

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**Oncologia, Ematologia e Patologia**

Ciclo XXX°

**Settore Concorsuale:** 06/D3

**Settore Scientifico Disciplinare:** Malattie del sangue e degli organi ematopoietici MED/15

**L'UTILIZZO CLINICO DEL BLINATUMOMAB**  
**NELLA TERAPIA DELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA:**  
**L'ESPERIENZA DI BOLOGNA**

**Presentata da:** Dott. ssa Francesca Volpato

**Coordinatore Dottorato**

Prof. Pier-Luigi Lollini

**Supervisore**

Prof. Giovanni Martinelli

**Esame finale anno 2018**



## Sommario

<b>Elenco delle abbreviazioni .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Le neoplasie linfoidi.....</b>	<b>9</b>
1.1 Epidemiologia, eziologia ed eziopatogenesi .....	10
1.2 Clinica .....	12
1.3 Diagnosi.....	14
1.3.1 Diagnosi citogenetica.....	14
1.3.2 Immunoistochimica e citofluorimetria .....	15
1.3.3 Citogenetica .....	18
1.4 Prognosi.....	22
<b>2. Terapie tradizionali delle LAL-B: stato dell'arte .....</b>	<b>26</b>
2.1 Esami da eseguire prima della terapia.....	26
2.2 Terapie della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia negativa .....	28
2.2.1 Induzione alla remissione nella leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia negativa .....	28
2.2.2 Consolidamento della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia negativa .....	31
2.2.3 Mantenimento della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia negativa .....	32
2.3 Terapie della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia positiva .....	33
2.3.1 Induzione della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia positiva .....	33
2.3.2 Mantenimento della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia positiva .....	34
2.4 Terapia della leucemia acuta linfoblastica a precursori B resistenti o ricadute .....	35
<b>3. Terapie sperimentali della LAL-B .....</b>	<b>38</b>
3.1 Chemioterapici Sperimentali .....	38
3.2 Farmaci sperimentali a target enzimatico .....	38
3.3 Farmaci sperimentali a target sulla membrana .....	39
3.3.1 Attivatori del sistema immunitario .....	39
3.3.2 Anticorpi monoclonali .....	40
3.3.3 BiTE .....	41
<b>4. Scopo della tesi .....</b>	<b>42</b>
<b>5. Blinatumomab.....</b>	<b>43</b>
5.1 Biologia molecolare.....	43

<b>5.2</b>	<b>Meccanismo d'azione</b>	<b>43</b>
<b>5.3</b>	<b>Studi in vitro</b>	<b>44</b>
<b>5.4</b>	<b>Studi preclinici</b>	<b>45</b>
<b>5.5</b>	<b>Trial clinici</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Pazienti e metodi</b>	<b>53</b>
<b>6.1</b>	<b>Protocolli Sperimentali</b>	<b>53</b>
6.1.1	Studio MT103-203 (Blast)	53
6.1.2	Studio Alcantara	54
6.1.3	Studio Tower	55
6.1.4	Definizione di Remissione Completa (CR)	57
6.1.5	Definizione di Remissione Completa con ripristino funzionalità midollare incompleta (CRh)	57
6.1.6	Definizione di Remissione Completa con Incompleta ripristino funzionalità midollare (Cri)	58
6.1.7	Definizione di Malattia minima Residua	58
<b>6.2</b>	<b>Caratteristiche biologiche e biomolecolari dei pazienti</b>	<b>59</b>
<b>6.3</b>	<b>Metodi</b>	<b>60</b>
6.3.1	Arruolamento e Somministrazione	60
6.3.2	Analisi Molecolare	62
6.3.3	Analisi di Malattia minima residua	64
6.3.4	Analisi Immunofenotipo	65
6.3.5	Analisi del trascritto BCR/ABL	66
6.3.6	Analisi Citogenetica	68
6.3.7	Analisi Statistica	70
<b>7.</b>	<b>Risultati</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>Discussione</b>	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>92</b>
<b>9.1</b>	<b>Sviluppi futuri</b>	<b>94</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>97</b>

## Indice delle figure

Figura 1 .....	10
Figura 2 .....	17
Figura 3 .....	25
Figura 4 .....	31
Figura 5.....	48
Figura 6 .....	63
Figura 7.....	64
Figura 8 .....	75
Figura 9.....	75
Figura 10.....	76
Figura 11.....	77
Figura 12.....	78
Figura 13.....	79
Figura 14 .....	80
Figura 15 .....	81
Figura 16.....	83
Figura 17 .....	84
Figura 18 .....	85
Figura 19 .....	86
Figura 20.....	94

## Indice delle tabelle

Tabella 1.....	11
Tabella 2.....	13
Tabella 3.....	15
Tabella 4.....	16
Tabella 5.....	23
Tabella 6.....	24
Tabella 7.....	24
Tabella 8.....	47
Tabella 9.....	50
Tabella 10.....	51
Tabella 11.....	52
Tabella 12.....	60
Tabella 13.....	73
Tabella 14.....	73
Tabella 15.....	76
Tabella 16.....	88
Tabella 17.....	95

## Elenco delle abbreviazioni

LAL: leucemia acuta linfoblastica o leucemia acuta linfoide LAL-B: leucemia acuta linfoblastica a precursori B

CLL: leucemia linfoblastica cronica

SNC: sistema nervoso centrale

MLL: mixed lineage leukemia

Ph+ /Ph-: Philadelphia positivi/ Philadelphia negativi ara-C: citosina arabinoside, anche detta citarabina MTX: metotrexate

OS: sopravvivenza dalla diagnosi o overall survival

DSF: disease free survival, tempo libero da malattia/ricaduta

EFS: event free survival, tempo libero da eventi avversi correlati a malattia, ricaduta o trattamento

MRD: minimal residual disease

TKI: inibitori delle tirosin-chinasi

BEE: barriera emato-encefalica

CR: remissione completa

PR: remissione parziale

BiTE: bi-specific T-engaging

MAB: anticorpo monoclonale, o monoclonal antibody e.v. : somministrazione endovenosa

SI: sistema immunitario

CTS: cytokine release syndrome alloTMO: trapianto di midollo osseo da donatore allogenico

## Abstract

La leucemia acuta linfoblastica a cellule B è una patologia rara nell'adulto (insorgenza pari a 1.1/100.000 abitanti) caratterizzata da una pessima prognosi. Risulta definita da tassi di sopravvivenza globale a 5 anni che nonostante gli sviluppi terapeutici negli ultimi due decenni non sono incrementati, con valori di sopravvivenza media del 49% nei pazienti standard-risk e del 24% nei pazienti high-risk.

L'utilizzo di anticorpi ingegnerizzati bispecifici BiTE sembra dare risultati promettenti nei pazienti con neoplasie ematologiche.

Nel nostro centro sono stati avviati tre protocolli di trattamento con anticorpo monoclonale bispecifico Blinatumomab comprendenti pazienti con LAL-B in remissione clinica e MDR (malattia minima residua) positiva, pazienti Philadelphia positivi pluri-trattati e ricaduti. In tutti e tre i gruppi i risultati sono stati soddisfacenti ed in linea coi risultati promettenti ottenuti negli studi precedenti avviati dalla casa farmaceutica Amgen.

Tale molecola ha delle prospettive future indubbiamente incoraggianti.

# Introduzione sulla LAL-B

## 1. Le neoplasie linfoidi

Le neoplasie linfoidi sono tumori del sangue derivanti da difetti di maturazione e proliferazione a carico della linfocitopoiesi o delle cellule linfocitiche mature. A seconda della loro localizzazione sia prevalentemente a livello midollare o delle stazioni linfonodali si dividono in sindromi mieloproliferative ad espressione leucemica o linfomatosa (1).

Oramai noto che ogni linfoma può evolvere con un eventuale coinvolgimento midollare e le leucemie possono presentarsi con una lesione solida, la più recente classificazione della neoplasie ematologiche proposta dalla WHO è basata non tanto sulla localizzazione anatomica delle cellule blastiche ma prevalentemente sull'istologia, l'immunofenotipo e le alterazioni genetiche proprie delle cellule tumorali (2) (vedi Tabella 1). Data la numerosità delle alterazioni possibili ed il gran numero di cellule precursori da cui possono originare, le neoplasie linfoidi possono considerarsi un insieme eterogeneo di malattie ad alta variabilità di espressione sia clinica che laboratoristica.

Secondo la classificazione standard le leucemie acute, per definirsi tali, sono sindromi mielodisplastiche con coinvolgimento midollare superiore al 25% e iniziale presentazione sistemica, con o senza lesione extra-midollare occupante massa, mentre la patologia è definita come linfomatosa se esiste una massa solida con componente blastica (CB) alla biopsia ossea <25%.

Esse si dividono in Leucemia Acute Mieloidi (LAM) e Linfoidi (LAL) a seconda che la neoplasia origini da precursori della linea mieloide o linfoide.

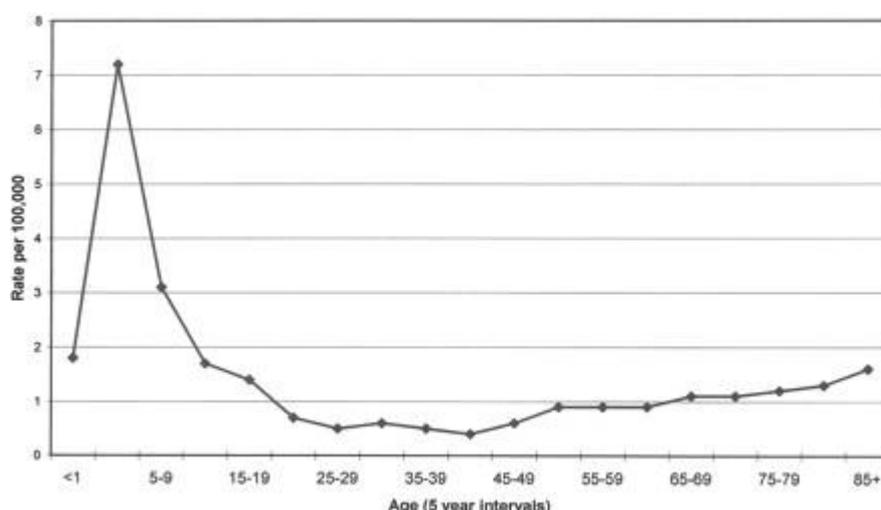
A sua volta le LAL si dividono in LAL-B e LAL-T in base al precursore/linfocita maturo all'origine della replicazione clonale della neoplasia. All'interno delle leucemie acute linfoidi le 4 grandi categorie considerate sono:

- LAL a precursori B (origine cellulemidollari).
- LAL a cellule B mature o plasmacellule.
- LAL a precursori T (origine da cellule timiche).
- LAL a linfociti T maturi (origine da Linfociti T citotossici/ helper/ regolatori).

Oggetto di questo capitolo sarà appunto l'approfondimento riguardo le leucemie acute linfoblastiche a precursori B sul cui sviluppo terapeutico si basa lo scopo di tale tesi.

### 1.1 Epidemiologia, eziologia ed eziopatogenesi

Le leucemie linfoblastiche acute sono tumori rari la cui incidenza annuale corrisponde a 1.1/100.000 abitanti all'anno (USA), con andamento bimodale con un picco nell'infanzia (incidenza 4,5/100.000 all'anno), dove rappresentano la patologia più frequente fra tutte le neoplasie del bambino, e un rinnalzamento nella fascia di popolazione over 50 (incidenza 2/100.000 all'anno) (3).



Age-specific annual incidence of acute lymphoblastic leukemia (US-SEER data, 1998-2002) (3)

Figura 1

Sono comunque patologie rare nell'adulto in cui normalmente prevalgono le forme croniche (4).

Il 75% circa sono a fenotipo B e il 25% a fenotipo T; la differenziazione si basa sulla citomorfologia, l'immunoistochimica e la citogenetica dei blasti su materiale biopsiato da midollo osseo (4). La maggioranza dei pazienti presenta un B-cell lineage ad immunofenotipo immaturo definito come LAL a precursori B. Esiste un terzo immunofenotipo misto mieloidelinfoidel, definito come LAL bifenotipica, la cui incidenza è però rara, ma caratterizzata da cattiva prognosi.

ALL Subtype	Frequency (%)	Important Markers
Precursor B-cell lineage	70	
Pro-B ALL	(10)	HLA-DR, TdT, CD19
“Common” B-cell ALL	(45)	Same as pro-B ALL, plus CD10
Pre-B-ALL	(15)	Same as “common” B-cell ALL plus cytoplasmic $\mu$ -chains
Mature B-cell ALL	5	Kappa or lambda light chain, TdT-, CD10-
T-cell ALL lineage	25	TdT, CD3, cytoplasmic CD3, other T-cell markers

Immunophenotypic Subtypes of Adult ALL (according to Bassan R et al. 2004);

HLA Human leukocyte antigen; TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase.

Tabella 1

Differenti studi sono stati compiuti per tentare di chiarire l'eziopatogenesi delle leucemie acute, ma senza ancora chiari risultati. Ciò che risulta noto è che il sesso maschile, l'età (<1 anno o >60 anni), e l'appartenenza a determinati gruppi etnici possano essere considerati fattori di rischio per lo sviluppo delle LAL-B (5) anche se i meccanismi che portino in tali categorie a una maggior incidenza della patologia non siano noti, così come per le radiazioni ionizzanti, certe sostanze chimiche e alcuni virus riconosciuti per avere un'azione leucemogena. Pur non conoscendone il *primum movens*, le odierne tecniche di indagine molecolare hanno permesso di individuare sempre più mutazioni genetiche e disregolazioni di espressione genica alla base dello sviluppo neoplastico delle leucemie. L'utilizzo di queste metodiche risulta pertanto fondamentale per la diagnosi e la stadiazione della malattia, nonché per stabilire la scelta terapeutica corretta e per valutare la prognosi.

## 1.2 Clinica

Le leucemie acute linfoidi si presentano all'esordio con segni di insufficienza midollare dovuti all'espansione del clone blastico nell'ambiente midollare a discapito delle altre linee cellulari, uniti ai segni di possibile invasione neoplastica extramidollare e linfocitosi plasmatica. Nelle leucemie acute normalmente l'invasione midollare dei blasti è infatti superiore al 90%, e un'invasione inferiore al 50% la si ritrova solo nel 4% dei pazienti (4). La rapidità dell'insorgenza dei sintomi può variare da giorni a sviluppo in settimane o mesi. I pazienti quindi potranno presentare sintomi come tachicardia, pallore, faticabilità dovuti all'anemia per perdita della normale funzione eritroide del midollo. Insieme a ciò si potranno sviluppare epatomegalia e splenomegalia come conseguenza dell'attivazione dell'eritropoiesi extramidollare. Come conseguenza della perdita dello sviluppo mielo-monocitico invece il paziente sarà soggetto a un maggior rischio infettivo, specialmente batterico, dovuto alla mancanza di neutrofili e dei leucociti in generale. Infine, come conseguenza della piastrinopenia, i pazienti saranno fortemente a rischio di emorragie sia interne che esterne, anche solo per piccoli traumi, nonché spontanee.

Oltre a ciò, circa il 50% degli adulti presenta anche sintomi dovuti al coinvolgimento sistemico causati principalmente dal rilascio in circolo di citochine o dall'invasione extramidollare delle cellule neoplastiche, con possibile coinvolgimento linfomatoso (50% dei pazienti), cutaneo, neurologico, testicolare e mediastinico principalmente.

#### Sintomi della LAL

Da sostituzione midollare		<ul style="list-style-type: none"> <li>- pallore e intolleranza allo sforzo</li> <li>- epatomegalia</li> <li>- splenomegalia</li> <li>- suscettibilità alle infezioni</li> <li>- diatesi emorragica</li> </ul>
Da coinvolgimento sistemico	per i mediatori rilasciati	<ul style="list-style-type: none"> <li>- febbre</li> <li>- sudorazioni notturne</li> <li>- prurito</li> <li>- perdita di peso</li> <li>- dolori ossei, muscolari, articolari</li> </ul>
	per la localizzazione	<ul style="list-style-type: none"> <li>- linfadenopatie</li> <li>- localizzazione cutanea</li> <li>- segni neurologici per localizzazione cerebrale (ipertensione intracranica, paralisi)</li> <li>- localizzazione testicolare (tumefazione ± dolore)</li> <li>- localizzazione in masse mediastiniche (sindrome mediastinica) e/o addominali.</li> </ul>

Tabella 2

Il sistema nervoso e testicolare sono denominati organi santuari, la cui invasione da parte della malattia è da considerarsi come un fattore prognostico negativo in quanto correlato a probabilità di ricaduta maggiore, anche in pazienti che avevano ottenuto una remissione completa.

### 1.3 Diagnosi

La diagnosi di leucemia acuta linfoblastica, indirizzata dalla clinica, in prima istanza si basa sull'indagine istologica di campione prelevato da aspirato o biopsia midollare.

Il riconoscimento di cellule blastiche allo striscio di sangue periferico e/o all'aspirato midollare rispetto alla popolazione cellulare normale è di solito facilmente eseguibile, ma essendo cellule blastiche originate da precursori lo studio della sola morfologia non permette la differenziazione pre-linfocita T/B e a volte, se il clone blastico origina da una cellula ancora molto indifferenziata, può risultare impossibile anche la differenziazione al microscopio tra precursore mieloide e linfoide.

Per questo la conferma diagnostica necessita di tecniche più specifiche quali l'immunoistochimica e la citofluorimetria.

#### 1.3.1 Diagnosi citogenetica

La diagnosi morfologica suddivide le LAL B in tre citotipi:

- L1: LAL a blasti piccoli e omogenei, alto rapporto N/C
- L2: LAL a blasti eterogenei
- L3: LAL a blasti grandi e basofili, con citoplasma ipervacuolato e abbondanti nucleoli (cellule molto indifferenziate)

Il riconoscimento di uno specifico istotipo di blasto comunque non correla strettamente con l'immunofenotipo e le anomalie genetiche, e frequente è la presentazione a istotipi misti (6). Ai fini dello studio diagnostico citogenetico è sufficiente il materiale ottenuto da striscio di sangue periferico, se blastosi plasmatica presente, o dell'aspirato midollare. Per le indagini chimico-molecolari invece è necessario il materiale ottenuto tramite biopsia midollare, che deve essere prelevato per l'analisi morfologica anche laddove l'agoaspirato non abbia raccolto un campione sufficiente allo studio.

### 1.3.2 Immunoistochimica e citofluorimetria

La diagnosi immunoistochimica di LAL si basa sulla positività PAS (Periodic Acid Schiff) e negatività per la mieloperossidasi (diagnosi differenziale con LAM) più o meno positività per DNA nucleotidil-esotrasferasi (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT, risultato aspecifico ai fini della diagnosi).

