



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO XXI

Titolo della tesi

Rituximab nel trattamento della GVHD cronica refrattaria

Nome e Cognome del dottorando

LUCA CUPELLI

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof. PAOLO DE FABRITIIS

Coordinatore: Prof. SERGIO AMADORI

INDICE

INTRODUZIONE	3
RAZIONALE DELLO STUDIO	14
OBIETTIVI DELLO STUDIO	15
PAZIENTI E METODI	16
RISULTATI	19
DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	23
BIBLIOGRAFIA	28
TABELLE	32
ABSTRACT	37

INTRODUZIONE

La graft-versus-host-disease cronica (cGVHD) costituisce la principale causa di morbidità e mortalità tardiva dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche¹. Il 60-70% dei pazienti lungo sopravvivenza presentano segni e/o sintomi riconducibili a cGVHD. Nonostante i notevoli progressi ottenuti nel campo del trapianto di cellule staminali negli ultimi 25 anni, sono stati minimi i progressi nell'incidenza, morbidità e mortalità della cGVHD. Ciò è dovuto in parte alla scarsa conoscenza relativa alla patogenesi della malattia, in parte alla mancanza per lungo tempo di un sistema validato di diagnosi, gradazione clinica e misurazione degli outcomes, cosa che ha ostacolato in gran parte la ricerca clinica in questo ambito trapiantologico. La più incoraggiante novità in relazione alla cGVHD è costituita dalla recente creazione del National Institute of Health (NIH) Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic-graft-versus-host-disease. Dai diversi Working group di tale progetto sono usciti fuori dei reports relativi ai punti salienti della cGVHD: diagnosi e stadiazione, istopatologia, potenziali markers biologici, terapie ancillari e di supporto, disegno di trials clinici²⁻⁷. Le terapie per la cGVHD durano mesi o anni e nonostante ciò la cGVHD costituisce la causa principale di morte in almeno un terzo dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico per leucemia acuta mieloide. Oltre all'impatto sulla mortalità la cGVHD riduce notevolmente la qualità di vita dei pazienti⁸. La terapia standard di prima linea è costituita dall'associazione di corticosteroidi ed inibitori della calcineurina. I tentativi atti ad identificare nuovi farmaci o strategie terapeutiche nel trattamento della cGVHD non hanno evidenziato sostanziali miglioramenti rispetto alla terapia basata su steroidi ed inibitori della calcineurina; né sostanziali benefici sono stati apportati dai diversi tentativi di ridurre preventivamente l'incidenza della cGVHD⁹.

Il periodo di insorgenza tipico della cGVHD è tra i 3 mesi e i 18 mesi post-trapianto. In base alla modalità di insorgenza distinguiamo:

- “*progressive-type onset*”: la cGVHD evolve a partire da una precedente GVHD acuta senza apparente soluzione di continuità;
- “*quiescente*”: la cGVHD esordisce dopo un periodo di risoluzione di una precedente GVHD acuta;
- “*de novo*”: la cGVHD si manifesta senza che vi siano stati precedentemente segni o sintomi di GVHD acuta.

Patogenesi della GVHD cronica

La patogenesi della GVHD cronica rimane per buona parte sconosciuta. Si è sempre pensato che la cGVHD fosse un processo alloreattivo mediato dai linfociti T come risultato del riconoscimento di antigeni maggiori ed antigeni minori di istocompatibilità, a causa dell’associazione con la GVHD acuta (aGVHD), con la disparità dell’HLA e con l’infusione di linfociti del donatore (DLI). Tuttavia la scoperta che la GVHD autologa indotta da ciclosporina (sindrome che ricorda da vicino la cGVHD) è mediata da linfociti T autoreattivi, porta alla speculazione che targets della cGVHD potrebbero essere non gli antigeni minori di istocompatibilità, bensì antigeni non polimorfici espressi sia dal donatore che dal ricevente¹⁰. Elemento centrale di questa ipotesi è la perdita di tolleranza immunologica sia timica che periferica, che porterebbe alla sopravvivenza di cloni autoreattivi. Il danno timico è una conseguenza nota della aGVHD. Le cellule T regolatorie (CD4+CD25+) giocano un ruolo fondamentale nei meccanismi tolleranza periferica (tanto da postularne il loro impiego nella profilassi e terapia della GVHD): recenti studi hanno dimostrato un’associazione tra il ridotto numero di cellule T regolatorie ed una deficiente espressione di FOXP3 (marker della funzione delle cellule T regolatorie) sia nel sangue periferico¹¹ che nelle biopsie della mucosa orale¹² di pazienti affetti da cGVHD.

Data la somiglianza tra alcune patologie autoimmuni e la cGVHD si è cercato di

evidenziare un legame tra immunità umorale e cGVHD. Modelli murini hanno evidenziato la necessità sia dei linfociti T CD4+ che dei linfociti B nell'innescare della cGVHD, oltre alla presenza nel siero di IgG autoimmuni¹³. Il ruolo di tali autoanticorpi non è chiaro ma fa aumentare la possibilità che i linfociti B costituiscano un target possibile della terapia anti-GVHD. Altri possibili targets sono costituiti dalle citochine liberate dai linfociti T e dalle cellule presentanti l'antigene (APC) che mediano il danno tissutale nella cGVHD (TNFalfa, IFN-gamma...)

E' interessante notare come molte patologie autoimmuni come la sindrome di Sjogren o la sclerodermia presentino caratteristiche comuni alla cGVHD sia per quanto riguarda le manifestazioni cliniche che per quanto riguarda la presenza di autoanticorpi¹⁴.

I vari gruppi di ricerca hanno identificato oltre 30 anticorpi con un coinvolgimento nella patogenesi della cGVHD. Esistono pochi dati relativamente all'impatto di auto e allo-anticorpi nella patogenesi della GVHD: nonostante oltre 20 anni di studi nessuno studio ha evidenziato in maniera convincente che questi anticorpi contribuiscano alle manifestazioni cliniche della GVHD. Tuttavia recentemente è stata dimostrata la presenza di anticorpi anti-PDGFR in pazienti affetti da sclerodermia. Il legame dell'anticorpo al recettore determina una reazione a cascata tramite l'attivazione di Ha-Ras e la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Infine si determina un'aumentata produzione di fibre collagene di tipo I ed una trasformazione di mio-fibroblasti in fibroblasti umani primitivi. L'attivazione fibroblastica è una caratteristica della sclerodermia. Lo stesso fenomeno è stato descritto in 22 pazienti affetti da cGVHD con interessamento cutaneo generalizzato e/o fibrosi polmonare¹⁵. Quindi gli anticorpi anti-PDGFR potrebbero giocare un ruolo fondamentale nella cGVHD cutanea ad impronta sclerodermica.

I linfociti T costituiscono tradizionalmente i maggiori effettori ed iniziatori della cGVHD.

I linfociti T sono in grado di esercitare un'azione citolitica diretta, liberare citochine ad

attività pro-infiammatoria o in grado di indurre fibrosi. Recentemente particolare rilevanza è stato dato al ruolo delle cellule T regolatorie (Tregs) in relazione alla loro capacità di sopprimere la proliferazione e la funzione dei linfociti T (soprattutto del tipo Th1). I linfociti Treg esprimono da un punto di vista immunofenotipico il CD4 e il CD25¹⁷. Le cellule Tregs presentano un effetto protettivo nei confronti della cGVHD e sono carenti in pazienti affetti da cGVHD. Numerosi anticorpi in grado di determinare in vivo un T-deplezione (ATG, campath, basiliximab) si sono dimostrati efficaci nel prevenire la cGVHD.

