

Original Article

Immunoterapia adottiva mediante Infusione di Linfociti da Donatore (DLI) dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche e monitoraggio del chimerismo

Adoptive immunotherapy by Donor Lymphocyte Infusion (DLI) after allogeneic Hematopoietic Stem Cell transplantation and chimerism monitoring

Camilla Zani¹, Roberta Neri², Giuseppina Balza², Maria Grazia Verri², Marika Cagnati², Manuela Arata², Francesco Zallio³, Paolo Rivela³, Thea Bensi⁴, Mauro Patrone^{1,5}, Lia Mele^{2,6}

¹Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica (DiSIT), Università del Piemonte Orientale, Alessandria; ²SC Medicina Trasfusionale-laboratorio di Processazione CSE, AO “SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo”, Alessandria; ³SC Ematologia, AO “SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo”, Alessandria; ⁴SC Laboratorio Analisi, Settore di Citofluorimetria, AO “SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo”, Alessandria; ⁵Laboratorio integrato ricerca preclinica, SSD Laboratori di ricerca, Dipartimento Attività Integrate Ricerca Innovazione, Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria; ⁶SSD Laboratori di ricerca, Dipartimento Attività Integrate Ricerca Innovazione, Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria, Italy

Key words: chimerismo, linfociti, trapianto di cellule staminali emopoietiche.

ABSTRACT

Obiettivi: il trapianto allogenico di Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE) è un importante trattamento per i pazienti affetti da patologie ematologiche in quanto può indurne la remissione; tuttavia, la recidiva di malattia è una delle cause più importanti di fallimento. L’immunoterapia adottiva rappresenta un nuovo approccio terapeutico contro i tumori ematologici, affiancandosi e a volte sostituendosi alle terapie tradizionali, quali chemioterapia e radioterapia. L’Infusione di Linfociti da Donatore (DLI), ovvero l’infusione di linfociti dello stesso donatore allogenico di CSE, rientrano all’interno di tale terapia in quanto hanno lo scopo di ripristinare le capacità difensive del sistema immunitario, rappresentando una possibilità di cura per il paziente. Presso il settore di Processazione CSE della SC Medicina Trasfusionale dell’Azienda Ospedaliera Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria, è stato eseguito uno studio retrospettivo in pazienti ematologici trapiantati, afferenti alla SC Ematologia, allo scopo di valutare se il monitoraggio del chimerismo, eseguito su sangue periferico, linea linfoide, linea mieloide e midollo osseo pre e post infusione di DLI potesse dare informazioni al clinico circa l’efficacia dell’immunoterapia adottiva.

Materiali e Metodi: lo studio del chimerismo è stato effettuato mediante *Polymerase Chain Reaction – Short Tandem Repeats* (PCR-STR). Tale tecnica utilizza polimorfismi genici, gli STR, ripetizioni in tandem di piccole sequenze nucleotidiche che si ripetono n volte. Si individuano tre differenti situazioni: i) chimerismo completo, le cellule del donatore sono >90%; ii) chimerismo misto, coesistenza nel ricevente delle proprie cellule e di quelle del donatore presenti in un intervallo che va dal 20-85%; iii) chimerismo assente, ricostituzione emopoietica autologa, cellule del donatore <20%.

Risultati: una prima analisi dei dati evidenzia che la distribuzione dei pazienti all’interno delle varie patologie risulta essere disomogenea. Si è quindi ritenuto di raggruppare i pazienti in base alla patologia ematologica di appartenenza. Nei pazienti affetti da Leucemia Mieloide Acuta (LMA) i dati ottenuti mostrano che 14 (54%) sono deceduti a causa di complicanze nonostante l’infusione di DLI. I restanti 12 pazienti mostrano un tasso di sopravvivenza del 46%. Nei pazienti affetti da Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) i dati raccolti evidenziano che 4 pazienti risultano deceduti con un tasso di mortalità pari al 50%. I restanti pazienti mostrano un tasso di sopravvivenza del 50%. Nei pazienti affetti dalle restanti patologie Linfoma di non Hodgkin (LNH), Mielodisplasia (MDS), Linfoma di Hodgkin (LH), Mieloma Multiplo (MM), Leucemia Linfoblastica Cronica (LLC). È possibile, quindi, osservare come anche nel caso di questo gruppo di patologie, la percentuale di mortalità è del 50%. I restanti pazienti mostrano un tasso di sopravvivenza del 50%. Dei 47 pazienti, 34 (72%) non hanno sviluppato *Graft versus Host Disease* (GvHD) post DLI, mentre 13 (28%) hanno sviluppato GvHD cronica o acuta.