L'immunofenotipo invece studia la presenza di determinate molecole di superficie proprie delle cellule linfocitarie per differenziarle dalla schiera mieloide, e nello specifico per differenziare la natura del clone neoplastico tra precursori B e T.

Inoltre lo studio dell'espressione di tali molecole di superficie e citoplasmatiche è divenuta ormai fattore determinante per l'orientamento prognostico e terapeutico.

Marcatori linea specifici	
	Marcatori
Leucocitico comune	CD45
LAL comune	CD10 (CALLA)
Stem-cell specifico	CD34
B-specifici	CD19, CD20, CD22, CD79a , CD38,ZAP-70,HLA-DR
T-specifico	CD3
Mieloide-specifici	CD13,CD33,CD65,CD15,CD14

Tabella 3

Il profilo immunofenotipico nelle LAL a precursori B sarà quindi CD45 +/- CD3- .

In base all'espressione delle altre molecole di superficie invece si possono individuare

- Immunofenotipo B1: LAL pro-B (early precursor B) CD19+, CD79a+ (superficie) e CD22+(citoplasma).
- Immunofenotipo B2: LAL comune CD10+.
- Immunofenotipo B3: late pre-B LAL CD20+,  $\mu$  heavy chain (citoplasma).

La classificazione prevede anche l'immunofenotipo B4, caratterizzato da positività per CD22 e  $\mu$  heavy chain di superficie, che rappresenta l'immunofenotipo delle LAL a cellule B mature.

Marcatori B specifici

	B1	B2	B3	B4
CD19	+-	+	+	+
CD22	(+)	(+)	(+)	+
CD10	-	+	+	-
Catene u cit.	-	-	+	-
Ig di membrana	-	-	-	+
HLA-DR	+	+	+	+
TdT	+	+	+-	-

(-) = la positività può essere citoplasmatica;

Tabella 4

Il 40% delle leucemie linfoblastiche a precursori B si presenta con positività per CD34.

In un 30% di LAL a precursori B è possibile riscontrare una concomitante positività anche per le molecole di superficie e citoplasmatiche proprie della linea mieloide come CD13, CD33, CD15, CD14, CD65, LAL così dette 'bifenotipiche' (8).

L'espressione di antigeni particolari è stata correlata a particolari mutazioni. Ad esempio l'espressione di CD13 e CD33 q associata al riarrangiamento che coinvolge il gene ETV6 e CBFA2, tipico in t(12;21)(p12;q22). La coespressione di CD68, CD15, e CD33 è stata correlata a riarrangiamenti come t(4;11) coinvolgenti il gene mixed lineage leukemia (MLL) (8).

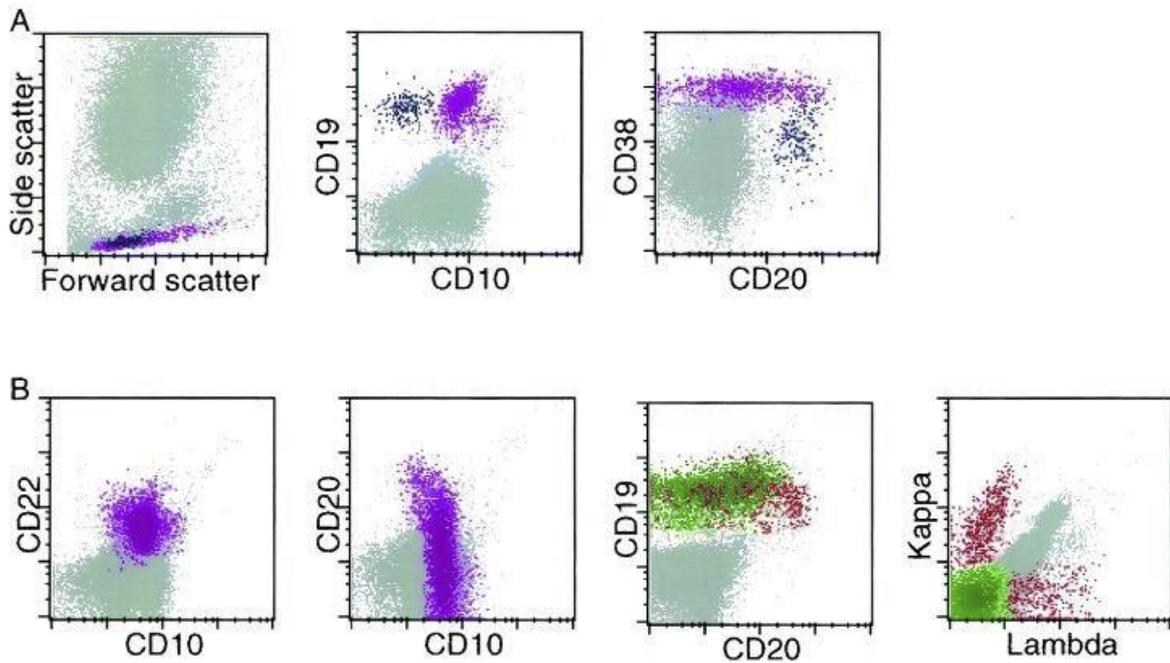


Figura 2

A) Haematogones (violet) and mature B cells (blue) in a normal bone marrow. In this example with mild haematogone hyperplasia (3.0%), the haematogones show a wider forward scatter spectrum than mature B cells CD10(+), CD38(high) and CD20(variable). The mature B cells are CD19(+), CD10(-), CD20(+) and CD38 (variable). (B) Bone marrow specimen with haematogone hyperplasia (16%) but virtually no mature B cells. Left panels: virtually all CD22(+) lymphoid cells (violet) are CD10(+) and show the characteristic maturation spectrum in the CD10/CD20 dot plot. Right panels: While the majority of CD19(+) haematogones are surface immunoglobulin negative (green), a subset show acquisition of polytypic surface light chain (red). Note that the haematogones acquire light chain at various stages in their maturation sequence, but that the most mature haematogones (brightest for CD20) are essentially all light chain positive.

### 1.3.3 Citogenetica

Le LAL presentano quasi tutte un'alterazione genetica alla base che permette la loro caratterizzazione.

Individuare quale meccanismo genetico difettivo stia all'origine dello sviluppo del clone neoplastico ci è utile sia per comprendere il meccanismo patogenetico, e poter così sviluppare tecniche terapeutiche specifiche, ed inoltre per effettuare una valutazione prognostica. Studi citogenetici con tecniche avanzate come la FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) delle cellule neoplastiche hanno mostrato alterazioni cromosomiche fino all'80% dei casi (9). Nelle LAL a precursori B le anomalie genetiche più frequenti riguardano le traslocazioni di geni regolatori, come ETV6-RUNX, TEL-AML1, geni homeobox o leganti il DNA, come TCF3-PBX1, E2A-PBX1, MLL, oppure geni codificanti per una tirosin-chinasi, come BCL-ABL (cromosoma Philadelphia) o alterazioni BCR-ABL like (alterazioni nella via di JAK/STAT e RAS).

Oltre all'espressione ectopica di geni di fusione, l'origine genetica della malattia può essere caratterizzata dalla disregolazione di protooncogeni, spesso traslocati sotto il controllo dei promotori per i geni delle Immunoglobuline, oppure nella delezione di geni regolatori responsabili della maturazione cellulare linfoide, come IKZF1, EBF1, PAX5 (1).

Le traslocazioni più frequenti nell'adulto sono t(9;22), t(8;14), t(4;11), t(1;19), t(12;21).

La traslocazione tra il cromosoma 9 e il cromosoma 22, t(9; 22)(q34;q11), è la più comune negli adulti ed è stata descritta con l'individuazione del cromosoma Philadelphia. Comunemente le leucemie con questa traslocazione vengono definite Philadelphia positive (Ph+). Si osservano nel 25% circa delle LAL-B nell'adulto (solo nel 5% nel bambino), e l'incidenza aumenta con gli anni (40/50% oltre i 65 anni)(10). Il prodotto della traslocazione è il gene di fusione BCR-ABL1. Questo gene ABL codifica per una proteina chimerica dotata di intrinseca attività tirosin-chinasica che promuove la proliferazione cellulare attraverso la via di RAS, inibendone l'apoptosi. Determina inoltre un'alterazione dell'adesione cellulare nel microambiente midollare (1). Ciò che ne risulta è un'iperespressione di tale proteina.

Il cromosoma Philadelphia è associato a una pessima prognosi negli adulti. Un gran numero di LAL-B Ph<sup>+</sup> sono associate alla mutazione che provoca la perdita di funzione del gene IKZF1 (12), denominato IKARO, che codifica per una proteina nucleare molto importante nel controllo dello sviluppo linfoide. Presenta un dominio a dita di zinco con il quale è in grado di legare il DNA e svolgere la sua funzione regolatoria, ed è appunto in tale sito che sono state riscontrate le mutazioni più frequenti che comportano un'alterazione nella normale ematopoiesi.

Recentemente è stato descritto anche un gruppo di leucemie Ph<sup>-</sup> con mutazioni di IKZF1, a prognosi infausta. (13).

Gli inibitori selettivi delle tirosin-chinasi sono una nuova classe di farmaci non chemioterapici che inibiscono selettivamente il gene mutato e hanno migliorato di molto la prognosi. Saranno discussi nel capitolo 3.

La traslocazione che coinvolge 11q23 q anch'essa una traslocazione associata a cattiva prognosi. Sono state evidenziate traslocazioni con più di 20 loci che complessivamente sono evidenziabili tra il 5 e il 7% delle LAL-B (14),(15). La traslocazione più frequente è la t(4;11)(q21;q23), la t(11;19) è la seconda per frequenza, correlata fino al 50% dei casi a LAM invece. Le leucemie con una traslocazione coinvolgente 11q23 condividono tutte alcune caratteristiche cliniche come iperleucocitosi, morfologia L1 o L2, un immunofenotipo immaturo CD19<sup>+</sup> CD10<sup>-</sup> HLA DR<sup>+</sup> e la frequente coespressione di antigeni mieloidi. Alcuni blasti possono sembrare monocitici ed esprimere la mieloperossidasi ed esterasi aspecifiche granulocitarie e in rari pazienti la quota di blasti ad aspetto mielo-monocitico e quella di blasti linfoidi può essere simile (16). Queste traslocazioni riguardano il gene KMT2A, precedentemente chiamato MLL (mixed-lineage leukemia). Il gene codifica per la lisina(K)-specifico metiltransferasi 2A, fondamentale per la regolazione dell'emopoiesi. Il danno a KMT2A q più tipico del bambino, e così come nell'adulto, è associato a una cattiva prognosi: si ha una sopravvivenza media di 7 mesi negli adulti (17).

La traslocazione tra il cromosoma 1 e il cromosoma 19, t(1;19)(q23;p13) o più raramente t(17;19)(q21;p13) si riscontra negli adulti con una frequenza tra il 4 e il 5%(1). La traslocazione è molto frequente nelle LAL-B B2. Il gene di fusione che si forma contiene una regione del gene TCF3 del fattore di trascrizione E2A e la regione HOX (homebox) del gene PBX1, codificante per fattori di trascrizione leganti il DNA e normalmente non espresso dai progenitori linfoidi. La presenza di questa traslocazione determina un peggioramento della prognosi.

La traslocazione tra il braccio corto del cromosoma 12 e il braccio lungo del cromosoma 21, t(12;21)(p12;q22), è comune nelle LAL-B dell'infanzia e riguarda l'1-3% delle forme negli adulti(1). Si usa la RT-PCR per identificarla. Sono fusi il gene RUNX1 (AML1) sul cromosoma 21 e il gene ETV6 (TEL). TEL modula negativamente la trascrizione e AML1 è un fattore di trascrizione. La proteina di fusione TEL/ALM1 inibisce la funzione normale di TEL. La traslocazione da una prognosi positiva, attorno al 91% di sopravvissuti a 5 anni (18).

La traslocazione tra il braccio lungo del cromosoma 8 e il braccio lungo del cromosoma 14 può essere presente nelle LAL-B sebbene sia tipica del linfoma di Burkitt. Questa traslocazione correla col fenotipo L3 secondo la classificazione FAB, tant'è che tale istotipo può essere considerato come specifico dell'espressione leucemica del LB ed è infatti sempre associato all'immufenotipo maturo B4(1).

Prognosticamente questa traslocazione è la più sfavorevole, l'event-free survival è di due mesi (17).

La delezione di un piccolo tratto del braccio corto del cromosoma 9, identificabile tramite FISH, riguarda tra il 5 e il 10% delle LAL-B. Può occorrere come singola anomalia o coesistere con altre delezioni (19). I geni coinvolti sembrano essere JAK2 e PAX5.

Alterazioni genetiche sub-microscopiche sono alterazioni che riguardano singoli geni o frammenti non visibili con metodiche citogenetiche o alterazioni dell'espressione del profilo dei geni. Sono visibili grazie attraverso la metodica di gene expression profiling, che ricerca l'espressione di singoli geni e analizza la metilazione epigenetica ad opera dei microRNA. Sembrano correlare con la prognosi. Ricerche genomewide hanno evidenziato mutazioni che alterano singoli geni in pazienti leucemici senza alterazioni cromosomiche (20). I geni PAX5, TCF3 e EBF1 e IKZF1 erano i più frequentemente mutati somaticamente o deleti. L'analisi del profilo di espressione genica ha evidenziato un sottogruppo di LAL-B Ph- che condividono il profilo di espressione delle LAL-B Ph+. Questo sottogruppo comprende il 26% degli adulti. L'anomalia alla base di tale profilo genico sembra essere in un sottogruppo la sovraespressione di CRLF2, un recettore per dei fattori simili alle citochine, in un altro la deregolazione di vari target nel pathway di segnalazione delle tirosin-chinasi come JACK2, PDGFRB e ABL1 (21). Questo gruppo è stato connesso a una prognosi sfavorevole (22).

Le aneuploidie, definite come alterazioni nel numero dei cromosomi non sono specifiche per le LAL-B quindi non hanno una valenza diagnostica ma sono molto importanti per lo score prognostico.

L'iperdiploidia, oltre 47 cromosomi, è riscontrata nel 2-10% delle LAL dell'adulto (alta % fascia 47 Cr, o 55-65 Cr)(15). I Cromosomi 8 e 21 sono quasi sempre duplicati nei pazienti con iperdiploidia, a seguire i cromosomi X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, mentre il riscontro di duplicazione dei cromosomi Y, 1-3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 16, 19, 20 non è significativo(24).

L'ipodiploidia, divisa in cariotipo high hypodiploid(40-44 Cr.), low hypodiploid (32-39 Cr.) e near-aploid(23-31), è anch'essa rara, e si riscontra nel 5% delle LAL-B indipendentemente dall'età (25). Le alterazioni genetiche che spesso più vi si associano, specie per il cariotipo low-hypodiploid, sono delezione del gene TP53 (91%), IKZF2(53%), RB1 (41%) (26).

## 1.4 Prognosi

L'80% dei pazienti adulti con LAL-B ottiene oggi una remissione completa.

Il tasso di ricaduta è però alto e corrisponde al 50% (27). Non è possibile predire con certezza chi otterrà una remissione completa o chi sarà primariamente refrattario.

Grazie a studi retrospettivi sulle caratteristiche biologiche dei pazienti, nonché agli studi citogenetici sopra menzionati, è possibile però individuare uno score prognostico paziente-specifico. Questo ci serve nell'indirizzare il paziente a cicli chemioterapici o altri trattamenti secondo schemi più o meno aggressivi e cercare di individuare subito i pazienti che potrebbero primariamente non rispondere, definiti refrattari, e quelli ad alto rischio di ricaduta.

Esercitare regimi più intensi di trattamento nei pazienti ad high risk (HR) e very high risk (VHR) ci permette di aver maggior Disease Free Survival (DFS, tempo libero da ricaduta dopo remissione) e maggior tasso di Overall Survival (OS, sopravvivenza media), mentre per i pazienti a standard risk (ST) è possibile mantenersi a regimi più moderati riducendo così i tassi di eventi avversi (AEs, Adverses Events) e mortalità correlati al trattamento, pur mantenendo buoni risultati in termini di sopravvivenza a lungo termine.

Molti centri di ricerca ematologica hanno messo a punto trials clinici e indagini retrospettive per individuare i fattori a maggior valenza per definire lo score prognostico, tutti più meno riportanti le stesse considerazioni. In questa sede mi rifaccio ai risultati ottenuti dal gruppo del Dr Gokbuget et Dr Holzer, Università di Francoforte, in linea con i parametri considerati nei protocolli Amgen, su cui si basano gli studi della mia tesi.

L'età è sicuramente uno dei fattori chiave: adolescenti e giovani adulti hanno prognosi migliore, mentre al di sopra dei 35 anni peggiora man mano che si avanza con l'età.

L'iperleucocitosi invece riflette la massa tumorale, pertanto maggiore sarà il numero di blasti circolanti alla diagnosi peggiore sarà l'outcome finale, soprattutto per il più elevato rischio di recidiva anche dopo remissione clinica ottenuta.

Dal punto di vista immunofenotipico, essere CD10 negativi è un fattore a cattiva prognosi, quindi nei pazienti LAL a precursori B il fenotipo pro-B (B1) sarà quello più sfavorevole (28).

Fattori prognostici e stratificazione di rischio per adulti LAL+ (Gokbuget and Holzer,2009)

Parametri	Favorevoli	Sfavorevoli (B-Lineage)
Età al tempo della diagnosi	<25 anni, <35 anni	>35 anni, >50 anni, >70 anni
GB alla diagnosi	<30.000/ $\mu$ L	>30.000/ $\mu$ L
Ottenimento di CR dopo prima linea di trattamento(induzione)	Precoce	Tardiva (>3-4 settimane)
Immunofenotipo	\	Pro-B-LAL
Citogenetica	Ph-	t(9;22)bcr-abl t(4;11)/ALL-AF4
MRD dopo terapia di induzione	Negativa (<10 <sup>-4</sup> )	Positiva (>10 <sup>-4</sup> )

Tabella 5

Malattia Minima residua (MDR, vedi sezione 6.1.7) e cariotipo costituiscono due variabili di recente interesse, poiché necessitanti di tecnologie avanzate per la loro acquisizione, di cui si è vista crescere l'importanza fino a recenti risultati che riportano appunto tali parametri come fattori prognostici indipendenti.