Molti studi evidenziano una probabile sinergia tra cellule B e T nella patogenesi della cGVHD. Ciò in accordo al fatto che i linfociti T, attraverso l'espressione del ligando del CD40, sono necessari per lo switch isotipico delle immunoglobuline¹⁷. Nei pazienti trattati con rituximab il numero totale di linfociti decresce in maniera maggiore rispetto a quanto ci si aspetterebbe dalla riduzione dei soli B linfociti, suggerendo che il rituximab potrebbe in qualche modo sopprimere i linfociti T che interagiscono con i linfociti B. Utilizzando un modello murino di cGVHD è stato recentemente dimostrato che la cGVHD ad impronta sclerodermica richiede sia i linfociti B che i linfociti T (CD4+CD25-) del donatore. E' interessante notare come le cellule Tregs (CD4+CD25+) prevengano la cGVHD. Ciò potrebbe supportare una strategia di prevenzione della cGVHD eseguita tramite una deplezione linfocitaria B e T ed una re-infusione di Tregs. Infine per quanto riguarda il ruolo delle cellule dendritiche solo uno studio dimostra come la persistenza di cellule dendritiche dell'ospite dopo i 100 giorni dal trapianto sembra esser correlata con l'insorgenza e la severità della cGVHD¹⁸.

Clinica e stadiazione della GVHD cronica

Il 50% circa dei pazienti con nuova diagnosi di CGVHD presentano un coinvolgimento di 3 o più organi. La mediana di trattamento in tali pazienti va dai 2 ai 3 anni. Un 15% dei

pazienti trattati per cGVHD sono sottoposti a terapia immunosoppressiva dopo 7 anni (o più) dall'inizio del trattamento. Sebbene le manifestazioni cliniche della cGVHD alla diagnosi siano alquanto eterogenee, la frequenza degli organi colpiti non differisce in relazione alla fonte di cellule staminali (staminali periferiche o midollo), tipo di donatore (correlato o non), condizionamento (mieloablativo o a ridotta intensità), età (adulti o bambini). E' necessario distinguere tra manifestazioni "diagnostiche" (sclerosi, lichen planus, poichiloderma, fascite, bronchiolite) e manifestazioni "distintive" (ulcere orali, atrofia, oncodistrofia, sindrome secca) di cGVHD. Queste ultime in caso di trials clinici necessitano di accertamenti biotipici di conferma. Le sedi più frequentemente coinvolte alla diagnosi di cGVHD sono: cute (75%), cavo orale (51-63%), fegato (29-51%), mucosa oculare (22-33%); meno coinvolti sono il tratto gastrointestinale (compresa la perdita di peso 23-45%), polmone (4-19%), esofago (7%), apparato genitale (1%), articolazioni (6%). Le principali manifestazioni cliniche della cGVHD sono riportate in **tabella 1**.

Fino a poco tempo fa la aGVHD e la cGVHD venivano distinte sulla base del periodo di insorgenza (prima o dopo i 100 giorni dal trapianto). Si poneva diagnosi di aGVHD quando i sintomi tipici (rash maculo-papulare diffuso, nausea, vomito, anoressia, diarrea, ileo, epatite colestatica) si verificavano entro i 100 giorni dal trapianto. Oggi si ritiene che qualora questi stessi segni e sintomi si verificano dopo i 100 giorni vadano comunque interpretati come aGVHD: in presenza di segni e sintomi tipici di aGVHD in assenza di manifestazioni diagnostiche di cGVHD si parlerà di aGVHD "persistente, ricorrente o ad insorgenza tardiva".

Le classificazioni più utilizzate per stadiare la cGVHD sono due: la forma classica di Shulman (**tabella 2**) che distingue la cGVHD in forme limitate ed estese e la classificazione di Lee che distingue le forme miti, che non necessitano di un trattamento da quelle moderato-severe (**tabella 3**). Benchè entrambe riescano a descrivere in modo valido

il fenomeno clinico le classificazioni riportate rispondono solo parzialmente alla necessità di correlare stadiazione clinica e prognosi e quindi di studiare approcci terapeutici differenziati per categorie di rischio differenti.

Recentemente Akpek et al. hanno creato uno score prognostico (SP) che permette di stratificare i pazienti alla diagnosi di cGVHD in rischio alto, intermedio o favorevole¹⁹. Tale score prende in considerazione le 3 variabili che si sono dimostrate in maniera indipendente significativamente correlate alla mortalità trapianto correlata alla diagnosi di cGVHD. Tali variabili sono costituite da:

- Estensione delle manifestazioni cutanee >50% superficie corporea;
- Piastrine <100000/mm³ alla diagnosi di cGVHD;
- “*Progressive-type onset*”.

Il calcolo dello SP viene effettuato utilizzando la seguente formula:

$$\text{SP} = [1.949 \times (\text{estensione cutanea}^*)] + [1.293 \times (\text{conta PLTS}^\wedge)] + [0.514 \times (\text{tipo di cGVHD}^\circ)]$$

*se superficie cutanea coinvolta >50% inserire 1, altrimenti 0

^\wedge se PLTS <100000/mm³ inserire 1, altrimenti 0

^\circ se la cGVHD è una forma “*progressive*” inserire 1, altrimenti 0.

I pazienti che alla diagnosi di cGVHD presentano uno SP=0 sono considerati a basso rischio; quelli che presentano uno SP= 1 o 2 presentano un rischio intermedio; i pazienti con uno SP>2 risultano ad alto rischio di mortalità trapianto correlata.

Nel lavoro di Akpek la sopravvivenza per i tre gruppi a 3 anni dal trapianto era del 92%, 71% e 9%.

Profilassi e terapia della cGVHD

Un'importante considerazione nella terapia della cGVHD è lo stato di immunodeficienza

associato. I pazienti con cGVHD hanno una riduzione nel numero e nella funzione dei CD4+, una deficiente produzione di anticorpi, specialmente nei confronti degli antigeni polisaccaridici ed un'asplenia funzionale; tutto ciò è chiaramente peggiorato dalla terapia immunosoppressiva. La pregressa diagnosi di una aGVHD costituisce uno dei principali fattori di rischio per una successiva cGVHD. Nonostante ciò tutti gli approcci terapeutici atti a ridurre l'incidenza di aGVHD non hanno avuto un impatto significativo sulla diagnosi di cGVHD. L'associazione ciclosporina e metotrexate si è rivelato essere il miglior approccio terapeutico nella prevenzione della aGVHD pur non avendo impatto sull'incidenza di cGVHD²⁰. L'aggiunta di steroidi, l'utilizzo di tacrolimus o farmaci di nuova generazione come micofenolato, sirolimus non hanno dimostrato una riduzione nella diagnosi di cGVHD, né studi di confronto relativi alla durata della profilassi con ciclosporina hanno determinato una riduzione significativa della cGVHD o un miglioramento della sopravvivenza globale²¹.

La deplezione dei linfociti T del donatore mediante manipolazione in vitro o attraverso la somministrazione di anticorpi anti-cellule T è stato associato ad un rischio ridotto di cGVHD, ma in generale la T deplezione non ha migliorato gli outcomes globali del trapianto a causa della maggiore incidenza di rigetto, recidiva di malattia ed infezioni virali²².