Conclusioni: i nostri dati concordano con quelli presenti in letteratura che riportano come, dopo infusione di DLI, la remissione si attesti intorno al 15-42% per le LMA e tra il 40-60% per le LLA, mentre il tasso di mortalità sul 50% per entrambe. Per quanto riguarda le restanti patologie abbiamo osservato che nei 13 pazienti presi in esame, la percentuale di mortalità è del 50%, equiparabile al tasso di sopravvivenza. In questo gruppo di patologie, il ruolo dei DLI in letteratura, non è chiaro. Per quanto riguarda lo sviluppo di GvHD post DLI in letteratura si aggira intorno al 50-60% dei pazienti; i nostri dati mostrano un valore inferiore che si attesta intorno al 28% per quanto riguarda tutte le patologie prese in esame. L'analisi dei dati raccolti, sebbene la dimensione del campione sia ridotta e siano presenti numerose variabili ad esso correlate, ci permette comunque di confermarne l'aderenza ai lavori presenti in letteratura. Pensiamo quindi che l'infusione di DLI sia un'importante arma terapeutica all'interno delle strategie di cura a disposizione dell'ematologo.

Objectives: the allogeneic Hematopoietic Stem Cell (HSC) transplant is an important treatment for patients suffering from hematological diseases as it can induce remission; however, disease recurrence is one of the most important causes of failure. Adoptive immunotherapy represents a new therapeutic approach against hematological cancers, alongside and sometimes replacing traditional therapies, such as chemotherapy and radiotherapy. The Donor Lymphocyte Infusion (DLI), or the infusion of lymphocytes from the same allogeneic HSC donor, is part of this therapy as they are intended to restore the defensive capabilities of the immune system, representing a possibility of a cure for the patient. A retrospective study in transplanted hematological patients, related to the SC of Hematology, was performed at the HSC Processing Facility of the SC Transfusion Medicine of the Santi Antonio e Biagio and Cesare Arrigo Hospital of Alessandria, in order to evaluate whether the monitoring of chimerism, performed on Peripheral Blood (PB), Lymphoid Line (L), Myeloid Line (M) and Bone Marrow (BM) pre- and post-infusion of DLI could inform the clinician about the efficacy of adoptive immunotherapy.

Materials and Methods: the efficacy of DLI has been evaluated through the study of the monitoring of chimerism, which uses the Polymerase Chain Reaction – Short Tandem Repeats (PCR-STR) technique. This technique uses gene polymorphisms, STR, tandem repetitions of small nucleotide sequences that are repeated n times. There are three different situations: i) complete chimerism, donor cells are >90%; ii) mixed chimerism, coexistence in the recipient of own cells and those of the donor present in a range from 20% to 85%; iii) chimerism absent, autologous hemopoietic reconstitution, donor cells <20%.

Results: a first analysis of the data shows that the distribution of patients within the various pathologies is uneven. It was therefore considered to divide patients according to the hematological pathology to which they belong. In patients with Acute Myeloid Leukemia (AML), the data obtained shows that 14 (54%) died due to complications despite the Donor Lymphocytes Infusion (DLI). The remaining 12 patients show a 46% survival rate. In Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) patients, the collected data shows that 4 patients died with a mortality rate of 50%. The remaining patients show a 50% survival rate in patients suffering from the remaining pathologies (Non-Hodgkin Lymphoma (NHL), Myelodysplasia (MDS), Hodgkin Lymphoma (HL), Multiple Myeloma (MM), and Chronic Lymphoblastic Leukemia (CLL)). It is possible, therefore, to observe how, even in the case of this group of pathologies, the mortality rate is 50%. The remaining patients show a 50% survival rate. Of the 47 patients, 34 (72%) didn't develop Graft versus Host Disease (GvHD) post-DLI, while 13 (28%) developed chronic or acute GvHD.