Valore prognostico MRD in LAL adulti

AUTORE	GRUPPO	METODO	N°	MODELLO	DFS
Bruggemann ,2006	GMALL	PCR	105	<10 <sup>-4</sup> d11+ <10 <sup>-4</sup> d24	100%
				>10 <sup>-4</sup> d11+ >10 <sup>-4</sup> d24	6%
				All others	53%
Holowiecki ,2008	PALG	Flow	115	<10 <sup>-3</sup> (4 week)	61%
				>10 <sup>-3</sup> (4 week)	17%
Bassan ,2009	NILG	PCR	142	<10 <sup>-4</sup> wk16, <10 <sup>-4</sup> wk22	72%
				All others	14%

Tabella 6

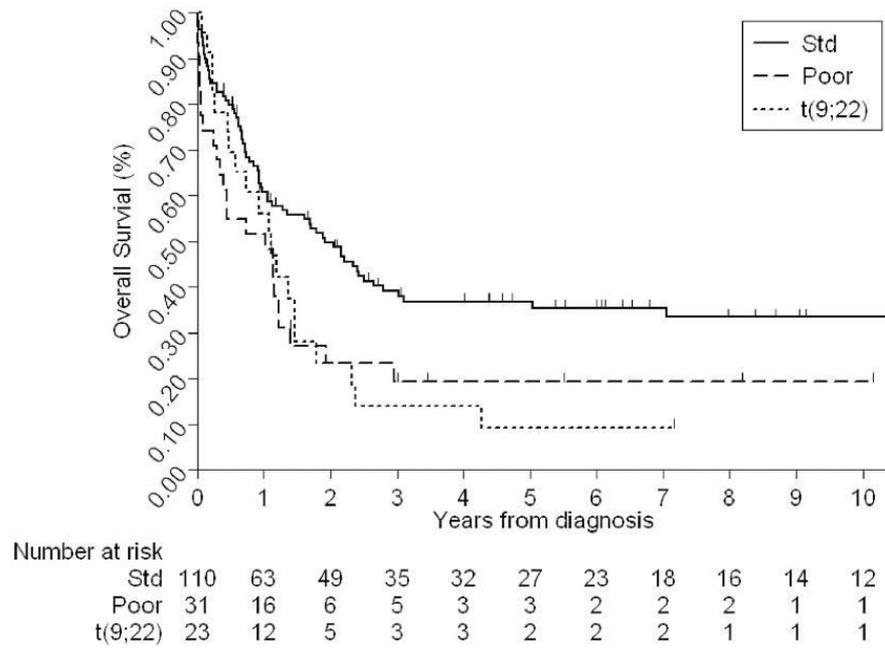
DSF = Disease Free Survival: 3 years Bruggemann,Holowiecki; 5 years Bassan.

Anomalie genetiche a valore prognostico. (1)

ALTERAZIONE CROMOSOMICA	CRO-	GENI COIN-VOLTI	VALENZA PRO-GNOSTICA	FREQUENZA NELLE LAL adulti
t(12;21)(p12;q22)		TEL-AML1	Favorevole ++	3%
t(1;19)(q23;p13)		PBX1-EA2	Sfavorevole	3%
t(17;19)(q22;p23)		E2A-HLF	Sfavorevole	<1%
t(9;22)(q34;q11)		BCR-ABL	Sfavorevole	25-40%
BCR/ABL like			Sfavorevole	
		Del IKZF1	Sfavorevole	
t(4;11)(q21;q23)		MLL-AF4	Sfavorevole	3%
t(8;14)(q24;q32)		c-MYC-IGH	Sfavorevole	<1%
t(X;14)(p22;q32); t(Y;14)(p11;q32)		CRLF2-IGH	Sfavorevole	5%
Near aneuploidy			Sfavorevole --	<1%
Hypodiploidy			Sfavorevole	4%
Hyperdiploidy			Favorevole	2%

Tabella 7

Il gruppo del Dr Moorman ha svolto uno studio nel 2010 retrospettivo di 164 pazienti stratificati per rischio prognostico citogenetico che ha dimostrato (Figura 6) come tale suddivisione correlava direttamente con l'OS con differenze significative tra i tre gruppi (rischio standard, alto rischio, Ph+):



OS of adults with ALL by cytogenetic risk group (30).

Figura 3

## 2. Terapie tradizionali delle LAL-B: stato dell'arte

Il trattamento delle leucemie acute a cellule B dell'adulto si basa su diversi schemi terapeutici differenziati in base all'età e la classe di rischio di appartenenza. Poiché sono pazienti che si presentano con una sintomatologia spesso acuta quale infezioni acute, emorragie, insufficienza renale, anemia, il primo trattamento deve sicuramente essere sintomatico, nell'attesa di pianificare la strategia migliore ed attivo nella riduzione del numero di blasti. Tutti i regimi terapeutici comunque prevedono una fase di induzione di remissione.

La risposta a questa prima fase è molto importante anche per la rivalutazione del rischio di malattia, non ottenere una remissione completa, definita come conta blastica al midollo osseo <5% (vedi specifica sezione 6.1.4), è un fattore di negativa prognosi.

I pazienti in CR sono trattati poi secondo uno schema di consolidamento, che può prevedere più cicli al suo interno, e infine con un regime di mantenimento, della durata media di due anni. Per pazienti resistenti al primo ciclo o quelli ricaduti in qualsiasi momento della terapia sono previsti invece cicli così detti di 'salvataggio'. Oggi fortunatamente si stanno sviluppando farmaci biologici e terapie target ad alta efficacia nei confronti del clone neoplastico con un'azione maggiormente specifica contro il clone leucemico. Le terapie tradizionali delle LAL-B si basano principalmente sull'uso combinato di chemioterapici e.v. con ausilio di radioterapia e chemioterapia intrarachide.

### 2.1 Esami da eseguire prima della terapia

Per porre diagnosi di LAL-B e indirizzare lo schema terapeutico sono necessari tutta una serie di esami da compiere prima dell'inizio della terapia, quali:

- Mielobiopsia (agoaspirato)
- Biopsia osteomidollare
- Raccolta di midollo per citogenetica
- Aspirato per biologia molecolare: 5x7 cc EDTA
- Aspirato per immunofenotipo: 5 cc EDTA

Deve poi essere eseguita anche una ristadiazione radiologica della malattia e prelievo di sangue periferico per valutazione dell'emocromo, funzionalità epatica, renale, glicemia, elettroliti plasmatici, latticodeidrogenasi (LDH), acido urico, albumina e proteine totali. Questo sia per valutare il performance status del paziente prima dell'inizio della terapia sia per la valutazione di eventuali patologie o deficit d'organo soggiacenti. Quasi tutti i chemioterapici infatti sottendono una tossicità organo specifica quindi la presenza di determinate patologie proscrive l'utilizzo di alcuni e quindi tali indagini di laboratorio sono molto importanti per la scelta terapeutica nonché per il follow-up del paziente sotto trattamento per avere valori iniziali di riferimento da usare come confronto per individuare subito l'insorgenza di una sofferenza d'organo significativa.

La funzionalità cardiaca deve essere indagata con un'ecografia cardiaca e un elettrocardiogramma. In presenza di una sintomatologia nervosa devono essere fatti esami radiologici e/o liquorali per indagare la presenza di malattia a carico del SNC.

A tutti i pazienti deve essere comunque eseguita una puntura lombare con prelievo del liquor per indagare la presenza di cellule blastiche; in presenza di blastosi plasmatica tale esame però non viene eseguito normalmente per evitare una contaminazione iatrogena a carico del SNC e viene posticipato alla scomparsa dei blasti allo striscio di sangue periferico. Per le donne in età fertile dovrà essere eseguito un test di gravidanza, e sarebbe buona norma indirizzare il paziente, sia uomo che donna, a un counseling sui possibili danni della terapia sulle capacità riproduttive e valutare eventuali tecniche di criopreservazione. Dovrà infine essere effettuata un'indagine infettivologica con esame obiettivo del cavo orale, raccolta dello sciacquo buccale, auscultazione polmonare e radiologia del torace, nonché esami sierologici per HBV, HSV e CMV. L'utilizzo di alcuni chemioterapici prevede anche una visita oculistica all'inizio del trattamento e lungo il decorso della terapia per la loro possibile tossicità sull'apparato visivo. Per effettuare la chemioterapia è necessario l'inserimento di un catetere venoso centrale (CVC), o un PICC (Peripherally Inserted Central Catheters).

## 2.2 Terapie della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia negativa

### 2.2.1 Induzione alla remissione nella leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia negativa

Gli schemi terapeutici utilizzati per indurre una prima remissione nei pazienti con LAL-B sono molteplici ed al momento nessun trattamento che ha mostrato un'incidenza maggiore di remissione clinica (CR) significativa rispetto agli altri.

La percentuale di pazienti che ottiene una risposta ai normali regimi di induzione è circa l'80% (31).

Il regime di induzione deve prevedere dosi di chemioterapia sostenibili per l'organismo del paziente in termini di tossicità e AEs, ma allo stesso tempo sufficienti a indurre subito una CR e prevenire l'insorgenza di resistenze (che comporterebbero appunto refrattarietà del clone o ricadute di malattia). La chemioterapia deve inoltre essere eseguita anche negli organi santuari (definiti tali poiché non raggiunti dai normali trattamenti e.v.) anche quando non primariamente infiltrati dalla malattia.

La ricaduta dei pazienti trattati con profilassi a livello del SNC è del 5% soltanto rispetto a un tasso di ricaduta del 30% a livello nervoso nei pazienti non sottoposti a tale trattamento (32). I più comuni schemi terapeutici prevedono l'utilizzo di Vincristina, Corticosteroidi e Antracicline (33, 34, 35).

Queste tre categorie di farmaci sono spesso associati ad altri chemioterapici; utilizzare una polichemioterapia permette infatti di ridurre le dosi degli agenti singoli, riducendo così la tossicità dose-dipendente, e di incrementare i meccanismi di azione attivi contemporaneamente contro il clone neoplastico.

Gli schemi maggiormente utilizzati sono:

- Schema Hyper-CVAD-Modified regimen: polichemioterapia basata su alte dosi di Ciclofosfamide iperfrazionata, associata a Vincristina, Adriamicina (detta anche doxorubicina) e Desametasone alternata a cicli di metrotexate (MTX) ad alte dosi e citarabina, con iniezioni intratecali secondo il rischio specifico del paziente.
- Schema GRAAL-2003: polichemioterapia basata su alte dosi di prednisone, vincristina e asparginasi in combinazione a daunorubicina, ciclofosfamide e metrotexate(MTX) intratecale.
- Schema CALGB (Cancer and Leukemia Group B) 8811/9111: polichemioterapia che prevede l'utilizzo di ciclofosfamide, daunorubicina, vincristina, prednisone, asparginasi per 4 settimane (seguite da cicli di intensificazione con alternanza di numerosi chemioterapici quali doxorubicina, desametasone, tioguanine, citarabina, mercaptopurina e profilassi intratecale con metrotexate e radiazioni).
- Schema BFM (Berlin-Frankfurt-Munster): polichemioterapia basata su vincristina, daunorubicina, prednisone, asparginasi associati a infusioni intratecali di citarabina e metrotexate.

Tutti questi schemi si rifanno a schemi pediatrici modificati.

La Ciclofosfamide è un agente alchilante che si lega al DNA impedendone la sintesi e quindi inibisce la replicazione cellulare; è attivo su cellule in ciclo mitotico (36).

L'Asparaginasi è un enzima che scinde l'aminoacido asparagina in ammonio e acido L-aspartico. Le cellule normali del nostro organismo sono in grado di sintetizzare tale aminoacido autonomamente, con eccezione delle cellule leucemiche linfoblastiche che necessitano di assunzione esogena. La deplezione dell'asparagina in queste cellule blocca la sintesi proteica e quindi la replicazione cellulare. Anch'esso è un farmaco ad attività ciclo-dipendente specifico per la fase G<sub>1</sub>. Rimane comunque un farmaco ad alta tossicità con EAs anche gravi come coagulopatie, pancreatiti acute, danno epatico, gravato anche da reazioni anafilattiche all'infusione. Ne esistono diverse formulazioni: l'utilizzo di Asparginasi pegilata estratta da *E. coli* rispetto alla normale asparginasi, sempre ricavata dall'enterobatterio, oltre ad avere un'emivita aumentata di 6 giorni invece che di 24 ore, sembra avere anche minor potere immunogeno e causare minor numero di reazioni allergiche. (38) (39). Rimane comunque un farmaco utilizzato nel trattamento del giovane adulto dove il vantaggio di OS che comporta è bilanciato rispetto al rischio di decesso in corso di trattamento.

Il Metotrexate è invece un antimetabolita dell'acido folico. Inibisce la sintesi, la riparazione, e la replicazione cellulare. Legando irreversibilmente la diidrofolato reductasi e la timidilato sintetasi impedisce il metabolismo dei folati e la sintesi di Timina, una base essenziale alla sintesi del DNA. E' attivo contro le cellule in ciclo replicativo, specifico per la fase S.

La Citarabina\_ infine, è un analogo delle basi puriniche. Una volta entrato nelle cellule viene convertito a forma attiva aracitidina trifosfato e sostituisce le pirimidine durante la replicazione del DNA, rendendo però impossibile una successiva duplicazione poiché inibisce la DNA polimerasi; così facendo impedisce il passaggio dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S del ciclo cellulare.

Diversi studi hanno dimostrato inoltre che associare ai normali hyper-CVAD-based regime e BFM regime l'anticorpo monoclonale MAb anti CD20 (rituximab) aumenta sia l'OS che la % di ottenimento di remissione clinica, nei pazienti con età inferiore ai 60 anni (40).

Il trattamento è comunque modulato secondo le caratteristiche specifiche del paziente.

Specialmente per età superiori ai 55 anni le dosi possono essere diminuite per ridurre la tossicità. Un'attenzione particolare va posta nell'utilizzo delle antracicline, ad alta cardiotoxicità, proscritte infatti nei pazienti cardiopatici, e la cui dose massima, contando tutti i cicli di trattamento che siano in induzione, consolidamento o salvataggio non deve mai eccedere determinati valori.

Nel caso in cui il paziente presenti coinvolgimento del SNC alla diagnosi indipendentemente dal regime di induzione scelto, la profilassi intratecale o il regime ad alte dosi di farmaci che sorpassano la BEE, come MTX e citarabina, deve essere sostituita da un trattamento più aggressivo combinato di radioterapia (2400cGy in 12 dosi) e chemioterapia (6 infusioni intratecali di metotrexate).

Valutazione della risposta: La rivalutazione dello stato di malattia viene eseguita quando sono ripristinati i valori periferici al di sopra della soglia limite di neutrofili ( $\geq 1000/\mu\text{L}$ ) e piastrine ( $\geq 100.000/\mu\text{L}$ ), ad indicare la ripresa di una normale funzione cellulare.

L'esame che viene eseguito è la biopsia midollare, non sostituibile con mielobiopsia o prelievo di sangue periferico. Il paziente si considera avente ottenuto una remissione clinica e aver quindi risposto alla terapia se la conta blastica nel campione prelevato è inferiore al 5% e vi è una ripresa della normale ematopoiesi in quantità  $\geq 25\%$  della cellularità totale.

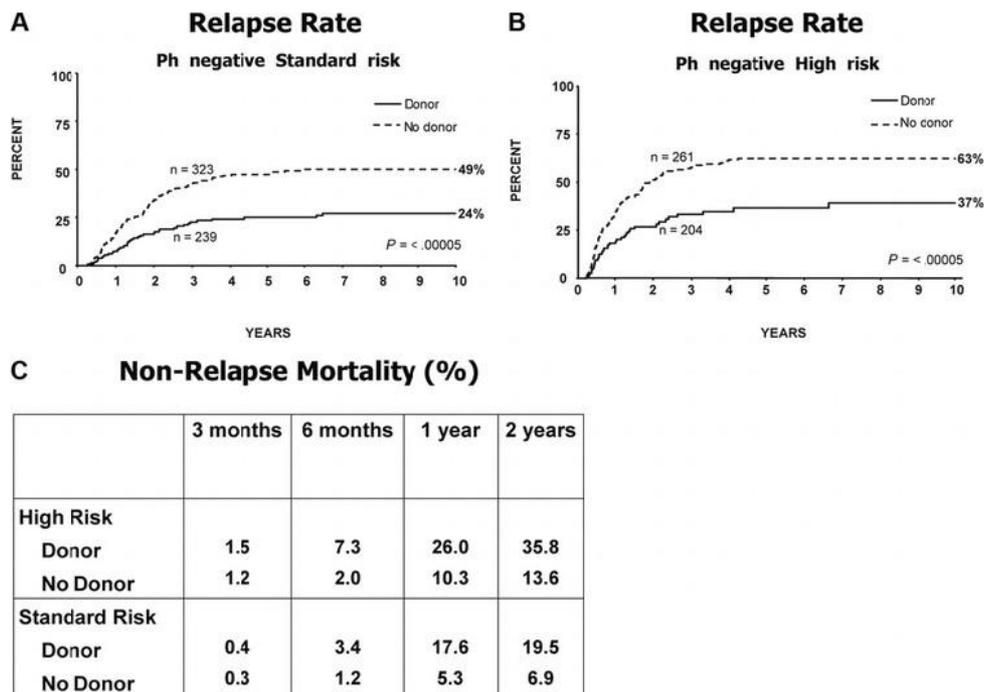
## 2.2.2 Consolidamento della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia negativa

I pazienti che hanno risposto alla prima terapia, se lasciati senza trattamento hanno un'altissima percentuale di ricadere.

Con remissione clinica infatti intendiamo che la componente blastica è scesa al di sotto di un valore minimo, ma non che sia completamente assente. Anche quando l'analisi citogenetica è totalmente negativa può rimanere una quota rilevabile a livello molecolare, detta Minimal Residual Disease, che comporta un rischio di ricaduta pari al 94% (41). L'obiettivo primario della terapia di consolidamento è appunto mantenere il paziente in CR ed eliminare la componente molecolare residua, laddove presente, consolidando il risultato ottenuto con la terapia di induzione. La tipologia del trattamento viene modellata in base alle condizioni di rischio del paziente (14).

La sopravvivenza media a 4 anni ottenuta con tali terapie varia dal 40 al 60%.

Vero è che il trapianto di cellule da donatore allogenico (allo TMO) presenta curve di ricaduta minori rispetto all'utilizzo della sola chemioterapia ma è gravato da mortalità trattamento-relata pari al 20%, rispetto a un solo 5% della chemioterapia, e da morbidità sul lungo periodo spesso invalidanti (vedi Figura 7). Per questo a oggi, lo stato dell'arte non prevede l'utilizzo di tale tecnica nei pazienti a basso rischio.