Per quanto riguarda la terapia della cGVHD è necessario innanzitutto focalizzare l'attenzione su due punti:

- Accuratezza della diagnosi;
- Necessità di trattamento in relazione alla stadiazione clinica.

Secondo le linee guida del NIH necessita un trattamento la cGVHD interessate almeno 3 siti o con uno score di severità superiore a 2. Un trattamento può essere inoltre preso in considerazione in caso di rischio prognostico alto secondo Akpek.

Terapia front-line da oltre 20 anni è costituita dall'associazione tra cortisone e ciclosporina (o tacrolimus). In realtà non vi sono chiare evidenze che una terapia di associazione sia migliore della sola terapia steroidea nel trattamento di prima linea della cGVHD, essendosi evidenziata solo una riduzione delle complicanze da steroidi (ad es. necrosi avascolare della testa del femore) nella terapia combinata²³. Del resto la morbidità associata alla terapia steroidea è significativa: necrosi avascolare, intolleranza glicidica, infezioni, ipertensione, cataratta, osteoporosi, disturbi dell'umore e ritardo di crescita nei bambini. L'associazione di ulteriori farmaci non ha prodotto miglioramenti nella sopravvivenza globale.

La durata della terapia viene prolungata, anche nei pazienti rispondenti per un periodo di almeno 12 mesi. Il 90% circa dei pazienti che risponderanno alla terapia steroidea lo faranno entro tre mesi, essendo così in grado di ridurre progressivamente la terapia steroidea. Un terzo dei pazienti risponde alla terapia di prima linea e non necessiterà di ricevere un ulteriore trattamento.

Terapia di salvataggio

Non esiste una terapia standard di salvataggio per quei pazienti che non hanno risposto alla terapia di prima linea.

Una delle maggiori problematiche relative alla terapia di seconda linea è costituita dalla definizione di eleggibilità e dai criteri di risposta. Generalmente si intende per cGVHD refrattaria agli steroidi una cGVHD che non migliora dopo 2 mesi o peggiora dopo 1 mese di trattamento.

Sono stati pubblicati numerosi studi di fase II con terapie di seconda linea. Tra questi trattamenti con micofenolato, tacrolimus, sirolimus, talidomide, idrossiclorochina, infliximab, fotoaferesi ecc...Tuttavia molti trials tendono ad annoverare un numero

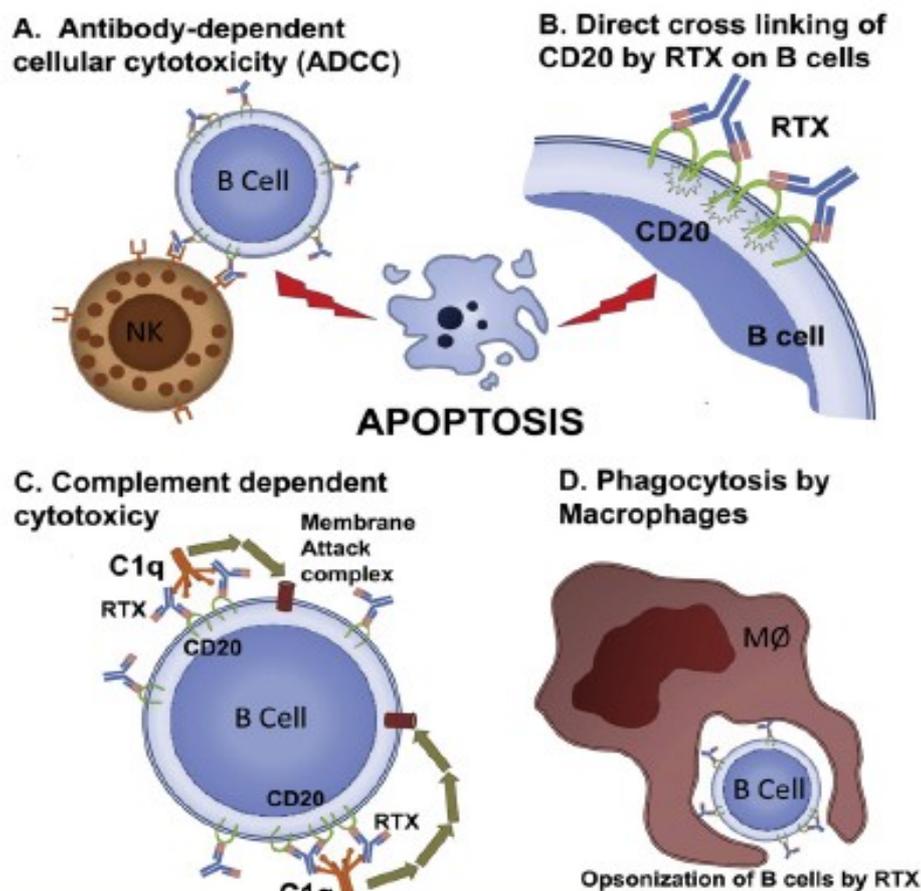
limitato di pazienti con un interessamento d'organo assolutamente eterogeneo ed in fase avanzata di patologia. Da cosa dipende la scelta di un trattamento di seconda linea? Nessun trattamento si è rivelato superiore agli altri in termini di risposta clinica (completa e parziale). In tutti i casi le risposte si attestano tra il 25 e il 50% dei pazienti trattati. E allora la scelta di una seconda linea di trattamento è basata sull'esperienza del clinico e sulla sensazione di quale possibile trattamento possa essere più efficace per quelle particolari manifestazioni di cGVHD.

Recenti pubblicazioni hanno evidenziato risultati positivi con rituximab come terapia di seconda linea della cGVHD.

Rituximab nel trattamento della cGVHD

Nel 1980 Stashenko²⁴ et al descrissero un antigene di superficie specifico delle cellule B, noto ora come CD20; ad eccezione delle plasmacellule il CD20 è presente su tutte le cellule B successive allo stato di pro-B. Queste cellule B CD20 positive sono il target terapeutico del rituximab. Il rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico umano/murino che agisce in maniera specifica contro una proteina trans-membrana dei linfociti B nota come CD20. La regione Fab del rituximab riconosce e si lega ad un loop extracellulare del CD20 determinando una significativa B-deplezione nel sangue periferico. Diversi sono meccanismi attraverso cui il rituximab media questa B deplezione (vedi **figura 1**).

figura 1: possibili meccanismi di azione del rituximab.



L’FDA ha approvato l’utilizzo del rituximab per la prima volta nel linfoma non-Hodgkin nel 1997. L’efficacia e il profilo di sicurezza nei confronti delle cellule B neoplastiche hanno stimolato il suo impiego nel trattamento di malattie autoimmuni B-correlate. Tra queste esiste un’indicazione approvata nell’artrite reumatoide, con una schedula diversa da quella classica. Numerose patologie autoimmuni sono state trattate off-label con rituximab per saggiarne il profilo di efficacia. Molte patologie autoimmuni presentano caratteristiche comuni alla cGVHD sia per quanto riguarda le caratteristiche cliniche che per la prevalenza di autoanticorpi²⁵. Dal momento che la cGVHD presenta caratteristiche simili alle patologie autoimmuni è stato speculato che il rituximab potrebbe essere efficace in tale setting. Recenti pubblicazioni hanno evidenziato risposte incoraggianti in seguito a trattamento con rituximab della GVHD cronica. In tutti i casi si evidenzia una risposta positiva superiore al 50% dei casi trattati; questa risposta si evidenzia maggiormente nelle forme cutanee e muscolo-scheletriche; risulta una concomitante riduzione della terapia

steroidea. Nello studio di Cutler in quattro pazienti maschi con donatori femmine si assiste ad una riduzione degli anticorpi anti H-Y, supportando la teoria che alcune delle manifestazioni della cGVHD possano essere mediate dall'immunità umorale²⁶.