Conclusions: our data agree with those in the literature that report how, after infusion of DLI, remission is around 15-42% for AML and between 40-60% for ALL, while the mortality rate is 50% for both. As for the remaining diseases, we observed that in the 13 patients examined, the mortality rate is 50%, comparable to the survival rate. In this group of pathologies, the role of DLI, in the literature is unclear. As for the development of GvHD post-DLI in the literature, it is around 50-60% of patients; our data show a lower value of around 28% for all the pathologies examined. The analysis of the collected data, although the size of the sample is small and there are many variables related to it, allows us to confirm its adherence to the works in the literature. We, therefore, think that the infusion of DLI is an important therapeutic weapon within the treatment strategies available to the hematologist.

INTRODUZIONE

Il trapianto allogenico di Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE) è un importante trattamento per i pazienti affetti da patologie ematologiche in quanto può indurre la remissione in seguito agli effetti combinati della citotossicità del regime di condizionamento e della *Graft versus Leukemia* (GvL).¹

L'effetto GvL consiste in una reazione immunologica sostenuta dalle cellule immunocompetenti del donatore che riconoscono come estranee, e per questo attaccano, le cellule leucemiche residue presenti nel ricevente. I linfociti T riconoscono le cellule neoplastiche attraverso l'interazione tra il loro recettore e le molecole del sistema maggiore di istocompatibilità presenti sulla superficie cel-

lulare delle cellule neoplastiche. È chiaro che i linfociti T esercitano il più potente effetto antileucemico clinicamente rilevante. Quindi il sistema immunitario del donatore contribuisce alla guarigione del paziente esercitando una sorveglianza immunologica (*Figura Supplementare 1*).²

La recidiva di malattia rappresenta però una delle cause più importanti di fallimento del trapianto e, l'immunoterapia adottiva, intesa come infusione di linfociti dello stesso donatore allogenico, può rappresentare una possibilità di cura evitando al paziente un secondo trapianto allogenico.³

L'azione immunitaria promossa dai linfociti T (effetto GvL) viene sfruttata infondendo quelli dello stesso donatore allogenico di CSE. Tale metodo di intervento ha la capacità di migliorare l'azione

del trapianto contro la patologia ematologica di cui il paziente è affetto e, in un paziente in remissione completa, ridurre il rischio di ricaduta se presente un chimerismo misto.⁴

I linfociti utilizzati per Infusione di Linfociti da Donatore (DLI) vengono ottenuti mediante una procedura chiamata “leucoferesi” utilizzando un separatore cellulare.

Il clinico può quindi valutare se richiedere l’infusione di linfociti dello stesso donatore allogeneico di CSE allo scopo di migliorare la GvL e ridurre la *Graft versus Host Disease* (GvHD), sulla base dei seguenti criteri: i) in relazione a quanto tempo è passato tra il trapianto allogeneico e la ricaduta; ii) in presenza di ricaduta molecolare; iii) se la presenza di blasti è <20% (ricaduta ematologica); iv) in relazione alla presenza di comorbidità; v) in presenza di *Human Leukocyte Antigen* (HLA) loss.⁴

Lo studio del chimerismo su sangue periferico, midollo osseo, linea linfoide e mieloide, e il suo monitoraggio, calendarizzato in accordo con il clinico, può essere utilizzato sia nel periodo post trapianto allogeneico, al fine di predire la ricaduta o l’imminente perdita di attecchimento, indirizzandolo verso una corretta terapia di intervento, tra cui l’infusione di linfociti, sia nel periodo seguente l’infusione di DLI, al fine di verificarne l’efficacia terapeutica

L’analisi di chimerismo si effettua mediante *Polymerase Chain Reaction – Short Tandem Repeats* (PCR-STR). Tale tecnica utilizza polimorfismi genici, gli STR, ripetizioni in tandem di piccole sequenze nucleotidiche che si ripetono n volte.^{5,6}

Si individuano tre differenti situazioni: i) chimerismo completo, le cellule del donatore sono >90%; ii) chimerismo misto, coesistenza nel ricevente delle proprie cellule e di quelle del donatore presenti in un intervallo che va dal 20% al 85%; iii) chimerismo assente, ricostituzione emopoietica autologa, cellule del donatore <20%.