Mortalità e Rischio di Ricaduta correlate al trattamento. (Goldstone et al.,2008)

Figura 4

### 2.2.3 Mantenimento della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia negativa

I pazienti trattati con chemioterapia di consolidamento, al termine della quale hanno preservato la remissione clinica, sono candidati a continuare la linea di terapia chemioterapica nella terza e ultima fase di trattamento definita chemioterapia di mantenimento.

Non esiste uno schema specifico validato dall'opinione clinica mondiale; normalmente il regime più utilizzato è il POMP che prevede l'utilizzo giornaliero di 6-mercaptopurina (analogo purinico) associato a una somministrazione settimanale di metrotexate e una somministrazione mensile pulsata di vincristina e prednisone.

La durata media è di 3 anni; non esiste in realtà una stima precisa del tempo di mantenimento ottimale: studi pediatrici a confronto tra pazienti trattati con chemioterapie di 5, 3, 2 anni rispettivamente non hanno mostrato improvement della sopravvivenza media tra i primi due gruppi; al contrario il trattamento con chemioterapici espone a un rischio di morte aumentato per comorbidità legate alla terapia, soprattutto per quanto riguarda il rischio infettivo (44). Lo stesso studio ha però dimostrato una certa differenza tra terapie della durata di 3 anni piuttosto che 2 anni, a favore delle prime, con guadagno in termini di OS significativo e soprattutto in termini di DFS, con minor ricaduta ematologica e testicolare.

Per i pazienti LAL-B Philadelphia negativi che hanno eseguito un trapianto di midollo allogenico invece non è prevista alcuna terapia di mantenimento al di fuori della normale terapia immunosoppressiva prevista per contenere il rigetto, a condizione che non vi sia ricaduta di malattia.

## 2.3 Terapie della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia positiva

La leucemia acuta linfoblastica a cellule B Philadelphia positiva deve essere considerata un'entità a parte per la pratica terapeutica.

Da sempre il cromosoma Philadelphia è stato identificato come un fattore di pessima prognosi. I trattamenti con chemioterapie convenzionali in tali pazienti ottenevano tempi di sopravvivenza media inferiori ai 9 mesi, a causa di ricadute precoci. Grazie all'introduzione nel campo farmaceutico di inibitori selettivi per il prodotto aberrante della traslocazione t(9;22), definiti inibitori tirosin-chinasici TKI, l'outcome in tali pazienti è nettamente cambiato. E' necessario quindi che alla diagnosi di LAL-B il paziente venga subito studiato per evidenziare la presenza o meno di tale traslocazione.

Per farlo sono usate normali tecniche di reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in grado di fare un'analisi qualitativa della presenza dei trascritti p190 piuttosto che p210, e tecniche di RQ-PCR per l'analisi quantitativa del trascritto, ove presente, necessarie per la rivalutazione del paziente in termini di risposta e follow-up.

### 2.3.1 Induzione della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia positiva

La terapia d'induzione in tali paziente prevede l'utilizzo dei normali schemi chemioterapici (CALGB, GRAALL, BFM, Modified-Hyper-CVAD) associati a un inibitore delle tirosin-chinasi TKI. All'interno della famiglia dei TKI esistono diversi composti farmaceutici e di diverse generazioni. Quello normalmente usato in prima linea è l'Imatinib. Molti studi hanno dimostrato percentuali di CR pari al 90-95%, con un netto guadagno in confronto alla sola chemioterapia (CR nel 50%)(45). Non esistono studi a confronto tra i diversi TKI. Imatinib, essendo stato il primo studiato, porta maggior dati in termini di safety e long term follow-up ed è stato approvato come farmaco di prima linea associato a chemioterapia nel trattamento delle LAL Ph+. Alcuni pazienti possono però mostrarsi resistenti a tale farmaco per piccole mutazioni presenti nel dominio tirosin-chinasico di Abl, che non conferiscono invece resistenza per un altro farmaco di questa classe, il Dasatinib.

### 2.3.2 Mantenimento della leucemia acuta linfoblastica a precursori B Philadelphia positiva

Per pazienti LAL-B Ph+ sottoposti a trapianto allogenico, a differenza dei trapiantati Ph-, può essere valutata una terapia di mantenimento con TKI.

Per coloro che hanno ottenuto anche una negativizzazione della MRD non vi sono evidenze cliniche in termini di aumentata OS a 5 anni a favore di coloro che proseguono con TKI per due anni dopo il trapianto rispetto coloro che non assumono alcuna terapia di mantenimento. Al contrario per pazienti che presentano una persistenza di trascritto BCR/ABL a livello molecolare (MRD+) dopo il trapianto la terapia di mantenimento con TKI si è visto ritardare i tempi di ricaduta, comportando così un periodo di EFS maggiore. E' pratica clinica comunque continuare con trattamento TKI per due anni dopo il trapianto nei pazienti che non presentano tossicità gravi o intolleranza a tali farmaci, e per quest'ultimi ritardare il loro impiego solo ad avvenuta ricaduta molecolare (positivizzazione dell'MRD). Per i pazienti che non si sono potuti sottoporre a trapianto, ed è stata quindi perseguita una chemioterapia di consolidamento associata a TKI, il mantenimento può essere proseguito con terapie comuni ai pazienti Philadelphia negativi (es. schema POMP) associati a TKI. Non vi sono evidenze che indichino per quanto tempo il mantenimento con TKI debba essere proseguito. La scelta è quindi paziente specifica e deve essere correlata alla clinica, le comorbidità, la presenza di MRD, e la volontà del paziente.

## 2.4 Terapia della leucemia acuta linfoblastica a precursori B resistenti o ricadute

Il 20% dei pazienti non risponde alla prima terapia di induzione, mentre fino al 50% dei pazienti aventi ottenuto una remissione completa ricade (27).

Di solito un paziente viene definito curato se dopo 7-8 anni di follow up risulta ancora in remissione clinico-molecolare, ma alcuni studi hanno riportato tempi di ricaduta di anche oltre 8 anni (51). Dei pazienti ricaduti dopo ottenimento di CR quasi tutti hanno coinvolgimento midollare da parte delle cellule blastiche e più di un terzo presentano una ricaduta extramidollare, di solito a livello di SNC, testicoli, cute o pleura (52)

L'obiettivo primario in questi pazienti è riottenere o ottenere per la prima volta la remissione clinica e ciò è fatto tramite una terapia definita di salvataggio.

Non ci sono evidenze cliniche a favore di un regime di trattamento specifico. La scelta terapeutica viene posta di solito in base al tipo di trattamento di induzione a cui il paziente si è mostrato resistente o in base al tempo di ricaduta dall'induzione in pazienti aventi precedentemente ottenuto una remissione clinica.

Se il relapse avviene in un tempo maggiore di due anni dal trattamento iniziale, può essere usato lo stesso schema terapeutico della prima induzione per riottenere una seconda remissione. Se invece la ricaduta avviene in un qualsiasi momento durante i cicli di induzione, consolidamento, e mantenimento, deve essere impostato un nuovo regime terapeutico.

In media la percentuale di risposta e ottenimento di CR in tali pazienti varia dal 30 al 50%, a seconda dell'intensità del regime primario al quale non hanno risposto/sono ricaduti.

Ottenere una remissione clinica diventa uno step cruciale per permettere a questi pazienti di essere sottoposti a trapianto da donatore allogenico, che rappresenta per loro l'unica possibilità di cura. In Figura 8 è mostrato come essere sottoposti a trapianto allogenico (sib allo) in terapia di salvataggio, tolta una prima fase ad alta mortalità trapianto-correlata, comporti una sopravvivenza media del 23% a 5 anni rispetto a un 4% di OS per pazienti sottoposti a sola chemioterapia.

La prima linea di chemioterapia di salvataggio di solito si basa sull'uso di alte dosi di citarabina ( ara-C ) in combinazione con altri agenti.

Studi condotti con alte dosi di Ara-C (HiDAC) associati a una singola somministrazione di idarubicina (antraciclina) ad alte dosi hanno mostrato tassi di risposta del 38% (54).

Altri metodi basati sull'esperienza pediatrica, considerano l'utilizzo di agenti alchilanti come isofosfamida o di inibitori della topoisomerasi II come l'etoposide in associazione a desametasone.

La clofarabina, un analogo purinico, è un farmaco di salvataggio già approvato nei protocolli pediatrici per quei bambini LAL-B ricaduti a due diversi cicli chemioterapici con risposte attese del 30%. Nel trattamento delle LAL-B ricadute nell'adulto non ci sono ancora risultati significativi ma diversi trials stanno studiando il suo impiego come agente singolo o in associazione a citarabina.

L'uso di Vincristina, o vincristina liposomiale (a emivita aumentata) è usata nei pazienti ricaduti a due diversi cicli di chemioterapici quindi in seconda ricaduta o maggiore. La risposta attesa però è solo del 20% di ottenimento di una nuova CR e si stima che i risultati siano inferiori per i pazienti primariamente refrattari (55).

Per i pazienti refrattari o ricaduti con leucemia acuta linfoblastica B Philadelphia positiva il discorso è sempre differente, così come nel primo ciclo di trattamento. Normalmente per tali pazienti è previsto il trapianto allogenico all'ottenimento della remissione clinica e alla disponibilità del donatore, poiché sono pazienti considerati fin da subito ad alto rischio e cattiva prognosi.

L'uso dei TKI ha notevolmente cambiato le curve di outcome in tale sottogruppo di pazienti leucemici, ma comunque esiste ancora una quota di pazienti resistenti o intolleranti agli inibitori delle tirosin chinasi.

La resistenza per una classe di TKI non correla però con una resistenza crociata con gli altri farmaci appartenenti a tale famiglia, per cui il trattamento di salvataggio si basa sempre sull'utilizzo di un TKI, differente dal quello precedentemente utilizzato, associato in questo caso sempre a chemioterapia. In pazienti ricaduti l'associazione TKI/chemioterapia prevede anche l'utilizzo di schema HiDAC (high Dose Ara-C) o FLAG-ida (FLudarabina/Ara-c/G-CSF e Idarubicina)

Poiché è norma clinica usare in prima linea l'Imatinib, i pazienti refrattari o ricaduti vengono trattati con Dasatinib, di cui molti trials conclusi e in corso ne stanno dimostrando l'efficacia (56) (57). Il problema con tale farmaco rimane l'insorgenza della mutazione T513I nel clone neoplastico che conferisce totale resistenza alla terapia.

In tali pazienti è previsto l'uso di un altro TKI, il Ponatinib, che ha ottenuto l'approvazione per l'utilizzo in LAL-B Ph+ resistenti o intolleranti agli altri TKI, inclusi i pazienti con mutazione T315I che non conferisce resistenza per quest'ultimo (58).

### 3. Terapie sperimentali della LAL-B

La sopravvivenza a lungo termine (5-year overall survival) per gli adulti affetti da leucemia acuta linfocitica non è aumentata di molto nelle ultime due decadi. I valori si aggirano tra il 30-40% per i pazienti sotto i 60 anni, 15% per i pazienti tra i 60 e i 70 anni, e solo il 5% per gli over 70 (59).

Inoltre le chemioterapie attualmente utilizzate sono tutte basate su regimi molto intensi e dannosi per l'organismo, comportando morbidità spesso gravose nel corto/medio periodo così come a lungo termine: solo il 22% dei pazienti in media completa i cicli senza ritardi o riduzioni.

Da qui la necessità di studiare e sviluppare nuovi farmaci per il trattamento della malattia. Diversi trials clinici sono oggi in atto sia sullo studio di farmaci già utilizzati, modificando le dosi e ricostruendo diverse combinazioni tra i vari chemioterapici, sia sull'efficacia di nuovi agenti terapeutici.

#### 3.1 Chemioterapici Sperimentali

I progressi in questo campo mirano allo sviluppo di nuove formulazioni a minor effetti collaterali e miglior farmacocinetica/dinamica.

Si stanno studiando anche nuovi chemioterapici come l'ABT 751, una sulfonamide che legandosi, come la colchicina, alla tubulina del citoscheletro, impedisce la formazione dei microtubuli(61), o il pemetrexed, un antimetabolita dei folati (62). Comunque rimangono terapia ad alta tossicità e la sopravvivenza a 5 anni non risulta particolarmente migliorata.

#### 3.2 Farmaci sperimentali a target enzimatiche

Poiché all'origine della cellula neoplastica vi sono alterazioni nelle normali vie di replicazione/self-renewal/comunicazione cellula-parenchima e intracellulare, capire quale risultato alterata e secondo quali meccanismi permette la realizzazione di farmaci specifici per contrastare l'espansione e la sopravvivenza del clone neoplastico.

Poiché gli 'effettori' intracellulari sono spesso enzimi in grado di attivare/rigenerare le varie reazioni chimiche, l'inibizione di tali prodotti anomali può essere una valida alternativa alla semplice azione citocida/citostatica dei chemioterapici. Su questa logica si basa lo sviluppo di farmaci, il cui beneficio è già ampiamente provato, come i TKI.

### 3.3 Farmaci sperimentali a target sulla membrana

I farmaci sviluppati che hanno come bersaglio proteine espresse sulla membrana cellulare sono farmaci che hanno il vantaggio di essere selettivi poiché sono diretti verso determinate proteine espresse da pochi tipi cellulari tra cui il clone neoplastico. Non tutti i determinanti di membrana hanno queste caratteristiche. La maggior parte dei farmaci che interagiscono con la membrana hanno come effetto il sistema immunitario dell'individuo. I cloni neoplastici normalmente sono capaci di provocare la risposta del sistema immunitario ma per qualche motivo questo risulta anergico. Una teoria accreditata suppone che la cancerogenesi sia imputabile oltre alle mutazioni anche alla perdita del controllo del SI sui cloni mutati che nella fisiologia di un normale individuo sano frequentemente si generano e prontamente vengono eliminati. Si pensa che il SI opportunamente attivato sia in grado di eliminare la neoplasia, infatti nell'effetto "graft versus leukemia" dopo trapianto allogenico il nuovo SI attacca le cellule della malattia e le distrugge.

#### 3.3.1 Attivatori del sistema immunitario

Una prospettiva piuttosto nuova, è quella di stimolare il sistema immunitario dell'ospite a reagire contro la malattia. Per far ciò si utilizzano molecole dirette verso i recettori del SI, non contro proteine espresse dalla malattia.

L'agonista di TLR-9 (Toll Like-Receptor) è un oligonucleotide CpG che si lega ai recettori TLR-9. E' chiaro che l'anergia del sistema immunitario è implicata nella leucemogenesi e che il SI del paziente ha un ruolo chiave anche nel controllo della malattia e nel prevenire le recidive. TLR-9 si trova espresso dalle cellule dendritiche e dai linfociti B, e quando attivato dal suo ligando stimola sia il SI innato che quello adattivo (64).

Questo farmaco potrebbe costituire un potente ausilio soprattutto nelle relapse dopo trapianto allogenico dove si pensa che la perdita del controllo del SI assuma un ruolo preponderante a livello patogenetico.

### 3.3.2 Anticorpi monoclonali

Sono anticorpi ingegnerizzati diretti contro determinanti di membrana del clone neoplastico il cui frammento Fc evoca la risposta immunitaria. Un anticorpo monoclonale (MAb) si ottiene da anticorpi animali ‘umanizzati’ sostituendo al frammento Fc nativo con quello umano. Il legame determina l’attivazione del complemento e citotossicità cellulo-mediata.

Tale tipologia di trattamento può essere utilizzata anche in coniugazione con farmaci: l’associazione MAb/chemioterapico permette di portare il farmaco molto vicino alla cellula malata rendendolo semi-selettivo e riducendone la tossicità generale. L’anticorpo monoclonale legato da un lato alla molecola target sul clone neoplastico, dall’altro al chemioterapico veicolato non è più in grado di attivare il SI ma d’altro canto comporta il vantaggio di non avere la necessità di un SI funzionante per raggiungere l’efficacia. Tutti gli anticorpi monoclonali utilizzati sono stati scelti per via della loro attività e affinità contro un antigene espresso dalle cellule leucemiche.

#### 3.3.2.1 Anticorpi monoclonali non coniugati

Dell’uso del rituximab si è già detto nella sezione 2.2.1. E’ un mAb diretto contro la molecola di superficie B linfocitaria CD20. In particolare è stato incorporato nello studio GMALL 07/2003 dove ha dimostrato di consentire un più veloce raggiungimento della remissione completa accompagnato da un aumento dell’overall survival e da un aumento della percentuale di remissione completa ottenute; il beneficio era evidente negli adulti sotto i 60 anni (68).

Ofatumumab (HuMax-CD20), un MAb anti CD20 di nuova generazione, ha dimostrato in vitro un’azione più potente di rituximab nel provocare lisi complemento-mediata; studi di fase clinica sono ora in corso (70).

L’epratuzumab è un anticorpo IgG1 umanizzato diretto contro CD22, una proteina di membrana presente sui linfociti B con funzioni di molecola di adesione legante l’acido sialico. La porzione intracellulare di CD22 viene fosforilata quando avviene il legame e induce la down-regulation di CD19.

L’alelizumab è un MAb diretto contro CD52, una molecola espressa su linfociti B, linfociti T, monociti e macrofagi. Circa il 70% dei pazienti con LAL-B è CD52+(73). Utilizzato come unico farmaco nelle leucemie ricadute induce una buona risposta con una tossicità accettabile.

### 3.3.2.2 Anticorpi monoclonali coniugati

Inotuzumab-ozagomicina è un anticorpo monoclonale diretto contro CD22 coniugato con un chemioterapico. La molecola legata è altamente citotossica e anche a concentrazioni minime induce la rottura della doppia elica del DNA (76), l'anticorpo ha la funzione di trasportarla direttamente alle cellule che esprimono CD22 minimizzandone gli effetti sistemici e rendendo la citotossicità mirata(69). Come agente singolo l'inotuzumab-ozagomicina ha dimostrato di poter indurre una risposta nel 57% delle LAL in un protocollo in cui veniva somministrato assieme al rituximab se la malattia era anche CD20+. L'anticorpo è gravato però da un'alta tossicità midollare. Per mantenere accettabile il rapporto rischio/beneficio riducendone la tossicità attualmente si sta studiando la somministrazione settimanale a minori dosaggi, che sta comunque mostrando simile risposta (77). Esiste anche un anticorpo anti-CD22 chiamato moxetumomab coniugato con l'esotossina della *Pseudomonas Aeruginosa* che è in fase iniziale dello sviluppo.

### 3.3.3 BiTE

Gli anticorpi così detti bispecifici sono caratterizzati dalla capacità di legare simultaneamente due molecole target.