RAZIONALE DELLO STUDIO

La terapia standard nei pazienti con diagnosi di cGVHD si basa sull'impiego di steroidi ed farmaci inibitori della calcineurina. Non esiste alcuna terapia standard di salvataggio nei pazienti che non ottengano una risposta al trattamento di prima linea e la cGVHD refrattaria al trattamento steroideo è gravata da un'elevata morbidità e mortalità, stimate intorno al 26%. Recenti lavori hanno evidenziato una potenziale efficacia del rituximab nel trattamento di salvataggio della cGVHD. E' possibile che il rituximab vada ad agire sulla componente B cellulare della cGVHD. Tuttavia i risultati non sono univoci.

In questo studio abbiamo quindi voluto valutare la riproducibilità dei dati presentati in altri studi sull'efficacia del rituximab nel trattamento della cGVHD analizzando retrospettivamente l'outcome di 8 pazienti trattati nel nostro centro.

OBIETTIVI

Obiettivo primario di questo studio è valutare l'efficacia della terapia con rituximab basandosi sia su risposte cliniche e di laboratorio obiettive che sulla possibilità di ridurre la terapia immunosoppressiva standard.

Ulteriore obiettivo è la valutazione di eventuali eventi avversi o complicanze legate alla somministrazione di rituximab in tali pazienti.

PAZIENTI E METODI

In questo studio sono stati analizzati retrospettivamente pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali con diagnosi di cGVHD refrattaria, cioè cGVHD già trattata e non responsiva ad almeno una terapia di prima linea e/o necessitante di somministrazione cronica di dosi medio-elevate di steroidi (almeno 20 mg/die di prednisone).

Prima del trattamento con rituximab in tutti i pazienti è stata effettuata un'analisi accurata ed obiettiva della severità della cGVHD. La valutazione della GVHD sia per quanto concerne la diagnosi e stadiazione che per quanto riguarda i criteri di risposta è stata effettuata in accordo alle linee guida del NIH:

- Il sistema oculare è stato valutato clinicamente e mediante test di Schirmer.
- La valutazione della funzionalità epatica è stata effettuata mediante analisi di laboratorio.
- La cute è stata valutata mediante un'analisi clinica delle eventuali alterazioni lichenoidi o ad impronta sclerodermica con una valutazione percentuale dell'estensione dell'interessamento cutaneo.
- Mucosa orale mediante applicando un oral mucosal scoring ed una valutazione dei sintomi;
- L'interessamento muscolo-scheletrico è stato valutato clinicamente mediante palpazione delle aree di indurimento cutanee, sottocutanee e muscolari.
- Prove di funzionalità respiratoria, Rx torace e/o TC torace ad alta risoluzione per la valutazione dell'impatto della cGVHD sulla funzionalità polmonare;
- Per quanto riguarda l'apparato gastrointestinale sono stati utilizzati parametri clinici (peso, diarrea, vomito) e, quando indicati, istologici.

La risposta al trattamento è stata valutata a 3 mesi, 6 mesi ed 1 anno dal trattamento. Ad ogni controllo sono stati rivalutati tutti i parametri clinici, laboratoristici e ove indicato

radiologici di cGVHD; sono stati valutati inoltre eventuali eventi avversi, complicanze, status della terapia immunosoppressiva. Sono stati utilizzati i seguenti criteri di risposta:

1. Risposta completa (RC) in caso di risoluzione di tutti i segni e sintomi attribuibili alla cGVHD;
2. Risposta parziale (RP) in caso di regressione superiore al 50% dei segni e sintomi attribuibili a cGVHD, ovvero risposta oggettiva in uno degli organi coinvolti in assenza di segni di progressione in altri organi, in assenza di terapia addizionale sistemica;
3. Malattia stabile (MS) in caso di mancata risposta oggettiva (regressione delle manifestazioni inferiori al 50%) in qualsiasi organo in assenza di terapia addizionale sistemica;
4. Progressione in caso di peggioramento di segni o sintomi attribuibili alla cGVHD ovvero necessità di terapia sistemica addizionale.

In caso di mancata risposta completa o parziale il paziente veniva considerato resistente al trattamento.

Somministrazione della terapia

Rituximab (375 mg/m² a settimana per 4 settimane) è stato somministrato secondo le indicazioni da scheda tecnica. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso firmato prima della somministrazione della terapia. A tutti i pazienti veniva somministrata una premedicazione con antistaminici ed antipiretici, ma non corticosteroidi. I pazienti non rispondenti in maniera completa (malattia stabile o risposta parziale) ad un primo ciclo di terapia dopo 3 mesi potevano essere sottoposti ad un secondo ciclo di trattamento. I pazienti che dopo un'iniziale risposta presentavano una recidiva di cGVHD potevano essere sottoposti ad un ulteriore ciclo di trattamento.

Terapia di supporto

Tutti i pazienti sono stati sottoposti alle seguenti terapie profilattiche:

- Bactrim due volte a settimana per la prevenzione dell'infezione da Pneumocisti.
- Aciclovir per la profilassi dei virus erpetici.
- Diaminocillina mensile per la profilassi nei confronti di germi capsulati.
- Lamivudina in tutti i pazienti positivi per gli anticorpi anti-Hbc.
- Monitoraggio dell'infezione da CMV mediante esame periodico dell'antigenemia.

RISULTATI

Nel periodo compreso tra luglio 2005 e gennaio 2009, 8 pazienti affetti da cGVHD refrattaria ad almeno una terapia di prima linea sono stati sottoposti a trattamento con rituximab. Le caratteristiche cliniche dei pazienti considerati nello studio sono riportate in **tabella 4**. Al momento del trattamento con rituximab i pazienti avevano un'età mediana di 45 anni (range 40-67); 6 pazienti erano di sesso femminile e 2 di sesso maschile. In 3 casi esisteva un mismatched di sesso tra ricevente e donatore (2 m/f e 1 f/m). Tutti, tranne uno erano trapianti familiari HLA identici. Il regime di condizionamento è stato in 5 casi mieloablativo ed in 3 casi a ridotta intensità. La raccolta delle cellule staminali è stata effettuata in tutti i casi da sangue periferico; una mediana di $5.8 \times 10^6/\text{kg}$ cellule CD34+ (range 2.8-7.4) è stata reinfusa. In tutti i casi la profilassi della GVHD prevedeva ciclosporina e metotrexate, anche se nel trapianto MUD il siero antilinfocitario è stato utilizzato come parte del condizionamento. 2 pazienti hanno sviluppato una cGVHD de novo, 2 pazienti una *progressive type* e 4 pazienti una forma quiescente (cioè insorta dopo la risoluzione di una pregressa GVHD acuta). Il tempo mediano dal trapianto alla diagnosi di GVHD cronica è stato di 7 mesi (range 4-31). Alla diagnosi di GVHD cronica 7 pazienti presentavano una forma estesa (o moderato-severa) e 1 paziente una forma limitata. In base alle variabili dello score di Akpek (estensione cutanea, numero di piastrine, modalità di insorgenza) 5 pazienti avevano uno score prognostico superiore a 0 (di questi tutti avevano un rischio intermedio).

