, Wang J, Heimfeld S, et al. A novel phenotypic method to determine fludarabine triphosphate accumulation in T-lymphocytes from hematopoietic cell transplantation patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008 Apr 9, advance online publication.
39. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nat Med* 1999;5:444-7.
40. Baran-Marszak F, Feuillard J, Najjar I, et al. Differential roles of STAT1-alpha and STAT1-beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells. *Blood* 2004;104:2475-83.
41. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, et al. Fludarabine induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type 1-infected T cells via inhibition of the nuclear factor- κ B signal pathway. *Leukemia* 2007;21:1044-9.
42. Aksoya S, Abalib H, Kilickapa S, et al. Fludarabine phosphate may be useful in the treatment of graft-versus-host disease. *Med Hypoth* 2005;64:1150-2.
43. Giver CR, Montes RO, Mittelstaedt S, et al. ex vivo fludarabine exposure inhibits graft-versus-host-reactivity of allogeneic T cells while preserving graft-versus-leukemia effects. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:616-32.
44. Salinger DH, McCune JS, Ren AG, et al. Real-time dose adjustment of cyclophosphamide in a preparative regimen for hematopoietic cell transplant: a bayesian pharmacokinetic approach. *Clin Cancer Res* 2006;12:4888-98.
45. McCune SJ, Batchelder A, Deeg HJ, et al. Cyclophosphamide following targeted oral busulfan as conditioning for hematopoietic cell transplantation: pharmacokinetics, liver toxicity, and mortality. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:853-62.