Possono essere costruiti con tre funzioni:

- Inibizione simultanea di due target: legando contemporaneamente due recettori o due ligandi o una combinazione dei due tali anticorpi sono in grado di inibire la via di comunicazione. Sono utili per bloccare una via di segnale del clone neoplastico;
- permettono di costruire una sinapsi forzata tra la cellula effettrice e quella target;
- possono servire per indurre un aumento di una determinata via di attivazione/modulazione cellulare legando due molecole target sulla stessa superficie cellulare così da indurre una risposta solo nelle cellule 'ad alta affinità' per il farmaco (presentanti entrambe gli antigeni riconosciuti da esso).

Nello specifico i BiTE sono una sottoclasse della grande famiglia di anticorpi bispecifici, costruita a partire da due frammenti di singole catene a regione variabile (scFv) unite da una piccola sequenza aminoacidica (Figura 9, sezione 5.1). Questo permette di ottenere una molecola dalle dimensioni piccole (55-60kDa) rispetto ai normali anticorpi e agli altri tipi di anticorpi bispecifici (150kDa), a maggior diffusibilità e distribuzione più uniforme anche nei tessuti solidi. (78)

## 4. Scopo della tesi

In sintesi, grazie ai nuovi sviluppi in campo medico i tassi di risposta alla chemioterapia nei pazienti affetti da leucemia acuta raggiungono valori prossimi all'80%.

Ciò nonostante quasi il 50% ricade, e l'outcome finale nei pazienti ricaduti, così come quello dei pazienti refrattari, è assai infausto (27).

Inoltre nei pazienti MRD positivi, sia all'ottenimento della prima remissione che quelli poi ripositivizzati dopo negativizzazione molecolare iniziale, la percentuale di ricaduta sale fino al 94% (41) con una mediana di ricaduta di 4-5 mesi.

Da questo, la necessità di sviluppare nuovi trattamenti, nel cui campo oggi fa da padrone l'ingegneria molecolare. L'utilizzo di anticorpi monoclonali (MAb) è oramai avviato nel trattamento di molte patologie grazie ai vantaggi terapeutici che comportano in termini di selettività d'azione nei confronti dei target designati con implicazioni in primis nell'efficacia terapeutica e, non da meno, per i minori effetti avversi.

Blinatumomab fa parte della nuova generazione di MAb, così detti bispecifici, in quanto selettivi per un doppio antigene, denominati BiTE (Bi-specific Tcell Engager).

Lo scopo del mio studio è riportare i dati e i risultati ottenuti secondo l'esperienza clinica maturata biannualmente all'Istituto Seragnoli di Bologna in trial clinici esploratori e registrati, con anticorpo BiTE anti CD3/CD19 (blinatumomab) in LAL-B resistenti o refrattarie a uno o più cicli di trattamento convenzionali.

## 5. Blinatumomab

### 5.1 Biologia molecolare

Si tratta di una molecola di 55-kDa ottenuta dalla fusione di due single-chain antibodies (scFvs) tramite tecnologia DNA ricombinante applicata a cellule ovariche di Criceto (Chinese hamster ovary-CHO) (79).

La doppia specificità è realizzata grazie alla fusione della porzione N-terminale CD19-specifica, scFv di MAb murino, con una porzione C-terminale anti-CD3, scFv murino HD37, tramite una sequenza amminoacidica di 5aa, non immunogenica (80).

### 5.2 Meccanismo d'azione

La molecola CD3 è una proteina di membrana propria dei linfociti T mentre CD19 è una molecola B specifica; Blinatumomab permette quindi la formazione forzata di sinapsi citolitiche tra i linfociti T citotossici e le cellule B target (81).

La risposta verso le cellule tumorali B infatti si basa sull'attivazione della normale risposta immune Tcitossica coinvolgente il sistema di vescicole contenenti perforine e granzima.

Il vantaggio dell'utilizzo di Blinatumomab rispetto agli altri MAb contro antigeni B-specifici si basa sulla maggiore espressione di CD19 nelle cellule B tumorali, di cui molteplici studi hanno dimostrato l'espressione prossima al 100% nelle LAL B (83) nonché la sua espressione in tutti gli stadi maturativi della cellula B linfocitaria, a differenza di altre molecole target come CD22 e CD20, (vedi Figura 5, sezione 1.3.2).

Inoltre, poiché la sua espressione sembra essere necessaria al mantenimento della capacità di self-renewal, propria delle cellule leucemiche, la selezione tumorale di cellule CD19 negative come meccanismo di échappement al trattamento, ormai noto per essere alla base dello sviluppo della chemio resistenza, sembra improbabile (84)(85).

Il legame con CD3 permette invece da un lato la vicinanza allosterica tra la cellula effettrice e quella target, dall'altro l'amplificazione del segnale di attivazione e di proliferazione delle cellule T.

Grazie a ciò, sono state riscontrate risposte terapeutiche anche in pazienti, nonché in studi in vitro preclinici, con alto ratio B:T.

### 5.3 Studi in vitro

I primi studi in vitro sul blinatumomab sono stati compiuti in Germania a partire dagli anni 2000. Prima il gruppo di Loeffler, a seguire quello di Dreier nel 2002, poi Hoffman nel 2005, hanno confermato la sua efficacia in vitro. Mettendo in coltura linfociti T e cellule CD19<sup>+</sup>, si sono ottenute risposte di lisi cellulare per valori di CH50 di 10-100pg/ml (86).

Utilizzando sia linfociti T da sangue periferico che linfociti T midollari comprendenti tutte le sottopopolazioni (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, memory  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$ ), con unica eccezione dei linfociti T naive, si sono ottenute alti tassi di risposta, attivazione e lisi (87). In nessuno studio i linfociti T hanno necessitato di precedente attivazione o agenti costimolanti.

La sola stimolazione con blinatumomab si è vista infatti capace di indurre una nuova espressione di molecole di superficie come CD69 (marcatore precoce di attivazione) e CD25, nonché una sovra espressione di CD2 e un rilascio transitorio di citochine quali INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL 2, IL10.(88).

Tali risposte comunque sono state ottenute sempre in presenza di cellule CD19<sup>+</sup> e non sono altrimenti inducibili in culture di sole cellule T. L'attivazione dipendente da cellule target<sup>+</sup> è proprio una delle caratteristiche peculiari degli MAb bispecifici (89).

Allo stesso tempo MAb monospecifici per CD19 non sono in grado di indurre la lisi seriale ottenuta con Blinatumomab, a riprova del fatto che la risposta q ottenuta tramite l'induzione di sinapsi litiche necessitanti della presenza di cellule T effettrici (90).

Per ottenere la lisi delle cellule CD19<sup>+</sup> in vitro bisogna attendere qualche ora dall'infusione del BiTE infatti proprio perché i linfociti T devono up-regolare il loro sistema di vescicole contenenti granzima e perforine, ma una risposta completa, con eliminazione di tutte le cellule CD19<sup>+</sup> e una espansione significativa delle cellule T, si ottiene già nel giro di pochi giorni a riprova della sua alta efficacia.

## 5.4 Studi preclinici

La molecola di blinatumomab si è mostrata cross reattiva solo nella specie di scimpanzé. Per questo è stato creato un surrogato bispecifico per CD3 e CD19 murini con bioaffinità per i recettori prossime a quelle del blinatumomab. Gli studi però hanno dimostrato una diversa farmacodinamica e una diversa insorgenza di AEs soprattutto a livello neurologico (nessun AE a carico del SNC registrato con BiTE murino) (87).

Quindi si è studiata la molecola di blinatumomab in topi NOD/SCID a cui sono stati impiantati linfociti T umani, con risultati promettenti riguardo la regressione e completa inibizione sia di tumori sottocutanei che di tumori disseminati a livello sistemico per dosi molto basse a infusione ripetuta e.v. (91).

Considerando i dati promettenti sia negli studi in vitro che in quelli preclinici a partire dal 2001 Sono stati avviati i primi trial clinici su esseri umani.

## 5.5 Trial clinici

Il primo studio di fase I con Blinatumomab in terapia singola è stato condotto su 22 pazienti con linfoma non-Hodgkin B ricaduti e CLL (studio MT103-1/01), già dal 2001.

I pazienti erano infusi con dosi in crescendo a partire da 13 $\mu$ g/m<sup>2</sup>/die dalle 2 alle 4 ore/die per 2-3 volte a settimana.

Ma poiché lo studio della clearance del blinatumomab ha mostrato un emivita di 2h in media, nelle fasi successive si è passati a un metodo di infusione e.v. continua grazie all'utilizzo di mini-pompe portatili, agevoli per il paziente anche al di fuori dell'ospedale. Gli eventi avversi registrati sono stati per la più parte correlati alla deplezione di cellule B (es. linfopenia 77%, leucopenia 47%) e redistribuzione dei linfociti T attivati (es. aumento della PCR 46%, Cytokines Release Syndrome). Gli eventi avversi a carico del SNC si è visto inoltre essere correlati a un minore B:T (<1/8) ratio all'inizio della terapia. Trattando tali pazienti con un double-step dose, partendo prima da basse dosi pari a 5  $\mu$ g/m<sup>2</sup>/die poi a scalare 15  $\mu$ g/m<sup>2</sup>/die la seconda settimana, e passando a una dose di mantenimento pari 60 $\mu$ g/m<sup>2</sup>/die le successive 2-6 settimane, si è visto ridurre l'incidenza di AEs in tali pazienti. Inoltre il trattamento di questi con desametasone ne ha comportato la piena risoluzione. In vista dei risultati ottenuti nel trattamento della patologia linfomatosa, nel 2011 il gruppo GMALL (German Multicenter Study Group) ha avviato uno studio di fase II in pazienti con LAL-B in remissione clinica, MRD positivi.

L'età media dei pazienti era 47 anni, con un M:F pari a 1,33 .

14 pazienti presentavano un riarrangiamento del TCR/Ig, 5 erano BCL/ABL positivi e 2 presentavano la traslocazione MLL-AF4.

15 pazienti non avevamo mai ottenuto negativizzazione dell'MRD con nessun tipo di trattamento chemioterapico precedente mentre 5 erano molecolarmente ricaduti.

Per essere inclusi nello studio i pazienti dovevano presentare una LAL-B in remissione completa con persistenza della MRD, non dovevano aver ricevuto precedente alloTMO e non dovevano essere portatori di malattia a sede extramidollare o di malattie autoimmuni o a carico del SNC. Dei 21 pazienti arruolati solo 1 ha dovuto interrompere lo studio durante la prima infusione del farmaco per AE di grado 3 (convulsioni) ed è quindi stato escluso dallo studio. Secondo i risultati di tollerabilità, safety, farmacodinamica e farmacocinetica ottenuti nei trial di fase I ( maggiori AEs, soprattutto a carico del SNC come encefalopatie, convulsioni, disorientamento, riscontrati per dosi elevate di infusione pari a 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{die}$  ,e ugual tassi di risposta e free events survival registrati per pazienti trattati a basse e medie dosi ( 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{die}$  e 30  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{die}$  rispettivamente) (87)(92) i pazienti di trial fase II sono stati trattati con un regime di 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{die}$  in infusione continua e.v. per 4 settimane seguite da 2 settimane off, per un totale di 6 settimane a ciclo.

16 dei 20 pazienti trattati hanno ottenuto una negativizzazione dell'MRD (primary endpoint dello studio: percentuale di risposta dell'80%), 12 dei quali era la prima volta che ottenevano remissione molecolare. Inoltre lo studio ha mostrato come il livello di MRD iniziale non fosse correlato alle probabilità di risposta al trattamento (ottenimento di  $\text{MRD} \leq 10^{-4}$ ), come mostrato in Tabella 11.

10 degli 11 pazienti con maggior livello di MRD (pari a  $\text{MRD} \geq 10^{-2}$ ) hanno infatti ottenuto risposta completa al trattamento (93).

### Overview of Response Data to Blinatumomab (94)

Response Category	No. of Patients at Enrollment	No. of Responders
Evaluable for response*	20	16
Response according to prior course		
Molecularly refractory disease	15	12
Molecular relapse	5	4
Response according to MRD level before blinatumomab treatment†		
$\geq 10^{-2}$	11	10
$< 10^{-2}$ to $\geq 10^{-3}$	5	4
$< 10^{-3}$ to $\geq 10^{-4}$	4	2

Tabella 8

NOTE. MRD response onset was achieved in all responding patients after 4 weeks of treatment

↵\* Five patients were BCR-ABL positive (three of these patients responded).

↵† Levels determined by quantitative polymerase chain reaction.

Gli eventi avversi maggiormente registrati sono stati febbre, brividi, ipogammaglobulinemia e ipokaliemia. L'80% dei pazienti ha sviluppato AEs di grado 3 e 4 di cui il più comune è stata la linfopenia (33%). I pazienti hanno ricevuto una media di 3 trattamenti per persona e nessun evento avverso aggiuntivo è stato segnalato all'aumentare del numero dei cicli ricevuti.

Durante lo studio sono stati prelevati campioni di sangue periferico a 0,7,2,6,12,24,30 e 48h dall'inizio del trattamento e al giorno +7,+14,+21,+28, nonché a una settimana dal termine dell'infusione. I risultati hanno mostrato una deplezione dei linfociti B sotto il limite minimo  $\leq 1$  cell/ $\mu$ L valutabile in un tempo medio di 2,18 die  $\pm 3,8$  die, persistente per tutto il periodo di trattamento con blinatumomab.

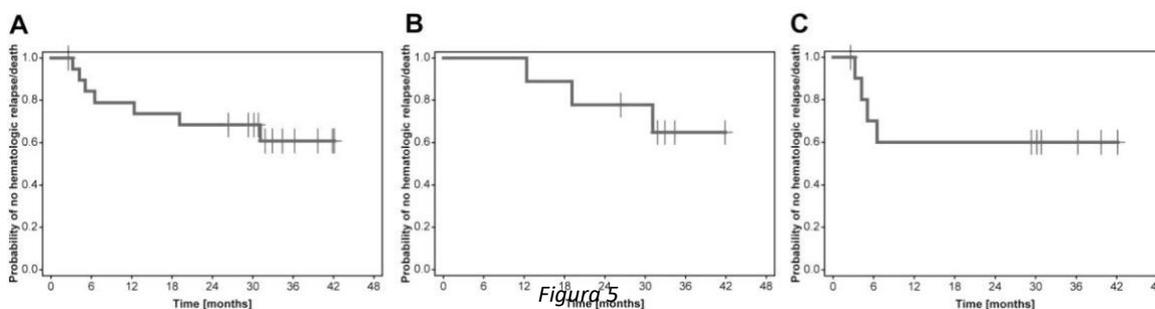
Un iniziale declino cellulare è stato riscontrato anche per i linfociti T (nadir a  $0,36 \text{ die} \pm 0,24$ , pari a  $36 \text{ cell}/\mu\text{L}$  in media) molto rapido quanto transitorio, seguito da una consistente espansione non clonale raggiunta in media al giorno +17 per un massimo di  $1013 \text{ cell}/\mu\text{L} \pm 430$ . Lo studio dei sottotipi T cellulari maggiormente espansi sotto trattamento con blinatumomab non ha mostrato differenze significative con un incremento maggiore di CD4+ in 9 pazienti su 20, di CD8+ in 4 pazienti su 20, e in ugual misura nei restanti 7 pazienti. Solo uno (responders) ha presentato un incremento dei linfociti T regolatori (95).

Risultati di follow-up ottenuto a 33 mesi dall'ultima infusione di blinatumomab (94) hanno mostrato un Relapse Free Survival (RSF) pari al 62% (12 pazienti), Figura 10-A.

9 pazienti dei 20 totali sono stati sottoposti ad alloTMO, di cui 6 (65%) in CR al time del follow-up, 1 paziente morto per GVHD e 2 ricaduti con cellule CD19+, Figura 10-B.

Degli 11 pazienti invece non sottoposti a trapianto, 6 erano ancora in CR (60%), di cui 4 LAL Ph- non altrimenti trattati dopo blinatumomab e 2 Ph+ in consolidamento con TKI, Figura 10-C. Due pazienti Ph+ invece sono ricaduti ed entrambi non avevano proseguito l'iter terapeutico post-blinatumomab con TKI. Dei 4 pazienti ricaduti Ph- invece due hanno avuto una ricaduta a cellule B CD19-, due una ricaduta extramidollare (1 SNC, 1 testicoli).

Secondo tali considerazioni si è potuto affermare che Blinatumomab sia un ottimo candidato per essere incluso nelle linee guida di trattamento delle LAL-B per aumentare sia la durata di CR che l'overall survival (OS) in pazienti MRD+.



Hematologic RFS. (A) For all 20 evaluable patients, median follow-up was 32.9 months and the lower limit of the 95% confidence interval for median follow-up was 19.1 months. (B) For the 9 HSCT patients, the median follow-up was 32.9 months and the lower limit of the 95% confidence interval for median follow-up was 31.1 months. (C) For the 11 patients not receiving HSCT, the median follow-up was 30.8 months and the lower limit of the 95% confidence interval for median follow-up was 5.1 months.

Nel 2013 invece è stato avviato un nuovo trial per lo studio del blinatumomab nei pazienti considerati ad alto rischio.

Il gruppo del Dr. Topp ha infatti selezionato un totale di 189 pazienti i cui criteri di inclusione principali erano:

- % di CB al MO  $\geq$  al 10%.
- Performance Status ECOG  $\geq$  2 (vedi Appendice 5)
- pazienti primariamente refrattari o ricaduti in meno di 12 mesi dalla prima remissione.
- pazienti ricaduti in meno di 12 mesi dopo alloTMO.
- pazienti ricaduti alla prima chemioterapia di salvataggio e successive.

Tali pazienti sono stati trattati con cicli di 4 settimane (dose di 9 $\mu$ g/m<sup>2</sup>/die per la prima settimana, incremento a 28  $\mu$ g/m<sup>2</sup>/die al D+8) con a seguire 2 settimane off per un totale di 6 settimane a ciclo.

Pazienti con CB al midollo osseo superiore al 50% hanno ricevuto un massimo di sette giorni di premedicazione con desametasone e una dose profilattica 1 h prima dell'infusione q stata somministrata a tutti i pazienti alla prima infusione e al dose step per prevenire l'insorgenza di CRS (96).

Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte in Tabella 9.