Alla diagnosi di GVHD cronica erano interessati i seguenti organi:

- Cute in tutti i casi tranne uno (solo in un caso alla diagnosi era interessato più del 50%)
- Fegato in 5 casi
- Mucosa orale in 5 casi
- Occhi in 2 casi

- Apparato gastrointestinale in 1 caso
- Polmone in 1 caso.

Tutti i pazienti avevano ricevuto almeno una precedente linea di terapia. In particolare in 4 casi c'era stata solo una linea di terapia prima del rituximab, in 2 casi linee precedenti erano state 2 ed in 2 casi 3. La prima dose di rituximab è stata somministrata dopo una mediana di 21 mesi (range 2-50) dalla diagnosi di GVHD cronica. In 4 pazienti sono state somministrate 4 dosi di rituximab (pari ad 1 ciclo), in un paziente 8 ed in 3 pazienti 12 dosi totali. La valutazione della risposta è stata effettuata a 3, 6 e 12 mesi dal trattamento, per poi proseguire semestralmente.

La valutazione a 3 mesi dal primo ciclo di Rituximab ha evidenziato:

- Risposta completa in 1 paziente
- Risposta parziale in 3 pazienti
- Malattia stabile in 2 pazienti
- Non risposta in 2 pazienti. Uno dei due pazienti aveva in realtà presentato una risoluzione del quadro epatico ed una stabilizzazione di quello cutaneo, con progressivo peggioramento di una GVHD polmonare che costituiva la causa principale di decesso a 1 anno e 9 mesi dal trapianto allogenico.

Il paziente con risposta completa presentava oltre ad una GVHD epatica, gastrointestinale e a livello delle mucose, una neuropatia tipo sindrome di Guillain-Barrè variante, trattata in quel periodo con rituximab e plasmateresi.

Dei 3 pazienti che hanno avuto una risposta parziale la prima ha ottenuto una risposta completa a 3 mesi dal secondo ciclo e a 6 mesi dal primo con successiva recidiva trattata con fotoafesi ed è attualmente libera da segni o sintomi di cGVHD; la seconda presentava una GVHD cutanea lichenoidale ed una grave forma di GVHD oculare, presentava una risposta parziale cutanea che veniva mantenuta in due successivi cicli,

senza mai ottenere una risposta completa ed una stabilizzazione del quadro oculare; la terza paziente è attualmente a tre mesi dal primo ciclo ed ha presentato una risposta parziale cutanea.

Due pazienti sono stati classificati in una condizione di stabilità a 3 mesi dal trattamento. Il primo era il paziente sottoposto a trapianto MUD con una forma severa di sclerodermia che presentava lievissimi miglioramenti stabilizzatisi dopo un secondo ed un terzo ciclo, al termine del quale anzi il paziente presentava una progressione che richiedeva un passaggio alle fotoaferesi. Quadro analogo al secondo paziente con una grave forma sclerodermica agli arti inferiori con malattia stabile dopo il primo ciclo, risposta non modificatasi dopo altri due trattamenti

Una riduzione superiore al 50% della dose iniziale è stata possibile in sette pazienti su otto a tre mesi dal trattamento. (**tabella 5**)

Se valutiamo la risposta per interessamento d'organo notiamo i seguenti risultati:

- Nei 7 casi con interessamento cutaneo abbiamo avuto una risposta positiva in 4 casi, stabilità in 2 casi e non risposta in 1 caso.
- Nei 5 casi di interessamento epatico abbiamo osservato 3 risposte complete una condizione di stabilità ed una non risposta.
- Tutti e 5 i casi con interessamento della mucosa orale hanno risposto positivamente (1 RC e 4 RP).
- Due sono i casi con interessamento oculare, in uno abbiamo osservato una risposta parziale, nell'altro una progressione.

Dopo un follow-up mediano di 40 mesi e mezzo (range 6-99) dalla somministrazione del rituximab 7 pazienti sono vivi ed in remissione completa di malattia. Due pazienti non presentano segni di GVHD cronica e non assumono terapia immunosoppressiva, due pazienti presentano un interessamento cutaneo inferiore al 50% della superficie corporea

ed assumono dosi minime di terapia immunosoppressiva, due presentano attualmente un cGVHD sotto scarso controllo, uno per una forma di sclerodermia diffusa, l'altro per un interessamento oculare severo; una paziente è attualmente a 6 mesi dalla somministrazione del rituximab e presenta una risposta parziale.

EVENTI AVVERSI

Nessuna reazione infusione maggiore si è verificata in tutti e gli 8 pazienti dopo trattamento con rituximab. Solo in un paziente si verificava marcata astenia e diarrea il giorno dopo la somministrazione del farmaco.

Non è stata osservata alcuna tossicità ematologica. Il numero di linfociti B (CD19+) era non rilevabile alla prima valutazione (3 mesi) e si manteneva tale per circa un anno dalla somministrazione del rituximab.

In nessun caso si è verificata una riattivazione del virus dell'epatite B. Da sottolineare che tutti i pazienti HbsAg negativi con una positività per gli anticorpi antiHbc sono stati sottoposti a profilassi con lamivudina.

Segnaliamo degli eventi infettivi che si sono verificati a distanza dal trattamento con rituximab pur non essendo chiaramente collegabili al trattamento stesso in considerazione dello stato di profonda immunodepressione di tali pazienti e del concomitante utilizzo di altri farmaci immunosoppressori.

In 2 casi si è osservata una riattivazione di CMV rispettivamente a 2 mesi e a 5 mesi dalla somministrazione del Rituximab. Nel primo paziente si segnala anche un episodio di polmonite batterica a 5 mesi dal trattamento e nel secondo una polmonite da pneumocisti, anche se due anni dopo l'ultimo ciclo.

In una paziente si è verificata una riattivazione da Herpes Zoster a 6 mesi dal trattamento

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La cGVHD cronica costituisce una delle cause maggiori di morbidità e mortalità tardiva nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali. Poco si conosce sulla esatta fisiopatologia della cGVHD e scarsi sono i risultati delle terapie di seconda linea in pazienti che non rispondano alla terapia steroidea. Dal momento che per molto tempo, in analogia alla fisiopatologia della aGVHD, si è ritenuto che la cGVHD fosse mediata principalmente dai linfociti T, tutte le strategie terapeutiche sono state indirizzate unicamente verso una soppressione della funzione dei linfociti T. Sulla base biologica del coinvolgimento delle cellule B nella patogenesi della GVHD e sulla base clinica dell'esperienza del rituximab nel trattamento delle malattie autoimmuni si è cominciato ad applicare il rituximab nella cGVHD. Le cellule B avrebbero un ruolo primario diretto e/o indiretto nella patogenesi di molte patologie immuno-mediate tramite la produzione di autoanticorpi e citochine, l'interazione con i linfociti T e la funzione di APC (cellule presentanti l'antigene.) Nella cGVHD lo status del compartimento B cellulare risulta alquanto paradossale: i paziente possono presentare una linfocitopenia insieme ad un'iperreattività dei linfociti B.

Dal 2003 in poi diversi studi, il più delle volte monocentrici e con una casistica limitata sono stati effettuati in tale setting.