In particolar modo ciò che si vuole ottenere post trapianto è il raggiungimento del chimerismo completo dei linfociti T del donatore, poiché il mancato raggiungimento potrebbe contribuire ad un maggior rischio di ricaduta della malattia.

La probabilità che si ha di raggiungere il chimerismo completo dei linfociti T al 30° e 90° giorno post trapianto è pari al 55% e 71%, mentre per quanto riguarda il chimerismo mieloide completo le percentuali sono del 99,5% e del 93,5%.

I fattori avente un ruolo nel determinare la percentuale di attecchimento, ovvero di chimerismo dei linfociti T, sono, a 30 giorni:

- tipo di donatore (aploidentico 100%, MRD 39%, MUD 47%);
- diagnosi (AML 58%, ALL 60%, MDS/MPS/LMC 35%, NHL/HL/CLL 90%);
- regime di condizionamento.

I fattori avente un ruolo nel determinare la percentuale di attecchimento, ovvero di chimerismo dei linfociti T, sono, a 90 giorni:

- tipo di donatore (aploidentico 100%, MRD 56%, MUD 70%);
- diagnosi (LMA 76%, ALL 77%, MDS/MPS/LMC 49%, NHL/HL/CLL 100%);
- regime di condizionamento.

L’approccio in caso di mancato chimerismo completo dei linfociti T del donatore entro 90 giorni prevede: la sospensione della terapia immunosoppressiva in assenza di GvHD attiva se il chimerismo dei linfociti è maggiore del 50%, mentre si somministrano DLI (a partire da 1×10^6 cellule CD3+/kg) nei pazienti che presentano un chimerismo CD3+<50%.⁷ Si parla di chimerismo misto quando si ha invece la coesistenza dell’emopoiesi del

paziente e del donatore dopo il trapianto. Il chimerismo misto può però essere convertito a completo riducendo, sino a sospendere, la terapia immunosoppressiva e, in casi più estremi, nei quali la sospensione non funziona, è possibile intervenire attraverso una reinfusione di DLI.

L’analisi del chimerismo fornisce, quindi, un’informazione sull’alloreattività e/o sull’induzione della tolleranza al trapianto, per questo serve più probabilmente come un fattore prognostico piuttosto che come marker indiretto di malattia minima residua.⁸

Scopo del lavoro

Presso il settore di Processazione CSE della SC Medicina Trasfusionale dell’Azienda Ospedaliera Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria, è stato eseguito uno studio retrospettivo in pazienti ematologici trapiantati, afferenti alla SC Ematologia, allo scopo di valutare se il monitoraggio del chimerismo, eseguito su sangue periferico, linea linfoide, linea mieloide e midollo osseo pre e post infusione di DLI potesse dare informazioni al clinico circa l’efficacia dell’immunoterapia.

Lo studio si è svolto nel periodo intercorso da agosto 2021 a luglio 2022. È stato osservato un campione composto da 47 pazienti, di cui 30 (64%) maschi e 17 (36%) femmine, con un’età media di 49 anni in una fascia d’età dai 20-71 anni.

I pazienti presentavano le seguenti patologie ematologiche (*Figura Supplementare 2*):

- Leucemia Mieloide Acuta (LAM): 26 (55%) pazienti;
- Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA): 8 (17%) pazienti;
- Linfoma di Hodgkin (LH): 2 (4%) pazienti;
- Linfoma di non Hodgkin (LNH): 4 (9%) pazienti;
- Mieloma Multiplo (MM): 3 (7%) pazienti;
- Mielodisplasia (MDS): 3 (6%) pazienti;
- Leucemia Linfoblastica Cronica (LLC): 1 (2%) paziente.

Dei 47 pazienti, 24 (51%) sono stati trapiantati con un donatore *Marrow Unrelated Donor* (MUD), i restanti 23 (49%) hanno, invece, ricevuto un trapianto da donatore familiare (*related*). L’età media dei pazienti trapiantati con donatore MUD era di 54 anni, mentre quelli trapiantati con un familiare era di 46 anni. In seguito a ricaduta, prima dell’infusione di DLI, i pazienti appartenenti al campione in esame hanno ricevuto la somministrazione di terapie appartenenti a tre differenti classi di farmaci: chemioterapia, target therapy, immunoterapia.