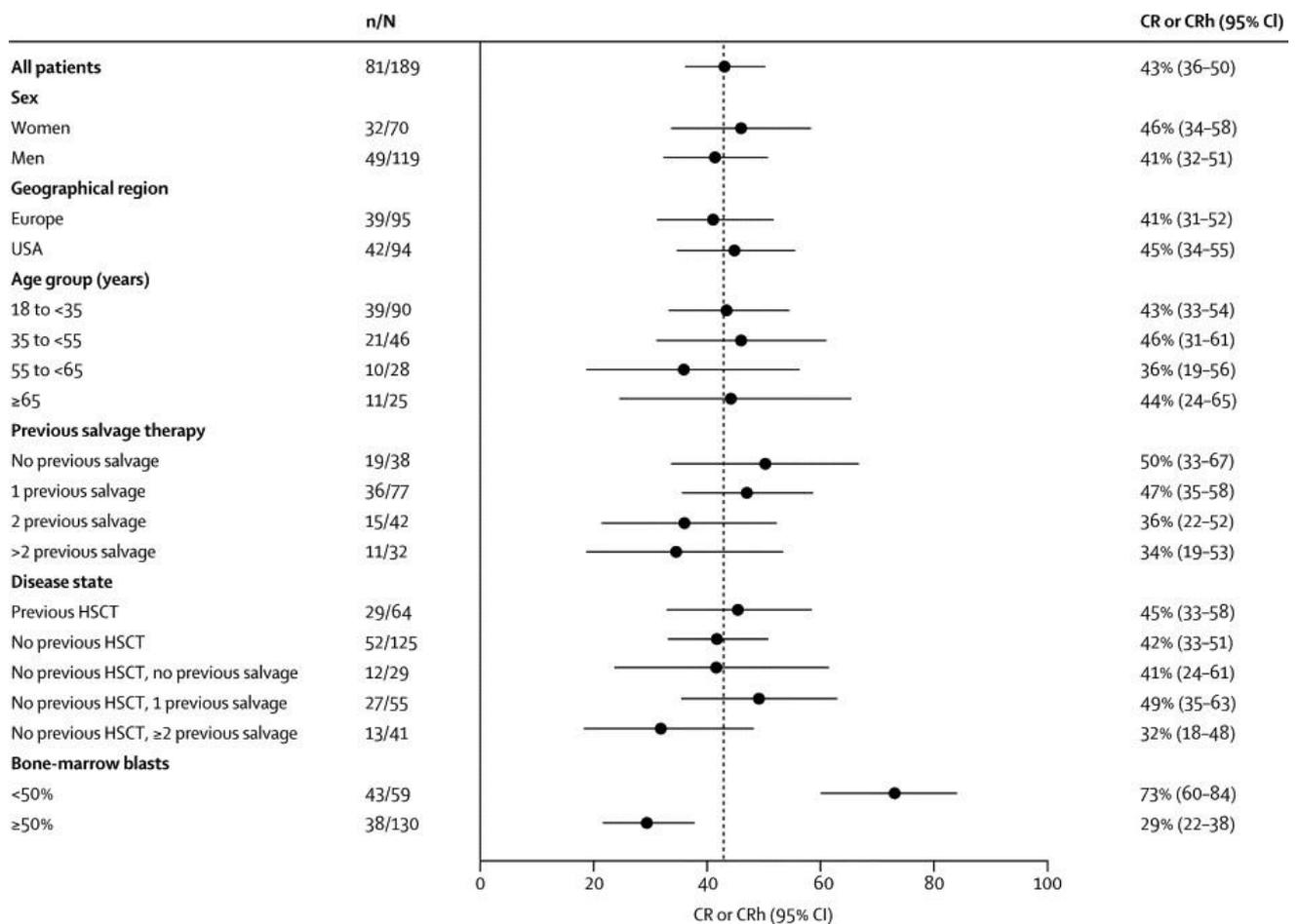
Patients (n=189)	
<b>Sex</b>	
Men	119 (63%)
Women	70 (37%)
<b>Geographic region</b>	
Europe	95 (50%)
USA	94 (50%)
<b>Age, years</b>	
	39 (18-79)
18 to <35	90 (48%)
35 to <55	46 (24%)
55 to <65	28 (15%)
≥65	25 (13%)
<b>Previous lines of salvage</b>	
0	38 (20%)
1	77 (41%)
2	42 (22%)
>2	32 (17%)
<b>Disease state</b>	
Previous allogeneic HSCT	64 (34%)
No previous allogeneic HSCT	125 (66%)
No previous salvage	29 (15%)
1 previous salvage	55 (29%)
≥2 previous salvage	41 (22%)
<b>Bone-marrow blast count*</b>	
<50%	59 (31%)
≥50%	130 (69%)

Data are n (%) or median (range). HSCT=haemopoietic stem-cell transplantation.  
\*Per central laboratory assessment for all 189 samples. In 154 patients, the assessment of bone-marrow blast count was done after or without the dexamethasone prephase treatment; in 35 patients, it was done before the dexamethasone prephase treatment.

#### Patients Characteristics

Tabella 9

Lo studio ha mostrato una CR pari al 33% e un CRh (vedi sezione 6.1.5) pari al 10% dopo due cicli di trattamento (di cui il 79% ha ottenuto la CR/CRh già alla fine del primo ciclo) Analisi sui vari aspetti caratteristici delle diverse classi di pazienti secondo età, sesso, precedenti trattamenti e/o precedente alloTMO non hanno mostrato differenze significative come riportato in Tabella 10 con unica eccezione del dato riferito alla percentuale di conta blastica midollare all'arruolamento minore o maggiore del 50% con differenze di ottenimento di CR del 73% contro il 29%, rispettivamente.



Multivariata Caratteristiche Biocliniche/risposta a trattamento.

Tabella 10

Degli 81 pazienti aventi ottenuto CR, 32(40%) sono stati sottoposti ad allo TMO. La mortalità a 100 giorni dal trapianto q risultata pari all'11%.

Lo studio dell'MRD in 73 pazienti su 81 ha mostrato una remissione molecolare nel 82%(60pz) dopo due cicli di terapia, di cui 59 su 60 già alla fine del primo ciclo.

La media di RFS nei MRD negativi è stata di 6,9 mesi con OS medio di 11,5 mesi rispetto ai 2,3 mesi di RFS e 6,7 mesi di OS riportati nei pazienti MRD persistenti.

Tassi di risposta significativi sono stati riportati anche in quelle sottoclassi di pazienti il cui trattamento con gli attuali chemioterapici risulta oggi poco efficace con CR ottenuta nel 44% dei pazienti over 65 e nel 45% dei pazienti ricaduti dopo precedente allo TMO.

I maggiori eventi avversi riscontrati in corso di trattamento sono stati riportati in Tabella 11. Da segnalare che AEs sono stati riscontrati nel 99% dei pazienti di cui il 38% di grado 3 e il 30% di grado 4. Il 10% dei pazienti ha necessitato una riduzione di dose e un 18% è stato discontinuato dalla somministrazione di blinatumomab a causa della gravità o non risolvibilità dell'AEs. Il 52% dei pazienti ha sviluppato un AEs neurologico, di cui la maggior parte, 76%, di grado 1 o 2, e l'89% durante il primo ciclo. Nessuno dei 189 pazienti arruolati è deceduto per AEs correlato all'infusione del farmaco.

### Advers Events (96)

	Any grade	Worst grade 1-2	Worst grade 3	Worst grade 4	Worst grade 5
Patients with adverse events	188 (99%)	33 (17%)	71 (38%)	56 (30%)	28 (15%)
Adverse events of worst grade $\geq 3$ occurring in $\geq 5\%$ of patients					
Febrile neutropenia	53 (28%)	5 (3%)	46 (24%)	2 (1%)	0 (0%)
Neutropenia	33 (17%)	3 (2%)	9 (5%)	21 (11%)	0 (0%)
Anaemia	38 (20%)	11 (6%)	25 (13%)	2 (1%)	0 (0%)
Pneumonia	18 (10%)	1 (<1%)	13 (7%)	2 (1%)	2 (1%)
Thrombocytopenia	21 (11%)	5 (3%)	2 (1%)	14 (7%)	0 (0%)
Hyperglycaemia	24 (13%)	9 (5%)	15 (8%)	0 (0%)	0 (0%)
Leucopenia	19 (10%)	4 (2%)	7 (4%)	8 (4%)	0 (0%)
Alanine aminotransferase increased	24 (13%)	11 (6%)	12 (6%)	1 (<1%)	0 (0%)
Hypokalaemia	45 (24%)	32 (17%)	10 (5%)	3 (2%)	0 (0%)
Pyrexia	113 (60%)	100 (53%)	13 (7%)	0 (0%)	0 (0%)
Sepsis	13 (7%)	2 (1%)	3 (2%)	4 (2%)	4 (2%)
Hypophosphataemia	13 (7%)	3 (2%)	8 (4%)	2 (1%)	0 (0%)
Patients with neurologic events	98 (52%)	74 (39%)	20 (11%)	4 (2%)	0 (0%)
All patients with neurologic events of worst grade $\geq 3$					
Tremor	33 (17%)	32 (17%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Dizziness	26 (14%)	25 (13%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Confusional state	14 (7%)	11 (6%)	3 (2%)	0 (0%)	0 (0%)
Encephalopathy	10 (5%)	4 (2%)	5 (3%)	1 (<1%)	0 (0%)
Ataxia	9 (5%)	6 (3%)	2 (1%)	1 (<1%)	0 (0%)
Somnolence	9 (5%)	8 (4%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Aphasia	7 (4%)	5 (3%)	2 (1%)	0 (0%)	0 (0%)
Mental status change	7 (4%)	5 (3%)	2 (1%)	0 (0%)	0 (0%)
Dysarthria	6 (3%)	5 (3%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Neurotoxicity*	5 (3%)	3 (2%)	2 (1%)	0 (0%)	0 (0%)
Convulsion	4 (2%)	3 (2%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)
Nervous system disorder*	3 (2%)	0 (0%)	3 (2%)	0 (0%)	0 (0%)
Dysaesthesia	3 (2%)	2 (1%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Cognitive disorder	3 (2%)	2 (1%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Bradypnea	2 (1%)	1 (<1%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Hemiparesis	2 (1%)	1 (<1%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Altered state of consciousness	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Febrile delirium	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)
Neurologic symptom*	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Stupor	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Syncope	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)

Data are n (%), where n is the number of patients. Table shows events for all patients (n=189) during the treatment period and until the end-of-core-study visit (30 days after last treatment or before allogeneic HSCT). \*Terms provided by study sites without further specification.

**Table 3: Adverse events and neurologic events (irrespective of causality)**

Tabella 11

## 6. Pazienti e metodi

In vista dei risultati ottenuti, la casa farmaceutica Amgen ha avviato altri 2 studi clinici alla fase II e ottenuto l'approvazione per l'avvio di studi di fase III (1 studio).

Bologna ha potuto arruolare pazienti per tutti e tre i protocolli sperimentali avviati.

La casistica di Bologna conta 43 pazienti trattati con tale molecola, e rappresenta il centro italiano a maggior numero di arruolamento. L'analisi effettuata tuttavia risulta eseguita solo sui primi 16 pazienti.

### 6.1 Protocolli Sperimentali

#### 6.1.1 Studio MT103-203 (Blast)

Studio multicentrico, a braccio singolo, di fase II. Lo scopo dello studio è confermare l'efficacia, la sicurezza e la tollerabilità dell'anticorpo monoclonale MT 103 (Blinatumomab) in pazienti LAL a precursori B con persistenza dell'MRD.

I criteri di inclusione dello studio erano:

- Essere in CR dopo almeno tre blocchi di chemioterapia intensiva.
- Presentare MRD a un livello  $\geq 10^{-3}$  dopo un intervallo di almeno due settimane dall'ultima chemioterapia.
- Essere stati sottoposti a biopsia midollare o prelievo di sangue periferico diagnostico per LAL a precursori B.
- Presentare una conta di PMN  $\geq 1000/\mu\text{L}$   
Piastrine  $\geq 50.000/\mu\text{L}$   
Hb  $\geq 9\text{g/dl}$
- Avere funzione renale ed epatica conservate.
- Presentare test infettivologici negativi per HIV, HBV, HCV.
- Presentare test di gravidanza negativo.
- Performance Status ECOG  $<2$  (vedi Appendice 4)
- Età  $\geq 18$ .

I maggiori criteri di esclusione prevedevano: presenza di blasti circolanti o localizzazione extramidollare di patologia, infiltrazione blastica del LCR, patologie rilevanti a carico del SNC, patologie autoimmuni, precedente trattamento con blinatumomab, precedente allo TMO, oncoterapico (chemioterapico, radioterapico, MAb, TMO autologo) somministrato da meno di 4 settimane, eleggibilità di trattamento con TKI.

I pazienti arruolati sono stati trattati con cicli di 6 settimane, di cui 4 settimane a infusione e.v. continua di 15 µg/m<sup>2</sup>/die e 2 settimane off, per un totale di 4 cicli. La dimostrazione di relapse ematologico determinava il termine dello studio.

### 6.1.2 Studio Alcantara

Studio multicentrico, braccio singolo, di fase II, Simon (disegno a due stadi, se al primo stadio non si osservano risposte, lo studio si interrompe, altrimenti lo studio prosegue (97)). Lo scopo dello studio è valutare l'efficacia dell'anticorpo BiTE Blinatumomab in pazienti adulti affetti da LAL a precursori B Philadelphia Positivi ricaduti o refrattari.

Criteri di inclusione dello studio:

- Presentare una LAL a precursori B Ph+ resistente / refrattaria ad almeno un TKI di seconda generazione (dasatinib, nilotinib, bosutinib, ponatinib) o essere intolleranti a TKI di seconda generazione.
- Avere una CB al midollo osseo maggiore di 5%.
- Avere funzione renale ed epatica conservate
- Presentare test infettivologici negativi per HIV, HBV, HCV.
- Presentare test di gravidanza negativo.
- Performance Status ECOG  $\leq 2$ .
- Età  $\geq 18$ .

I maggiori criteri di esclusione prevedevano: storia di malattia oncologica trattata da meno di 5 anni, patologie rilevanti a carico del SNC, LAL attiva a livello di SNC e/o testicoli, patologie autoimmuni, allo TMO da meno di 12 settimane, GVHD attiva grado  $\geq 2$ , chemioterapia (esclusa chemioterapia intratecale e desametasone) da meno di due settimane, immunoterapia o altro farmaco sperimentale da meno di 4 settimane, precedente trattamento con blinatumomab o altro anti-CD19.

I pazienti arruolati sono stati trattati secondo uno schema di screening, induzione, consolidamento secondo il quale nel primo periodo di 3 settimane per lo screening i pazienti potevano essere trattati con desametasone per ridurre la conta tumorale e prevenire l'insorgenza di CRS. Il periodo di induzione prevedeva 2 cicli di terapia da 6 settimane, di cui 4 settimane di infusione continua e.v. seguite da due settimane off, al termine dei quali veniva rivalutata l'ottenimento di CR/ CRh /Cri (vedi sezioni 6.1.4-6.1.6) necessario per il proseguimento della fase successiva. I pazienti così detti 'responders' hanno ricevuto un ciclo di consolidamento di ulteriori 3 cicli di terapia con blinatumomab.

Il farmaco è stato somministrato alla dose di 28 µg/m<sup>2</sup>/die con eccezione della prima settimana del primo ciclo con infusione di 9 µg/m<sup>2</sup>/die, come profilassi per l'insorgenza di CRS.

### 6.1.3 Studio Tower

Studio multicentrico, randomizzato, Open Label, di fase III. Lo scopo dello studio è verificare l'efficacia dell'anticorpo BiTE Blinatumomab rispetto al trattamento standard chemioterapico nei pazienti adulti LAL a precursori B Philadelphia negativi ricaduti/refrattari. Lo scopo primario dello studio è verificare l'OS dei pazienti trattati con Blinatumomab rispetto a chemioterapia convenzionale.

Gli obiettivi secondari invece sono comparare la CR, l'EFS, la remissione di MRD nei pazienti trattati con BiTE e con chemioterapia convenzionale e l'incidenza di pazienti sottoposti ad allo TMO e sopravvivenza a 100 giorni dal trapianto dopo tali schemi di terapia, nonché valutare la Qualità di vita e lo stato di salute globale dei pazienti sottoposti a trattamento con Blinatumomab.

Criteri di inclusione:

- Resistenza al primo ciclo di induzione
- Prima ricaduta dopo remissione, di durata inferiore a 12 mesi
- Seconda o maggiore ricaduta non in trattamento
- Ricaduta dopo precedente allo TMO

I pazienti dovevano inoltre essere già stati sottoposti a chemioterapie ad alto regime in almeno un ciclo di terapia.

I principali criteri di esclusione invece comprendevano: storia di malattia oncologica trattata da meno di 5 anni, patologie rilevanti a carico del SNC , LAL attiva a livello di SNC e/o testicoli, localizzazione extramidollare isolata, patologie autoimmuni in atto, allo TMO da meno di 12 settimane, trapianto autologo da meno di 6 settimane, GVHD attiva, radio/chemioterapia (esclusa chemioterapia intratecale e desametasone) da meno di due settimane, immunoterapia o altro farmaco sperimentale da meno di 4 settimane, precedente trattamento con blinatumomab .

Questo studio prevedeva quattro fasi di cui la prima di screening, della durata di 21 giorni, dove il paziente poteva essere premedicato con desametasone per ridurre la conta blastica e prevenire la CRS, obbligatorio in pazienti con  $CB \geq 50\%$  al MO o blasti periferici  $\geq 15.000/\mu L$ , indicato per pazienti con rapido incremento dell' LDH o carica tumorale extramidollare elevata, con dose 24 mg/m<sup>2</sup>/die massimo per 5 die, fino a un massimo di tre giorni prima l'inizio della terapia con blinatumomab, comune per entrambe le braccia dello studio

Durante la fase successiva di induzione invece i pazienti randomizzati nel Braccio Blinatumomab sono stati sottoposti a due cicli di terapia da 6 settimane ciascuno (4 settimane ad infusione continua e.v. e 2 settimane off), mentre quelli del Braccio Chemioterapico a due cicli di induzione tra i 4 schemi possibili a scelta dell'investigatore.

I pazienti aventi ottenuto una CR/CRh/CRi hanno proseguito l'iter terapeutico, fase di consolidamento, con ulteriori tre cicli di trattamento secondo lo schema braccio-specifico previsto dal protocollo.

Infine i pazienti ancora in CR/CRh/CRi dopo le due fasi precedenti hanno proseguito con il regime terapeutico braccio-specifico per altri 12 mesi (in assenza di tossicità maggiore, ricaduta, o eleggibilità di allo TMO).