Ratanatharathorn et al. hanno evidenziato una risposta in 4 su 8 pazienti con GVHD cronica refrattaria con manifestazioni sclerodermiche localizzate e diffuse²⁷. Canninga-van Dijk e Okamoto hanno confermato tali dati in piccole casistiche, supportandolo anche con il dato istologico^{28,29}. L'unico studio prospettico di fase I-II, monocentrico, è lo studio di Cutler et al. pubblicato su Blood nel 2006.: in tal caso è stata evidenziata una risposta nel 70% dei casi (con 10% di risposte complete) soprattutto in pazienti con interessamento cutaneo e muscolo-scheletrico. Il GITMO ha pubblicato nel 2007 la più ampia casistica in termini numerici (38 pazienti) pur trattandosi di uno studio multicentrico e retrospettivo:

anche qui si evidenzia una risposta del 65% circa, soprattutto nelle forme cutanee³⁰. Effetti positivi sono stati evidenziati in tutti gli studi, soprattutto per ciò che concerne le manifestazioni cutanee di malattia, in una percentuale comunque superiore al 50%. Tuttavia in molti di questi pazienti rispondenti non si riusciva ad ottenere una risposta completa, molto degli effetti positivi si vedevano solo in alcune manifestazioni della cGVHD, lasciando totalmente inalterati altri segni o sintomi e alcuni pazienti risultavano totalmente refrattari.

Pur trattandosi di una casistica limitata nel nostro studio abbiamo analizzato l'outcome dei pazienti con cGVHD refrattaria trattati con rituximab. Anche nel nostro studio il profilo di efficacia del rituximab si attesta al 50% dei pazienti trattati. Si conferma la notevole efficacia del trattamento nei confronti delle manifestazioni cutanee di malattia, sia ad impronta lichenoidale che sclerodermica (in questo setting abbiamo osservato 7 risposte positive su 8 pazienti), avendo ottimi risultati anche sul versante epatico che sulla mucosa del cavo orale.

Di non secondaria importanza risulta la possibilità di ridurre in tutti i pazienti il concomitante trattamento steroideo riducendo in tal modo tante di quelle complicanze che tale trattamento reca con sé: diabete iatrogeno, osteoporosi, cataratta, infezioni, ipertensione.

Il trattamento è stato inoltre ben tollerato da tutti i pazienti, presentando un ottimo profilo di sicurezza in termini di complicanze maggiori.

Naturalmente lo studio presenta, come peraltro molti dei lavori sulla GVHD un bias importante: si tratta di uno studio retrospettivo. In una problematica quale la cGVHD in cui sia la diagnosi che l'evoluzione clinica della patologia presentano un'estrema variabilità individuale risulta fondamentale un'accurata e sistematica raccolta dei dati sia diagnostici che di valutazione degli outcomes, cosa che può rivelarsi decisamente complicata nel

momento in cui si conduce un'analisi retrospettiva. Nel nostro studio in tutti i casi la valutazione della risposta è stata effettuata in applicazione ai criteri dell' NIH.

Un'altra problematica è costituita ovviamente dal numero esiguo di pazienti.

Alla luce dei dati esistenti in letteratura e dell'analisi della nostra casistica si può comunque affermare che:

- Esistono elementi sufficienti per ritenere che il rituximab sia efficace nel trattamento della GVHD cronica refrattaria, un setting nel quale i risultati sono generalmente poco confortanti. Pertanto il rituximab dovrebbe essere dato come seconda chance di trattamento nei pazienti che non rispondono a steroidi e ciclosporina.
- Molte delle mancate risposte potrebbero essere correlate al fatto che nella cGVHD alcune manifestazioni cliniche sono espressione di un danno d'organo oramai stabilizzato, per cui nessuna terapia è in grado di ottenere sostanziali modificazioni.
- Oltre alle mancate risposte altra problematica è costituita dalle recidive possibili anche nei pazienti che avessero presentato una precedente risposta.
- La mancanza di criteri uniformi per l'indicazione al trattamento può limitare la capacità di determinare quale sia il momento ideale per l'utilizzo del farmaco; la mancanza di criteri oggettivi di misurazione di risposta clinica, rende difficile una valutazione su quali possano essere le attese all'utilizzo del farmaco.
- In tutti gli studi, compreso il nostro il concomitante utilizzo di steroidi o altra terapia immunosoppressiva finisce per creare un "*ambiente*" in cui risulta difficile isolare l'effetto benefico del Rituximab.

Direzioni future

Risultano mandatori degli studi prospettici al fine di ottenere risposte alle molte questioni ancora aperte:

- Il reale profilo di efficacia del farmaco, applicandolo su una popolazione omogenea di pazienti, con una raccolta sistematica di score diagnostici e di valutazione degli outcomes, con follow-up a lungo termine per valutare eventuali effetti a distanza;
- Quale può essere il timing corretto del farmaco: l'utilizzo in fase precoce, magari in associazione agli steroidi potrebbe aumentarne l'efficacia, riducendo significativamente l'insorgenza di danni d'organo irreversibili;
- La possibilità di utilizzare il farmaco in profilassi, cioè come parte del condizionamento (esistono già dei protocolli di condizionamento di trapianti allogenici per linfomi B in cui viene utilizzato il rituximab) per ridurre l'incidenza della GVHD ottenendo una B deplezione, in aggiunta magari all'infusione di cellule T regolatorie.
- La dose corretta del farmaco. In tutti gli studi la dose è mutuata dai pazienti trattati per linfoma. Ma la biologia delle cellule B nel linfoma e nelle malattie autoimmuni è sostanzialmente differente. Pur essendo le cellule B nell'autoimmunità "anormali", confrontate con un setting di linfociti B "normali", non sono maligne; inoltre l'obiettivo primario nell'utilizzo del rituximab nelle patologie autoimmuni è differente rispetto all'obiettivo che si ha nel trattamento dei linfomi. Nell'artrite reumatoide la dose indicata è differente (2 dosi da 1000 mg a distanza di 2 settimane); esiste uno studio recente di von Bonin et al. che ha riportato risultati incoraggianti (risposta nel 69% dei casi) a dose ridotta (50 mg/m²).
- Gli aspetti biologici della patologia, il ruolo dell'immunità umorale e dei linfociti B e T nella patogenesi della GVHD cronica.

BIBLIOGRAFIA

1. Higman MA, Vogelsang GB. Chronic graft versus host disease. *Br J Haematol* 2004; 124: 435-54.
2. Filipovich AH, Weisdorf T et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host-disease: I. Diagnosis and staging Working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 945-56.
3. Shulman HN, Kleiner D et al. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host-disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host-disease: II. Pathology Working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 31-47.
4. Schultz KR, Miklos DB et al. Toward biomarkers for chronic graft-versus-host-disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host-disease: III. Biomarker Working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 126-37.
5. Pavletic SZ, Martin P et al. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host-disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host-disease: IV. Response criteria Working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 252-66.
6. Couriel D, Carpenter PA et al. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host-disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host-disease: V. Ancillary therapy and supportive care Working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 375-96.
7. Martin PJ, Weisdorf D et al. National Institutes of Health consensus development

- project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host-disease: VI. Design of clinical trials Working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 491-505.
8. Socie G, Stone JV et al. Long term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *N Engl J Med* 1999; 341: 14-21.
 9. Lee SG, Vogelsang G et al. Chronic graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 215-33.
 10. Hess AD, Horwitz L et al. Development of graft-versus-host disease-like syndrome in cyclosporine-treated rats after syngeneic bone marrow transplantation *Journal of Experimental Medicine* 1985; 161: 718-30.
 11. Miura Y, Thoburn CJ et al. Association of *Foxp3* regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004; 104:2187-2193.
 12. Rieger K, Loddenkemper C et al. Mucosal FOXP3 regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GVHD. *Blood*.2006; 107: 1717-1723.
 13. Zhang C, Todorov I et al. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood* 2006; 107: 2993-3001.
 14. Lawley TJ, Peck GL et al. Scleroderma, Sjogren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 1977; 87: 707-9.
 15. Svegliati S, Olivieri A et al. Stimulatori auto-antibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007; 110: 237-41.
 16. Wood KJ, Sakaguchi S et al. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210.
 17. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-