Le cellule del donatore (DLI) erano raccolte mediante leucoferesi. Tutti i pazienti ricevevano la prima dose fresca (mediamente 1×10^5 /Kg- 1×10^6 /Kg). Le altre dosi venivano criopreservate con plasma autologo e Dimetilsolfossido (DMSO). L’infusione delle dosi successive, a scalare, dipendeva dal livello di *match* HLA e dalla storia di GvHD del paziente. Nel seguente studio, il monitoraggio del chimerismo è stato eseguito analizzando, ove possibile, tutte le quattro linee: sangue periferico, linea linfoide, linea mieloide, midollo osseo.

MATERIALI E METODI

Selezione immunomagnetica per la separazione delle linee cellulari linfoide e mieloide

La metodica immunomagnetica utilizzata per la selezione cellulare linfoide e mieloide (EasySep™) sfrutta un cocktail di compless-

si tetramericici di Ab (TACs) e particelle magnetiche rivestite di destrano. I TACs legano alle particelle magnetiche le cellule che esprimono sulla loro superficie specifici antigeni, quali CD3+ e CD19+ per la linea linfoide e CD33 e CD66b per la linea mieloide. In particolare, l'antigene CD3 è espresso sui linfociti T e sulle cellule natural killer, l'antigene CD19 sui linfociti B e sulle cellule follicolari dendritiche, mentre gli antigeni CD33 e CD66b sulla superficie dei progenitori mieloidi, sui granulociti e sui monociti (*Figura Supplementare 3*).⁵

Analisi citofluorimetrica

L'analisi citofluorimetrica è stata utilizzata per la valutazione della purezza delle linee linfoidi e mieloide (*Figura Supplementare 4*, *Figura Supplementare 5*).

Estrazione del DNA (MAXWELL 16 SYSTEM)

La seguente tecnica sfrutta come strumento l'estrattore automatico Maxwell 16 System con il Kit Maxwell 16 Blood DNA Purification System.

Studio degli Short Tandem Repeats mediante MULTIPLEX-PCR

Il kit utilizzato per l'analisi STR è il PowerPlex 16 HS System, definito come test multiplex di STR. Questo kit permette di co-amplificare 15 STR loci e l'amelogenina (marcatore genetico del sesso) in una sola reazione di PCR, sfruttando quattro sistemi a fluorescenza per l'analisi automatizzata dei frammenti di DNA. I DNA del ricevente e del donatore vengono analizzati al primo controllo per determinare i profili STR "basali". Assieme ai campioni di interesse durante l'analisi vengono anche testati assieme un controllo positivo (CP, Control DNA del kit oppure un DNA con profilo STR noto) e un controllo negativo (CN, acqua per biologia molecolare).

Sequenziamento

Il processo di acquisizione dei dati dell'elettroforesi capillare, eseguita mediante l'uso di un sequenziatore, permette solo di visualizzare gli alleli sotto forma di picchi di un elettroferogramma. L'informazione contenuta nei vari picchi deve essere convertita in profilo genetico (genotipizzazione), vale a dire che ad ogni locus presente in un campione deve essere assegnato un allele (in caso di omozigosi) o due alleli (in caso di eterozigosi). La conversione dell'elettroferogramma in profilo genico viene effettuata mediante il software ChimerMarker.

RISULTATI

Una prima analisi dei dati evidenzia che la distribuzione dei 47 pazienti all'interno delle varie patologie risulta essere disomogenea. Si è quindi ritenuto di raggruppare i pazienti in base alla patologia ematologica di appartenenza, individuando così 3 macrogruppi:

Gruppo 1, Leucemia Acuta Mieloide (LAM)

I 26 pazienti affetti da LAM, 16 (62%) maschi e 10 (38%) femmine, hanno un'età compresa tra i 22 e i 71 anni. L'analisi di chimerismo effettuata su sangue periferico, linea linfoide, linea mieloide e midollo osseo dei pazienti dopo il trapianto ha evidenziato:

- chimerismo completo: 14 (54%) pazienti;
- chimerismo misto: 11 (42%) pazienti;
- assenza di chimerismo: 1 (4%) paziente.