Nella fase di induzione e di consolidamento del braccio blinatumomab i pazienti erano infusi alla dose di 28  $\mu g/m^2$ /die, con sola eccezione della prima settimana del primo ciclo (a 9  $\mu g/m^2$ /die, come prevenzione per l'insorgenza di CRS). Durante la fase di mantenimento invece il farmaco BiTE blinatumomab è stato somministrato con cicli di 12 settimane (4 settimane di infusione continua e.v. alla dose di 28  $\mu g/m^2$ /die seguite da 8 settimane off). La randomizzazione blinatumomab Vs Chemioterapia convenzionale è stata eseguita in rapporto 2:1 per sottoclassi differenziate per:

- Età  $<35 / \geq 35$  anni
- Terapie di salvataggio precedenti: si/no.
- Precedente allo TMO: si/no.

Nel Braccio a regime chemioterapico i 4 protocolli di trattamento ammessi per lo studio a confronto erano:

1. Schema FLAG (Fludarabina 30mg/m<sup>2</sup> e Ara-C 2g/m<sup>2</sup> per 5 giorni associate a G-CSF fino a CR) ± antracicline a regime base.
2. HiDAC (Ara-C ad alte dosi): citarabina arabinoside  $\geq 1\text{g}/\text{m}^2$  ± antracicline e/o asparginasi, alcaloidi della vinca, steroidi, etoposide, agenti alchilanti.
3. HiDMTX (Metotrexate ad alte dosi) 500mg · 3g<sup>2</sup>/die in combinazione con asparginasi, alcaloidi della vinca, steroidi, etoposide, agenti alchilanti.
4. Clofarabina o clofarabina ‘based regimens (clofarabina  $\geq 20\text{mg}/\text{m}^2/\text{die}$  per almeno 5 giorni in associazione a polichemioterapia).

La scelta di quale protocollo usare è stata lasciata a discrezione degli investigatori a seconda dei fattori di rischio del paziente, età e personale giudizio clinico.

#### 6.1.4 Definizione di Remissione Completa (CR)

Un paziente affetto da Leucemia Acuta Linfoblastica è definito in remissione completa quando a seguito di ciclo terapeutico ottiene tutti i seguenti criteri:

- Conta blastica (CB) alla biopsia midollare  $\leq 5\%$  della cellularità totale.
- No evidenza clinica di malattia
- Ripresa della funzione midollare, con valori allo striscio di sangue periferico di piastrine  $\geq 100,000/\mu\text{L}$  e neutrofili  $\geq 1000/\mu\text{L}$ .

#### 6.1.5 Definizione di Remissione Completa con ripristino funzionalità midollare incompleta (CRh)

Un paziente affetto da LAL si definisce in remissione parziale quando ottiene:

- Conta blastica (CB) alla biopsia midollare  $\leq 5\%$  della cellularità totale.
- Assenza di evidenza clinica di malattia

Ma alla conta di sangue periferico i valori non raggiungono entrambi i valori per definire la risposta completa: piastrine ( $\text{min} \geq 50,000/\mu\text{L}$  ma  $< 100.000/\mu\text{L}$ ) o di neutrofili ( $\text{min} > 500/\mu\text{L}$  ma  $< 1000/\mu\text{L}$ ).

#### 6.1.6 Definizione di Remissione Completa con Incompleta ripristino funzionalità midollare (Cri)

Un paziente affetto da LAL che ha ottenuto:

- Conta blastica (CB) alla biopsia midollare  $\leq 5\%$  della cellularità totale.
- Assenza di evidenza clinica di malattia

Ma alla conta di sangue periferica ha solo uno dei due valori entro i criteri di CR: piastrine  $\geq 100,000/\mu\text{L}$  o neutrofili  $\geq 1000\text{cell}/\mu\text{L}$ .

#### 6.1.7 Definizione di Malattia minima Residua

La definizione di CR basata su CB alla biopsia ossea inferiore al 5% è un indice di regressione/assenza di patologia basato su osservazione citologica delle cellule al microscopio.

Risente quindi di una certa variabilità operatore-dipendente ed è inoltre una stima quantitativamente indicativa, utile per definire uno score prognostico e terapeutico, ma non esatta.

Con il termine Malattia Minima residua si definisce quando il paziente presenta una conta blastica inferiore al limite risolutivo dell'indagine al microscopio, ovvero  $< 5 \times 10^{-2}$ , ma comunque presente e rilevabile con tecniche più sensibili.

L'MRD infatti è valutata sulla base di analisi molecolari con PCR real time capaci di rilevare cellule blastiche fino a un limite di  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  (1 blasto/100.000 cell).

Studi pediatrici hanno dimostrato come un cut-off di MRD  $< 0$  o  $\geq 10^{-4}$  sia statisticamente significativo in termini di differenza di EFS (98).

Ormai è globalmente riconosciuta l'importanza del MRD come indice più sensibile nel definire il rischio prognostico di ricaduta (99).

Per fare ciò la malattia del paziente deve essere stata precedentemente studiata e bisogna aver inquadrato un'alterazione molecolare caratteristica della cellula neoplastica rispetto al resto della popolazione cellulare normale del paziente.

Nel nostro studio le alterazioni ricercate e utilizzate per la quantificazione di MRD erano:

- Riarrangiamento del TCR/Ig.
- Traslocazione BCR/ABL (LAL-B Philadelphia Positive).
- Traslocazione MLL/AF4.

## 6.2 Caratteristiche biologiche e biomolecolari dei pazienti.

Da novembre 2013 a novembre 2017 il nostro istituto ha arruolato 20 pazienti, di cui 16 trattati con Blinatumomab, 6 donne e 10 uomini.

Due pazienti sono stati arruolati nello Studio Blast (CR, MRD+), 9 pazienti nel protocollo Alcantara (LAL-B Ph+) e dei 7 pazienti arruolati nel protocollo Tower (LAL-B r/r) solo 3 sono stati randomizzati per il braccio sperimentale e sottoposti a trattamento con BiTE Blinatumumab. Per due pazienti invece è stato avviato l'utilizzo compassionevole del farmaco.

### **Analisi dei fattori di rischio (analizzati 16 dei 39 pazienti trattati fino a Dicembre 2017):**

L'età media dei pazienti all'arruolamento era 45 anni, mentre l'età media alla diagnosi di LAL a precursori B era 43, di cui solo 4 pazienti di età inferiore ai 30 anni mentre 4 pazienti erano over 60. Sette pazienti si presentavano in prima ricaduta, un paziente era in seconda ricaduta, ben 4 pazienti erano in terza ricaduta mentre due pazienti erano in 4 e 5 ricaduta rispettivamente. Un paziente era in persistenza di malattia senza aver mai risposto ad alcuna terapia precedente e due pazienti infine erano in prima remissione clinica con persistenza dell'MRD (pazienti in uso compassionevole).

Medialmente ciascun paziente aveva eseguito tra i 2 e i 3 cicli terapeutici precedenti l'arruolamento, con un minimo di 1 ciclo e un massimo di 8, di cui 7 pazienti erano stati trattati con trapianto allogenico di cellule staminali ,5 LAL-B Ph+ e 2 Ph-, dopo il quale tutti erano ricaduti. Tutti i pazienti avevano ottenuto una prima CR in tempi > 3 settimane, a eccezione del paziente che si è sempre mostrato persistente.

Nel totale 5 pazienti erano Philadelphia negativi (di cui uno con LAL- Pro B) e 11 Philadelphia positivi, di cui 8 con trascritto p190 e 3 con trascritto p210. Tre pazienti presentavano cariotipo complesso, un paziente presentava t(1;19). Quattro pazienti presentavano alla diagnosi una leucocitosi  $\geq 30.000/\mu\text{L}$ .

In base a tali valori tutti i nostri pazienti arruolati sono stati valutati come pazienti ad alto rischio.

Paziente	Età dg (anni)	Leucociti >30.000/ $\mu$ L alla dg	Tempo di ottenimento CR(1) > 3 settimane	Cariotipo	Immunofenotipo	MRD Alla CR1	Ricaduta a precedente allo TMO	Precedenti ricadute
1	15		+				+	4
2	19		+	Ph+		+		1
3	48	+	+	Ph+			+	1
4	38		+	Ph+			+	5
5	59		+	Ph+		+	+	3
6	72	+	+	Ph+				2
7	41		+	Ph+, complesso				3
8	22		+	T(2;16)				0
9	54	+	persistente	Ph+		(+)	+	3
10	23	+	+	Ph+		+	+	1
11	63		+			+		1
12	42		+	Ph+			+	3
13	61		+	Ph+				1
14	64		+	Complesso				1
15	39		+	T(1;9)	LAL pro-B	+		0
16	43		+	Ph+ Complesso		+		0

Caratteristiche dei pazienti all'arruolamento.

Tabella 12

## 6.3 Metodi

### 6.3.1 Arruolamento e Somministrazione

Nelle tre settimane di screening previste dai protocolli i pazienti hanno eseguito visite mediche per accertare lo stato di salute, il performance status secondo lo score ECOG (vedi Appendice 5), eseguito gli esami previsti dall'arruolamento -valutazione MRD, cariotipo, immunofenotipo, cellularità midollare, presenza di anticorpi antimurino HAMA (Human

Anti Mouse Antibodies), emocromo, esami biochimici ed elettrolitici ed esami specifici per la valutazione di eventuali comorbidità del paziente.

Una volta superati i requisiti di arruolamento, protocollo specifici, per i pazienti con una cellularità midollare blastica superiore al 50% e/o blastosi periferica  $\geq 15.000/\mu\text{L}$  q stato eseguito un ciclo di corticoterapia con desametasone  $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{die}$  fino a un massimo di 5 giorni. Tutti i pazienti sono invece stati premedicati alla prima infusione e al dose step (+D8) con desametasone  $20\text{ mg e.v.}$ , a un'ora dall'inizio dell'infusione di blinatumomab.

Un arresto dell'infusione in pompa continua di blinatumomab  $\geq 4\text{h}$  q stata considerata come un'interruzione della somministrazione della dose, e la ripresa del trattamento premedicata. Qualsiasi AEs di 4 grado ha comportato l'interruzione immediata e permanente del farmaco (nessun caso nella nostra coorte); per AEs di terzo grado era prevista l'interruzione momentanea del farmaco e l'uso di trattamenti di supporto per ridurre la complicità a un grado  $\leq 1$ . Qualsiasi interruzione del farmaco  $\geq 2$  settimane (esclusi motivi logistici dell'Istituto e/o casa Amgen) o risoluzione di AEs a grado  $\leq 1$  in più di due settimane comportava l'uscita dal protocollo sperimentale (1 caso nella nostra coorte). La ripresa dopo interruzione maggiore di una settimana ma inferiore ai 14 giorni, doveva essere considerata come inizio di un nuovo ciclo di terapia.

Tutti i protocolli prevedevano l'infusione di 28 giorni continuativi di blinatumomab in pompa e.v. seguiti da 14 giorni di pausa. A eccezione del protocollo Blast, che prevedeva una dose di  $15\text{ mg}/\text{m}^2/\text{die}$  per tutta la durata del trattamento, per gli altri due studi era prevista una prima settimana a  $9\text{ mg}/\text{m}^2/\text{die}$  e poi a scalare al giorno +8 (D8) una dose di  $28\text{ mg}/\text{m}^2/\text{die}$  per i restanti 21 giorni. AEs di grado 1 o 2 potevano essere gestiti continuando l'infusione di blinatumomab eventualmente alla dose ridotta di  $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{die}$  per il protocollo Blast e  $9\text{mg}/\text{m}^2/\text{die}$  per i protocolli Alcantara e Tower.

Lo studio Blast prevedeva un periodo di screening di 21 giorni, seguito da 4 trattamenti (4-5 mesi circa), una visita di controllo a 30 giorni dall'arresto dell'ultimo ciclo e un follow-up di 24 mesi per la valutazione dell'efficacia e/o safety del trattamento.

Lo studio Alcantara, dopo le tre settimane per lo screening, prevedeva un periodo di trattamento di 7,5 mesi (2 cicli di induzione + 3 cicli consolidamento), una visita di controllo a 30 giorni dall'arresto dell'ultimo ciclo e un follow-up di 18 mesi.

Lo studio Tower infine prevedeva 3 settimane di screening, un periodo di trattamento pari a 7,5 mesi (2 cicli induzione+3 cicli consolidamento), eventuali 12 mesi di mantenimento, visita di controllo a 30 giorni dall'arresto dell'ultimo ciclo e un follow-up fino alla registrazione della 330<sup>ima</sup> morte (su un totale di 400 pazienti previsti all'arruolamento)

### 6.3.2 Analisi Molecolare

Per l'analisi molecolare alla diagnosi e rivalutazione di leucemia acuta linfoblastica è stato utilizzato il metodo MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

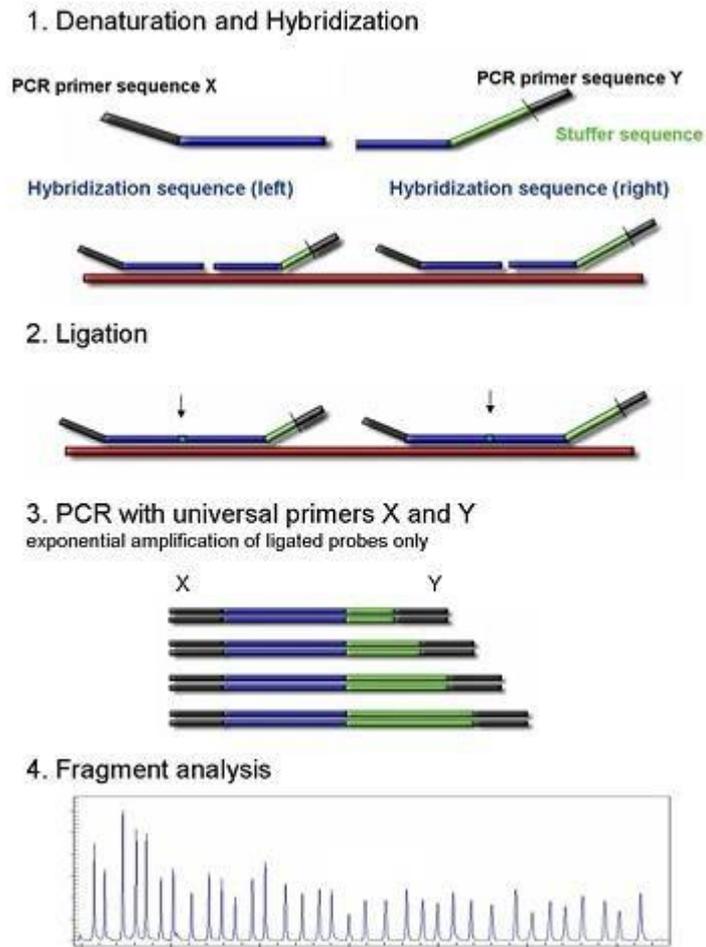
Tale tecnica ad alta risoluzione permette di analizzare fino a 57 sequenze di DNA, con variabilità di anche solo un nucleotide (100) rilevando alterazioni di Copy Number, facilmente confrontabili con una sequenza normale e nelle varie fasi di malattia.

Il protocollo prevede 5 tappe principali:

1. Denaturazione e ibridizzazione dei probe di DNA: il DNA viene denaturato e incubato una notte intera con un mix di probe MLPA. I probe sono costituiti da due diversi oligonucleotidi ognuno contenente al suo interno una sequenza primer per la reazione di PCR. Grazie alla denaturazione l'elica a DNA si apre e i probe sono in grado di legarsi alle sequenze target (ibridizzazione), (Figura 11-step 1).
2. Reazione di legame: affinché il legame tra le due sequenze nucleotidiche di ciascun probe avvenga con successo entrambe devono trovarsi appaiate alla specifica sequenza complementare di DNA (Figura 11-step 2).
3. PCR (Polimerase Chain Reaction) : durante la reazione di amplificazione con tecnica di PCR (replicazione di DNA con polimerasi batterica termoresistente) soltanto i probe che saranno riusciti a compiere la reazione di legame saranno letti come una sequenza integra di DNA dalla polimerasi e così replicati in maniera esponenziale. Essendo quest'ultimi in numero proporzionale alla sequenza di DNA target, il prodotto di amplificazione dei probe può essere considerato come misura diretta della quantità di sequenze di DNA anomale nel materiale in esame (Figura 11-step 3)
4. Elettroforesi dei prodotti amplificati: le sequenze così ottenute sono separate con normale tecnica elettroforetica mediante un sistema di sequenza capillare (ABI PRISM 3730) dotato di un software di analisi dei frammenti
5. Analisi dei dati; mediante specifici software (Coffalyser nel nostro caso).

Per l'analisi delle anomalie in pazienti a sospetta diagnosi o rivalutazione di Leucemia Acuta esiste un kit specifico (P335-B1 ALL-IK2F1) che ricerca le alterazioni conosciute a maggior valenza diagnostica/terapeutica quali IKZF1, PAX5, ETV6, RB1, BTG1, EBF1, JAK2, CDKN2A-CDKN2B, Xp22.33 (vedi Appendice 3 per l'elenco completo). Gli ampliconi prodotti variano da una lunghezza di 118 a 503 nucleotidi.

L'indagine molecolare permette lo studio di delezioni, amplificazioni (wild tipe o acquisite) non altrimenti visibili alla citogenetica poiché al di sotto della sensibilità di tale tecnica.



Analisi molecolare ad alta risoluzione con tecnica MLPA

Figura 6

### 6.3.3 Analisi di Malattia minima residua

Esistono diverse tecniche per la valutazione del MRD, le uniche a sensibilità molecolare sono però la citofluorimetria (sensibilità  $10^{-3}/10^{-5}$ ) e la PCR (sensibilità  $10^{-4}/10^{-6}$ ).

Nell'analisi citofluorimetrica per valutare MRD si usano anticorpi specifici per molecole di superficie linfocitiche/leucemiche marcati con fluorocromi.

Vi sono due approcci di studio, uno si basa sul concetto di 'occupazione anomala di spazi vuoti' da parte di cellule leucemiche all'interno di dot plots maturativi.

Il secondo utilizza nuove molecole in grado di evidenziare fenotipi aberranti con sensibilità e specificità tali da valutare la presenza anche minima di blasti (antigeni CD19/CD34/TdT/CD10/CD22/CD45/CD38/CD45) (101).

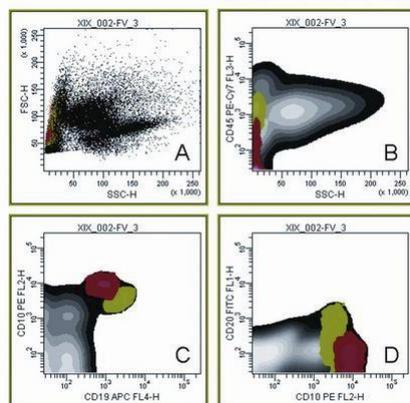


Figura 7

Evidenziazione citometrica di MRD in aspirato midollare di paziente affetto da LAL-B. In rosso: evidenza di cellule leucemiche B residue CD10+++ , CD20-, CD19+, CD45-. In verde: cellule B normali rigeneranti CD10+, CD20 eterogeneo, CD19+, CD45+.