- linked hyper-IgM-syndrome. *Cell* 1993; 72: 291-300.
18. Chan GW, Gorgun G et al. Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003; 9: 170-6.
 19. Akpek G, Zahurak ML et al. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2001; 97: 1219-1226.
 20. Storb R, Deeg HG et al. Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host-disease in patients given HLA-identical marrow grafts for leukemia: long term follow up of a controlled trial. *Blood* 1989; 73: 1729-1734.
 21. Mengarelli A, Iori AP et al. One year cyclosporine prophylaxis reduces the risk of developing extensive chronic graft-versus-host-disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Hematologica* 2003; 88: 315-323.
 22. Ho VY, Soiffer RJ et al. The history and future of T cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 98: 3192-3204.
 23. Koc S, Leisenring W et al. Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood* 2002; 100: 48-51.
 24. Staschenko P, Nadler LM et al. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 1980; 125:1678-85.
 25. Kapur R, Ebeling S et al. B-cell involvement in chronic graft-versus-host disease. *Haematologica* 2008; 93: 1702-1711.
 26. Cutler C, Miklos D et al. Rituximab for steroid –refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2006; 108: 756-762.

27. Ratanatharathorn V, Ayash L et al. Treatment of chronic graft-versus-host disease with anti-CD20 chimeric monoclonal antibody. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 505-511.
28. Canninga-van Dijk MR, der Straaten HM et al. Anti-CD20 monoclonal antibody treatment in 6 patients with therapy-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2004; 104: 2603-2606.
29. Okamoto M, Okano A et al. Rituximab is effective for steroid-refractory sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Leukemia* 2005; 20: 172-3.
30. Zaja F, Bacigalupo A et al. Treatment of refractory chronic GVHD with rituximab: a GITMO study. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 273-277.
31. von Bonin M, Oelschlagel U et al. Treatment of chronic steroid-refractory graft-versus-host disease with low-dose rituximab. *Transplantation* 2008; 86: 875-79.

TABELLE

Tabella 1. Principali manifestazioni cliniche della GVHD cronica

Organo	Segni clinici/laboratorio
Cute (comune)	Iper e ipopigmentazione, lichen planus, poichiloderma, ulcere cutanee, scleroderma, ittiosi, bolle pemfigoidi.
Annessi cutanei	Onicodistrofia, alopecia.
Cavo orale (comune)	Lichen planus, eritema, ulcere, xerostomia, carie, fibrosi, riduzione della salivazione.
Occhi (comune)	Cheratocongiuntivite secca, ulcerazioni corneali.
Fegato (comune)	Ittero, aumento fosfatasi alcalina, transaminasi, bilirubina.
Polmone	Alterazioni ostruttive/restrittive nelle PFR, bronchiolite obliterante, pneumotorace, bronchiectasie, colonizzazione da pseudomonas, infiltrati polmonari.
App.muscolo-scheletrico	Polimiosite, artrite, fascite.
Esofago	Membrane esofagee, desquamazioni, ulcerazioni, fibrosi, alterazione della motilità.
Intestino	Fibrosi, malassorbimento.
Sierose	Versamenti pleurico, pericardico, peritoneale.
Sistema nervoso	Neuropatia periferica, intrappolamento di nervi, miastenia grave.
App.urogenitale	Cistiti, fimosi.
Rene (raro)	Glomerulonefrite.
Vagina	Eritema, lichen planus, secchezza, ulcere, stenosi.
Sistema emopoietico	Trombocitopenia, neutropenia, eosinofilia, anemia emolitica, PRCA.
Immunità	Ipcellularità linfoide, iper- o ipogammaglobulinemia.

Tabella 2. Gradazione classica della GVHD cronica (Shulman)

Estesa: coinvolgimento clinico multi organo;

Limitata: solo coinvolgimento cutaneo clinicamente evidente;

Subclinica: solo evidenza istologica.

GVHD CRONICA LIMITATA	GVHD CRONICA ESTESA
<ol style="list-style-type: none">1. coinvolgimento cutaneo localizzato e/o2. disfunzione epatica causata da GVHD cronica	<ol style="list-style-type: none">1. coinvolgimento cutaneo generalizzato o2. coinvolgimento cutaneo localizzato e/o disfunzione epatica causata da GVHD cronica più:<ul style="list-style-type: none">• istologia epatica con evidenza di epatite cronica aggressiva, necrosi a ponte o cirrosi;• coinvolgimento oculare: test di Schirmer<5mm;• coinvolgimento delle ghiandole salivari minori o mucosa orale dimostrata su biopsia labiale• coinvolgimento di qualsiasi organo target.

Tabella 3. Gradazione clinica della GVHD cronica in mite e moderata/severa

1. Per GVHD cronica non richiedente trattamento o **forma mite** si intende quella patologia coinvolgente un singolo sito, in pazienti con PLTS>100000 in assenza di terapia steroidea all'insorgenza della GVHD cronica stessa, ovvero:

- a. Anomalie del cavo orale compatibili con diagnosi di CGVHD, biopsia positiva della cute o delle labbra, in assenza di altre manifestazioni;
 - b. Modeste anomalie della funzione epatica ($ALP \leq 2$ volte il limite superiore della norma, AST o $ALT \leq 3$ volte il limite superiore della norma e bilirubina totale ≤ 1.6) con biopsia cutanea o labiale positiva, in assenza di altre manifestazioni;
 - c. Meno di 6 placche papulo-squamose, rash maculo-papulare o lichenoides esteso a meno del 20% della superficie corporea (BSA), biopsia sulla pelle positiva, in assenza di altre manifestazioni;
 - d. Secchezza oculare (test di Schirmer ≤ 5 mm con non più di sintomi oculari minimi)
 - e. Anormalità vaginali o vulvari con biopsia positiva, e nessun'altra manifestazione di cGVHD
2. Per GVHD cronica richiedente trattamento sistemico o **forma moderato/severa** si intende quella patologia coinvolgente siti multipli, oppure pazienti che presentano PLTS < 100000 , o trattamento steroide all'esordio di cGVHD, ovvero:
- a. Coinvolgimento di due o più organi con sintomi o segni di cGVHD, con biopsia documentata di cGVHD in ogni organo;
 - b. Coinvolgimento della cute più esteso di quello della cGVHD cronica mite, confermato attraverso biopsia;
 - c. Sclerodermia o morphea;
 - d. Onicolisi o onicodistrofia rappresentativa di cGVHD, con documentazione di malattia in ogni organo;
 - e. Diminuzione motoria al polso o alla caviglia dovuta ad infiammazione dei fasci muscolari causata da cGVHD;
 - f. Contratture suggestive per cGVHD;
 - g. Coinvolgimento orale con deficit funzionali, refrattario ai trattamenti topici;
 - h. Coinvolgimento vaginale con ridotta funzionalità refrattaria ai trattamenti topici;
 - i. Bronchiolite obliterante non dovuta ad altre cause;
 - j. Biopsia epatica positiva, o funzionalità epatica anomala non dovuta ad altre cause con $ALP \geq 2$ volte il limite superiore della norma, AST o $ALT \geq 3$ volte il limite superiore della norma e bilirubina totale ≥ 1.6 , e cGVHD documentata in ogni organo;
 - k. Biopsia dell'apparato gastrointestinale positiva;
 - l. Infiammazione dei fasci muscolari o sierosite suggestiva per cGVHD e non dovuta ad altre cause.