Di 26 pazienti totali abbiamo preso ad esempio 5 casi esemplificativi (*Figura Supplementare 6*).

I dati ottenuti mostrano che 14 pazienti (54%) sono deceduti a causa di complicanze come GvHD o recidiva di malattia, nonostante la DLI.

I restanti 12 pazienti mostrano un tasso di sopravvivenza del 46%. Osservando il follow up dei pazienti seguiti, inteso come intervallo di tempo dalla data del trapianto all'ultimo chimerismo osservato, è stata calcolata una sopravvivenza media di 28 mesi (*Figura Supplementare 7*).

Gruppo 2, Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA)

Gli 8 pazienti affetti da LLA, 5 (63%) maschi e 3 (37%) femmine, hanno un'età compresa tra i 20 e i 62 anni. L'analisi di chimerismo effettuata su sangue periferico, linea linfoide, linea mieloide e midollo osseo dei pazienti dopo il trapianto ha evidenziato:

- chimerismo completo: 6 (75%) pazienti;
- chimerismo misto: 2 (25%) pazienti.

Degli 8 pazienti totali, anche in questo caso, abbiamo preso ad esempio 5 casi esemplificativi (*Figura Supplementare 8*).

Dai dati raccolti si osserva che 4 pazienti risultano deceduti con un tasso di mortalità pari al 50%. I restanti pazienti mostrano un tasso di sopravvivenza del 50%. Osservando il follow up dei pazienti seguiti è stata calcolata una sopravvivenza media di 35 mesi (*Figura Supplementare 9*).

Gruppo 3, LNH, MDS, LH, MM, LLC

I 13 pazienti affetti da LNH, MDS, LH, MM, LLC, 9 (69%) maschi e 4 (31%) femmine, hanno un'età compresa tra i 30 e i 71 anni. L'analisi di chimerismo effettuata su sangue periferico, linea linfoide, linea mieloide e midollo osseo dei pazienti dopo il trapianto ha evidenziato (*Figura Supplementare 10*):

Mieloma Multiplo (MM)

- chimerismo completo: 2 (67%) pazienti;
- chimerismo misto: 1 (33%) paziente.

Linfoma non Hodgkin (LNH)

- chimerismo completo: 2 (50%) pazienti;
- chimerismo misto: 2 (50%) pazienti.

Linfoma di Hodgkin (LH)

- chimerismo completo: 2 (100%) pazienti.

Leucemia Linfoblastica Cronica (LLC)

- chimerismo misto: 1 (100%) paziente.

Mielodisplasia (MDS)

- chimerismo completo: 2 (67%) pazienti;
- chimerismo misto: 1 (33%) paziente.

È possibile, quindi, osservare come anche nel caso di questo gruppo di patologie, la percentuale di mortalità è del 50%. I restanti pazienti mostrano un tasso di sopravvivenza del 50%. Osservando il follow up dei pazienti seguiti è stata calcolata una sopravvivenza media di 35 mesi (*Figura Supplementare 11*).

CONCLUSIONI

Il trapianto allogenico di CSE è un importante trattamento per i pazienti affetti da patologie ematologiche in quanto può indurre la remissione. Tuttavia, la recidiva di malattia rappresenta una delle cause più importanti di fallimento del trapianto. In alcuni pazienti, l'immunoterapia, intesa come infusione di DLI dello stesso donatore allogenico, può rappresentare una possibilità di cura evitando un secondo trapianto allogenico. Tale metodo di intervento ha la capacità di migliorare l'azione del trapianto contro la patologia ematologica di cui il paziente è affetto e, in un paziente in remissione completa, ridurre il rischio di ricaduta se presente un chimerismo misto.

I nostri dati concordano con quelli presenti in letteratura che riportano come, dopo infusione di DLI, la remissione si attesti intorno al 15-42% per le LAM e tra il 40-60% per le LLA, mentre il tasso di mortalità sul 50% per entrambe.⁹ Per quanto riguarda le restanti patologie abbiamo osservato che nei 13 pazienti presi in esame, la percentuale di mortalità è del 50%, equiparabile al tasso di sopravvivenza. Osservando il follow up di questi pazienti è stata calcolata una sopravvivenza media di 35 mesi. In questo gruppo di patologie, il ruolo dei DLI, in letteratura,⁹ non è chiaro. Si può considerare un'opzione valida al fine di offrire ai pazienti una possibilità terapeutica di remissione.

Per quanto riguarda lo sviluppo di GvHD post DLI, presente in letteratura^{9,10} intorno al 50-60% dei pazienti, i nostri dati mostrano un valore inferiore, che si attesta intorno al 28% per quanto riguarda tutte le patologie prese in esame. Non abbiamo osservato nessuna correlazione tra insorgenza di GvHD e miglioramento della malattia.

L'analisi dei dati raccolti, sebbene la dimensione del campione sia ridotta e siano presenti numerose variabili ad esso correlate, ci permette comunque di confermarne l'aderenza ai lavori presenti in letteratura. Pensiamo quindi che l'infusione di DLI sia un'importante arma terapeutica all'interno delle strategie di cura a disposizione dell'ematologo per i pazienti che presentano una recidiva di malattia dopo trapianto di CSE. La risposta migliore si osserva nelle LMC e nelle LLC seguito dai linfomi, dal MM e dalla LLA.

Il futuro dell'immunoterapia è rivolto all'utilizzo dei linfociti T ingegnerizzati, CAR-T, dall'acronimo inglese *Chimeric Antigen Receptor T cell therapies* ovvero "Terapie a base di cellule T esprimenti un Recettore Chimerico per antigene" ad oggi riservata ad un numero limitato di pazienti e di patologie ematologiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, et al. Williams Hematology. Mc Graw Hill Education, 2016.
2. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front. Oncol.* 2019;9:1217.
3. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96:2712.
4. Negrin RS. Immunotherapy for the prevention and treatment of relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation. 2022. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/immunotherapy-for-the-prevention-and-treatment-of-relapse-following-allogeneic-hematopoietic-cell-transplantation>
5. Clark JR, Scott SD, Jack AL, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT): technical recommendations for the use of short tandem repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for leukocyte immunophenotyping chimerism working group. *British Journal of Haematology.* 2015;168:26-37.
6. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.* Elsevier Academic Press, San Diego, USA. 2012.
7. Solomon SR, Sizemore CA, Zhang X, et al. Preemptive DLI without withdrawal of immunosuppression to promote complete donor T-cell chimerism results in favorable outcomes for high-risk older recipients of alemtuzumab-containing reduced-intensity unrelated donor allogeneic transplant: a prospective phase II trial. *Bone Marrow Transplantation.* 2014;49:616-21.
8. Bader P, Niethammer D, Willasch A, et al. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation.* 2005;35:107-19.
9. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treatment Reviews.* 2010;36:528.
10. Loren AW, Porter DL. Donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation.* 2008;41:483-93.

Materiale supplementare online:

Figura Supplementare 1. Rappresentazione degli effetti post trapianto GvL e GvHD.

Figura Supplementare 2. Patologie dei pazienti in studio.

Figura Supplementare 3. Legame tra Ag-Ab marcato da particella magnetica.

Figura Supplementare 4. Purezza linea linfoide; in rosso popolazione linfocitaria separata e in grigio i pochi neutrofili residui. Positività osservata sopra 10².

Figura Supplementare 5. Purezza linea mieloide popolazione maggiormente rappresentata costituita da neutrofili, a sx eosinofili e in basso a dx monociti. Positività osservata sopra 10².

Figura Supplementare 6. A) Casi significativi Leucemia Mieloide Acuta (LAM). B) Legenda.

Figura Supplementare 7. A) Sopravvivenza Leucemia Acuta Mieloide (LAM). B) Legenda.

Figura Supplementare 8. Casi significativi Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA).

Figura Supplementare 9. Sopravvivenza Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA).

Figura Supplementare 10. A) Casi significativi di Linfoma di non Hodgkin (LNH), Mielodisplasia (MDS), Linfoma di Hodgkin (LH), Mieloma Multiplo (MM), Leucemia Linfoblastica Cronica (LLC). B) Legenda.

Figura Supplementare 11. Sopravvivenza Linfoma di non Hodgkin (LNH), Mielodisplasia (MDS), Linfoma di Hodgkin (LH), Mieloma Multiplo (MM), Leucemia Linfoblastica Cronica (LLC).