Tabella 4. Caratteristiche cliniche dei pazienti

Pazienti	8
----------	---

Età mediana, anni (range)	45 (40-67)
M/F	2/6
Sex mismatched(r/d)	3
f/m	1
m/f	2
Diagnosi	
LMA	1
LLA	2
MM	2
LMC	1
MDS	1
LNH	1
Donor: sibling/MUD	7/1
Condizionamento: mieloablativo/RIC	5/3
cGVHD: limitata/estesa (Shulman)	2/6
Durata mediana di cGVHD prima del RTX, mesi (range)	21 (2-50)
Mediana precedenti trattamenti (range)	2 (1-3)
Precedenti trattamenti	
Prednisone	8
Ciclosporina	6
Fotoaferesi	6
MMF	2
Dosi di RTX	
≤ 4	4
5-8	1
≥ 8	3
Mediana follow-up dopo RTX, mesi (range)	40 (6-99)

Tabella 5. Caratteristiche cGVHD, risposta, status

Caso n°/ iniz	Età/sex	Esordio/PS (Akpek)	Gradaz(Shulman)/ Organi	Risposta/ riduz cortisone	Status
1/LG	63/f	Progr/int	Estesa Cute/muc/feg	Risp parz/ 50%	Viva, assenza di cGVHD
2/PC	38/f	De novo/int	Estesa Cute/muc/feg/occhi poi polmone	Non risp	Deceduta per cGVHD polm
3/CA	42/m	De novo/basso	Estesa Cute/muc/feg/occhi	Non risp/ 80%	Vivo
4/MV	43/m	Quiesc/int	Estesa Cute/muc/feg poi fasci muscolari-artic	Stabile/ 40%	Vivo
5/DPA	39/f	Progr/int	Estesa Cute/muc/occhi	Risp parz/ 85%	Viva
6/RH	44/f	Quiesc/basso	Limitata Cute/feg	Risp parz/ 100%	Viva
7/RL	42/f	Quiesc/int	Estesa Feg/muc/gastroint poi s.Guill Barrè	Risp comp/ 100%	Viva, assenza di cGVHD
8/DLC	55/f	Quiesc/basso	Estesa Cute/feg	Stabile/ 50%	Viva

Tabella 6. Risultati in base agli organi interessati

Organo	Paz	Risposta globale (anche cute<50%)	Risp compl	Non risp
Cute	7	6	0	1
Mucosa orale	5	5	1	0
Occhi	2	1	0	1
Fegato	5	4	3	1
Polmoni	1	0	0	1
App. gastroint.	1	1	1	0

ABSTRACT IN INGLESE

Background. Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) is an important determinant of long term morbidity and mortality in allogeneic stem cell transplant patients. Standard primary treatment of cGVHD remains a combination of corticosteroids (CS) and calcineurin inhibitors. There is no standard therapy for those who fail to respond to CS, and CS-resistant GVHD is associated with high morbidity. Thus, therapeutic options are usually limited for those patients. Rituximab (RTX) has been recently reported to be

effective in cGVHD.

Aim. Aim of this study was to analyze the outcome of 8 patients treated with RTX as salvage therapy for refractory cGVHD in a single center.

Patients and methods. This retrospective study describes 8 consecutive patients experiencing refractory cGVHD and who received intravenous infusions of RTX (375 mg/m² per infusion) at weekly intervals for 4 weeks. In case of incomplete clinical response, additional course of 4 weeks were given. Response to RTX was assessed 3 months after first infusion. Complete Remission (CR) was defined as resolution of all manifestations in involved organs, while partial remission (PR) was defined as an improvement in each involved organ; resistance was defined as lack of a CR/PR. The benefit in cGVHD was also evaluated in terms of CS taper.

Results. Median age was 45 years (range 40-67). All patients had received and failed at least one line of immunosuppressive therapy. Median duration of cGVHD before RTX was 21 months (range 2-50) and the median follow-up after RTX was 40 months (range 6-99). Overall, 4 patients responded to RTX administration. In addition RTX allowed a significant reduction (>50% starting dose) of CS dosage in 7 patients three months after first infusion. No major toxicities directly related to RTX were observed. During the study period one patient died: main cause was cGVHD progression.

Conclusions. Despite its limited size, our study confirms that RTX is effective in 50% of patients with refractory cGVHD, in accordance with findings from other studies. Controlled prospective studies are mandatory to confirm these results.

ABSTRACT IN ITALIANO

Introduzione. La graft-versus-host disease cronica (cGVHD) costituisce un'importante causa di morbidità e mortalità a lungo termine nel trapianto allogenico di cellule staminali. Il trattamento standard di prima linea della cGVHD rimane una combinazione di corticosteroidi (CS) ed inibitori della calcineurina. Non esiste una terapia standard per chi non risponde ai CS, e la cGVHD resistente ai CS è associata ad un'elevata morbidità. Quindi, le opzioni terapeutiche sono solitamente limitate per quei pazienti. Recentemente è

stata descritta l'efficacia del Rituximab (RTX) nella cGVHD.

Scopo dello studio. Scopo dello studio era analizzare l'outcome di 8 pazienti trattati con RTX come terapia di salvataggio per la cGVHD refrattaria in un singolo centro.

Pazienti e metodi. Questo studio retrospettivo descrive 8 pazienti consecutivi affetti da cGVHD refrattaria e che sono stati trattati con infusioni endovenose di RTX (375 mg/m² per infusione) a intervalli settimanali per 4 settimane. In caso di risposta clinica non completa veniva somministrato un ciclo addizionale di 4 settimane. La risposta al RTX è stata valutata 3 mesi dopo la prima infusione. Remissione completa (RC) è stata definita come risoluzione di tutte le manifestazioni negli organi coinvolti, mentre risposta parziale (RP) è stata definita come un miglioramento in ognuno degli organi coinvolti; resistenza è stata definita come assenza di RC/RP. Il beneficio nella cGVHD è stato valutato anche in termini di riduzione di CS.

Risultati. L'età mediana era di 45 anni (40-67). Tutti i pazienti erano stati sottoposti e non avevano risposto ad almeno una linea di terapia immunosoppressiva. La durata mediana della cGVHD prima del RTX era di 21 mesi (range 2-50) and il follow-up mediano dopo RTX era di 40 mesi (range 6-99). Globalmente, 4 pazienti hanno risposto alla somministrazione del RTX. Inoltre il RTX ha permesso una significativa riduzione della dose di CS (>50% dose iniziale) in 7 pazienti a tre mesi dalla prima infusione. Non sono state osservate tossicità maggiori correlate al RTX. Durante il periodo di studio un paziente è deceduto: la causa principale era progressione di cGVHD.

Conclusioni. Nonostante il campione limitato, il nostro studio conferma che il RTX è efficace nel 50% dei pazienti trattati con cGVHD, in accordo alle evidenze di altri studi. Studi prospettici controllati sono mandatori per confermare questi risultati.

PAROLE CHIAVE

Chronic graft versus host disease-Rituximab-corticosteroids-calcineurin inhibitors-allogeneic stem cell transplant.