L'analisi molecolare con PCR invece si basa sugli stessi principi descritti sopra per l'analisi MLPA, nella quale però viene ricercata un'alterazione specifica del clone neoplastico già nota per evidenziare l'eventuale presenza di cellule leucemiche nel materiale midollare non visibili/riconoscibili all'analisi microscopica. Per questo lo studio molecolare della malattia alla diagnosi è molto importante per permettere una corretta e completa rivalutazione di malattia minima residua (vedi sezione 6.1.7).

#### 6.3.4 Analisi Immunofenotipo

La tecnica di citofluorimetria viene usata anche per lo studio dell'immunofenotipo.

Come abbiamo già esplicitato, quest'indagine è molto importante sia per la diagnosi che per la stratificazione di rischio delle LAL-B. Nel nostro caso specifico lo scopo era anche valutare quanto il sistema immunitario del paziente fosse 'fit' o 'unfit' a causa dei precedenti

trattamenti citotossici, per ricercare un eventuale correlazione tra una maggior/minor risposta al trattamento con blinatumomab e la presenza/assenza di un buon sistema effetore.

I vari antigeni ricercati alla diagnosi sono riportati nella sezione 1.3.2 Immunoistochimica.

Nel corso dell'arruolamento invece l'indagine immunofenotipica è stata svolta anche per la quantizzazione dei blasti (CD34+), delle cellule CD19+ (cellule target) e dei linfociti T CD3+, e sottoclassi CD4+ Th e CD8+ T citotossici (cellule effettrici).

L'analisi è condotta su sangue periferico o midollare tramite l'utilizzo di anticorpi fluoromarcanti (Ab) specifici per l'antigene (Ag) di membrana ricercato.

Il campione in esame unito a soluzione contenenti tali Ab viene lasciato 15 minuti per permettere il legame Ab-Ag ove presenti, incubato 10 minuti con 3 ml di soluzione lisergica (primo lavaggio), centrifugato a 1800rpm e ripulito del sovrannatante per eliminare gli anticorpi in eccesso. Un secondo lavaggio è poi eseguito con soluzione fisiologica 3 ml. Il campione di cellule così ottenute viene analizzato con citofluorimetro computerizzato, in grado di separare le cellule per diversità di grandezze fisiche (dimensioni e granulosità) ed immunofluorescenza.

### 6.3.5 Analisi del trascritto BCR/ABL

Il materiale biologico utilizzato è costituito da cellule mononucleate ottenute da sangue midollare e periferico dei pazienti, mediante separazione su gradiente di densità con Ficoll-Paque. La tecnica di preparazione del 'pellet' cellulare su cui eseguire le analisi si basa sugli stessi principi dell'analisi citogenetica (vedi paragrafo seguente 6.3.6).

Il pellet così preparato è risospeso in un buffer di lisi così da indurre attraverso diversi passaggi la rottura della parete cellulare e la liberazione del materiale genetico. La miscela è poi fatta passare attraverso un'apposita membrana in silice che assorbe il DNA.

Il materiale isolato viene centrifugato per essere pulito da eventuali detriti e conservato a -20°C.

La stessa cosa è fatta per l'RNA attraverso una membrana in grado di assorbire tale acido nucleico. Riuscire a isolare la quantità di RNA trascritto in un dato momento del ciclo cellulare nelle cellule ci permette di fare un'analisi quantitativa di quanto la cellula sta producendo, oltre alla sola analisi qualitativa del DNA (presenza/assenza dell'anomalia in esame). L'RNA estratto viene retrotrascritto a cDNA (DNA complementare) ed amplificato mediante PCR. Il materiale in esame viene prima denaturato a 95°C così da permettere lo scioglimento dei legami all'interno della doppia elica di DNA, ibridizzato con dei primers specifici per la ricerca delle sequenze bcr/abl (p190 o p210), e laddove queste presenti, amplificato con una polimerasi batterica termo resistente (Taq polimerasi).

La real-time PCR è una tecnica che permette contemporaneamente l'amplificazione e il rilevamento dell'amplificato: si può monitorare la quantità di cDNA durante la fase esponenziale di crescita (quando l'efficienza dipende dalla concentrazione iniziale del template, ovvero del cDNA stampo) per risalire alla quantità di trascritto di partenza. Questa tecnica è stata utilizzata per quantificare i livelli del trascritto BCR-ABL (p210 o p190). Questo è possibile grazie all'introduzione all'interno della reazione di una sonda complementare ad un tratto della sequenza di interesse, legata covalentemente a 2 molecole fluorescenti, un Quencer (Q) al 3' (TAMRA, fluorocromo a bassa energia) e un Reporter (R) al 5' (FAM, fluorocromo ad alta energia): R, eccitato ad una determinata lunghezza d'onda, emette fluorescenza, mentre Q la sopprime, poiché assorbe i fotoni emessi da R. Le condizioni perché ciò avvenga sono la vicinanza tra R e Q e la presenza di sovrapposizione tra lo spettro di emissione di R e quello di assorbimento di Q. Durante la reazione di amplificazione l'attività

5'-3' esonucleasica della Taq polimerasi determina la degradazione della sonda, con allontanamento di R da Q e generazione del segnale di fluorescenza. Uno strumento rileva l'intensità di fluorescenza ad ogni ciclo di reazione, permettendo di monitorare la crescita esponenziale del template. Per ogni campione si otterrà un grafico con la sua curva di crescita, rilevabile tanto prima quanto maggiore era la quantità di template di partenza.

Amplificazione del trascritto mediante Nested-PCR: Al fine di aumentare la sensibilità e la specificità dell'amplificazione del dominio chinasi di Abl, si usa la così detta Nested- Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR).

Questa metodica prevede due successivi step di amplificazione:

- Il primo step mira all'amplificazione del trascritto ibrido Bcr-Abl, in cui si usano primer senso e antisense che si appaiono rispettivamente alle sequenze di Bcr-Abl;
- il secondo step amplifica specificamente sul trascritto riarrangiato il dominio chinasi, utilizzando coppie di primers posizionati più internamente rispetto al primo step.

Ciò permette di selezionare per l'analisi solo l'allele Bcr-Abl riarrangiato e non l'allele wild-type (il che aumenta ulteriormente la sensibilità dell'analisi)

### **Screening mutazionale mediante D-HPLC:**

Per lo screening mutazionale dei frammenti precedentemente amplificati del dominio chinasi di Abl, viene utilizzata la Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (D-HPLC). Questa tecnica è molto sensibile (sensibilità >97%).

L'individuazione di mutazioni puntiformi mediante D-HPLC si basa sulla formazione di diversi frammenti di DNA, così detti omoduplex ed eteroduplex; i primi sono del tutto complementari, i secondi non risultano completamente appaiati appunto a causa del mismatch dovuto alla mutazione. Il materiale viene poi eluito tramite uno specifico cromatografo che viene poi studiato. L'analisi sfrutta infatti la differenza a livello cromatografico del DNA a doppia elica contenente il mismatch, che è meno trattenuto sul supporto cromatografico e quindi eluisce più velocemente rispetto al DNA omoduplex.

### 6.3.6 Analisi Citogenetica

L'analisi citogenetica convenzionale viene eseguita su cellule ottenute da prelievo di midollo osseo tramite agoaspirato o biopsia ossea. Vengono in media allestite  $20 \times 10^6$  cellule in 10 ml di terreno. L'analisi deve essere fatta immediatamente all'arrivo in laboratorio e in condizioni di sterilità. Il terreno normalmente usato è RPMI1640 (Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium), un terreno base usato per cellule in sospensione, arricchito al 30% con siero fetale bovino scomplementato, glutammina e penicillina-streptomina (50 I.U.-50mg/ml). Per ogni caso vengono allestite due colture cellulari poste in incubazione a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 24 e per 48 ore. Successivamente si aggiungono alle colture 80 µl di colchicina, e vengono nuovamente incubate a 37°C per 40 minuti, allo scopo di bloccare le cellule in profase e/o prometafase e/o metafase.

Le colture sono poi centrifugate a una velocità di 1200rpm per 10 minuti e le cellule sono separate dal sovrannatante che viene quindi rimosso. Il 'pellet cellulare' rimasto viene sottoposto a un trattamento ipotonico aggiungendo 8 ml di KCl 0,075M, incubato per 10 minuti a 37°C, centrifugato a di 1200rpm e pulito da ulteriore sovrannatante.

Il materiale ottenuto viene quindi fissato con acido acetico e alcool metilico in proporzione 1:3, e successivamente sottoposto a 3 cicli di lavaggio con fissativo fresco per eliminare materiale cellulare superfluo. Le cellule così ottenute vengono utilizzate per allestire due vetrini. Questi vengono lasciati a 60°C da 1 a 3 giorni e infine colorati tramite tecniche di bandeggio cromosomico. Quest'ultime sono metodiche chimiche in grado di evidenziare un pattern di bande chiare e scure sulla struttura cromosomica, normalmente non visibili.

Questo pattern è specifico per ogni cromosoma. A seconda del tipo di analisi citogenetica di interesse possono essere usate tecniche di bandeggio differenti (es. tecnica R/T reverse specifica per lo studio dei telomeri).

In pazienti con sospetta o certa LAL -B si allestisce un'ulteriore coltura processata dopo un'ora di incubazione a 37°C. Alla diagnosi devono essere studiate almeno 20 cellule in metafase e alla rivalutazione clinica almeno 30. Un sistema di analisi computerizzato collegato al microscopio permette poi la classificazione dei cromosomi secondo l'International System for Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Con questa tecnica si possono vedere alterazioni citogenetiche quali delezioni cromosomiche intere (monosomie) o parziali (delezioni braccia p o q), duplicazioni cromosomiche, traslocazioni (es. cromosoma Philadelphia).

Un'alterazione cromosomica è definita clonale quando due o più cellule presentano la stessa anomalia strutturale o lo stesso cromosoma sovra-numerario, oppure 3 o più cellule

presentano la stessa monosomia. Altrimenti l'alterazione q classificata come non clonale. Un cariotipo si definisce invece complesso quando presenta più di 3 anomalie strutturali.

La tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) prevede l'utilizzo di vetrini allestiti con il materiale ottenuto dalla citogenetica conservato a -20°C.

Dopo una serie di altri passaggi, la cui descrizione esula dallo scopo di questa tesi, ai vetrini viene aggiunto una soluzione contenente delle sonde marcate con fluorocromi specifiche per l'alterazione citogenetica da ricercare il cui riscontro abbia un risaputo valore diagnostico, terapeutico o prognostico.

La miscela di ibridizzazione contenente la sonda viene posta su ogni vetrino e questi vengono disposti nella macchina Hybrite (Vysis Inc, Richmond, United Kingdom) dove avviene un'incubazione a 37°C per 10 minuti, la codenaturazione di sonda e vetrino a 73°C per 3 minuti e l'ibridizzazione tra DNA della sonda e DNA del materiale per 24 ore a 37°C. Dopo una serie di lavaggi i vetrini vengono contro colorati con DAPI, un colorante nucleare fluorescente, e osservati al microscopio a fluorescenza. La colorazione del nucleo è necessaria per visualizzare i segnali emessi dalle sonde, laddove presenti, altrimenti non visibili singolarmente. Dove possibile vengono analizzate 200 cellule alla diagnosi e 300 cellule in corso di rivalutazione di malattia. L'esame si definisce negativo quando la percentuale di nuclei positivi per lo specifico riarrangiamento è inferiore al valore di cut-off specifico per il tipo di sonda.

### 6.3.7 Analisi Statistica

L'analisi della sopravvivenza è stata effettuata mediante il modello di Kaplan-Meier e le differenze tra gruppi sono state valutate applicando il log-Rank test ai dati di sopravvivenza. L'analisi multivariata per la determinazione di un modello causale esplicativo dell'outcome, inteso come remissione completa, è stata effettuata mediante regressione logistica.

Il modello di regressione di Cox è stato utilizzato per esplorare l'eventuale relazione causale tra le variabili considerate e la sopravvivenza dei pazienti. I modelli di regressione sono stati realizzati mediante meccanismo iterativo e selezione basata sulla varianza residua o AIC. Il test esatto di Fischer è stato utilizzato per valutare l'associazione tra alcune variabili e la remissione completa. Le variabili continue sono state discretizzate per ottenere variabili dicotomiche. Le soglie per la discretizzazione sono state ottenute mediante selezione iterativa valutando la distribuzione dei valori assunti. I valori di Odds ratio e rischio relativo sono stati calcolati sulla base delle osservazioni raccolte in tabelle di contingenza 2x2.

## 7. Risultati

Sono stati trattati complessivamente 39 pazienti (dati aggiornati a Dicembre 2017), di questi 27 pazienti sono stati trattati con Blinatumomab ad uso compassionevole.

L'analisi statistica è stata condotta su un totale di 25 pazienti che sono risultati omogeneamente trattati.

Un solo paziente è stato sospeso dal trattamento per mal tollerabilità al farmaco e persistenza di AEs. Quasi tutti i pazienti hanno sviluppato un rialzo febbrile al primo giorno di infusione (C1D1) e/o al dose-step (C1D8), 4 pazienti anche al primo giorno di infusione in cicli consecutivi, nonostante il pretrattamento. Il nadir di globuli bianchi, piastrine ed emoglobina è stato raggiunto per tutti al primo ciclo.

Tredici pazienti, il 52%, hanno ottenuto una remissione clinica al primo ciclo (CR1) di trattamento, di cui undici, il 44%, anche a livello molecolare. Tre pazienti sono risultati invece persistenti e sette con progressione di malattia sotto trattamento.

Alla fine del secondo ciclo 5 pazienti hanno perso la remissione e sono ricaduti, per cui è stata arrestata l'infusione del farmaco. Nessuno dei tre pazienti persistenti ha ottenuto una remissione clinica alla fine del secondo ciclo, (CR2), ed è stato arrestato il farmaco.

Dei pazienti analizzati, sei pazienti sono risultato eleggibile per alloTMO post-blinatumomab. Non è stata invece riscontrata nessuna morte dovuta al nostro trattamento o sua complicanza.

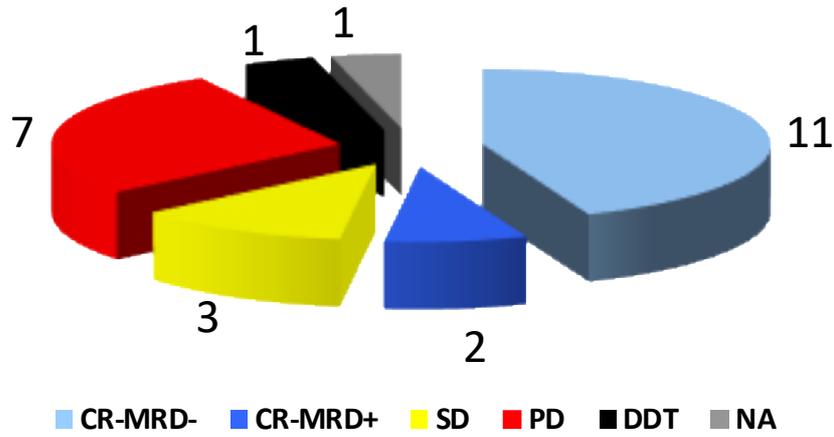
N° di pazienti	<b>25</b>	
Età Diagnosi	Media 42 aa	min/max: 15-72 aa
Caratteristiche fenotipiche alla diagnosi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pro-B ALL: 4 pz</li> <li>- “Common” B-cell ALL: 10 pz</li> <li>- Pre-B ALL: 10 pz</li> <li>- Ly-crisis CML: 1 pz</li> </ul>	
Stato di malattia all’inizio della terapia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Malattia in progressione: 9 pz</li> <li>- MRD-positiva: 6 pz</li> </ul>	
Caratteristiche genetiche della malattia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>BCR-ABL1</b> positive: 14 pz</li> <li>- p190: 9 pz</li> <li>- p210: 5 pz</li> <li>- <b>TCF3-PBX1</b>: 1 pz</li> <li>- <b>MLL-AF4</b>: 1 pz</li> </ul>	
Precedenti trattamenti	Mediana: 3 linee di terapia	min/max: 1-7 11 pz CHT 12 pz CHT + TKI 2 pz TKI
Tipologia TKI	3 pz Imatinib 12 pz Dasatinib 2 pz Nilotinib 11 pz Ponatinib	
GB Diagnosi	Mediana: 15,800 / $\mu$ L	min/max: 1,900-313,000 / $\mu$ L
GB inizio trattamento BiTE	Mediana: 2800 / $\mu$ L	min/max: 700-76,500 / $\mu$ L
<b>Linfociti T all’arruolamento (CD3+)</b>	<b>Media: 67 %</b> <b>CD3+ CD4+: 29%</b> <b>CD3+ CD8+:34%</b>	<b>min/max: 8,9%-82,3%</b> <b>4,1%-57,9%</b> <b>4,7%-61,3%</b>
Media cicli (CxDx)	<b>2,34</b> (mediana 2)	Range 1-6
N° pz non in remissione post I° ciclo	1 pz sospeso per AEs 3 pazienti in progressione	
N° pz in CR post I° ciclo	CR morfologica: 11	CR molecolare: 6

Valutazione dei pazienti in corso di trattamento

<b>N° AEs (dati dei primi 16 pz)</b>	<b>Media 2,33 (mediana 3)</b>	<b>Totale 35</b>
<b>Febbre</b>	<b>Tot:11</b>	<b>Assenza febbre: 3 pz Febbricola(&lt;38°C): 2 pz Febbre (≥38°): 11 pz</b>
<b>Citopenia (nadir GB)</b>	<b>Mediana: 715 /μL</b>	<b>min/max: 100/μL-7.300/μL</b>
<b>Nadir Plt</b>	<b>Mediana 21.500/μL</b>	<b>Min/max: 3000 plt/μL- 177.000plt/μL</b>
<b>Nadir Hb</b>	<b>Mediana: 8,8 mg/dl</b>	<b>Min/max: 7,6 mg/dl-12,9 mg/dl</b>

*Tabella 13*

Risposta al trattamento: raggiungimento di RC nel 52% dei pazienti. L'85% dei pazienti ha ottenuto una risposta completa molecolare.



Risposta al trattamento in relazione al numero di ciclo di Blinatumomab.

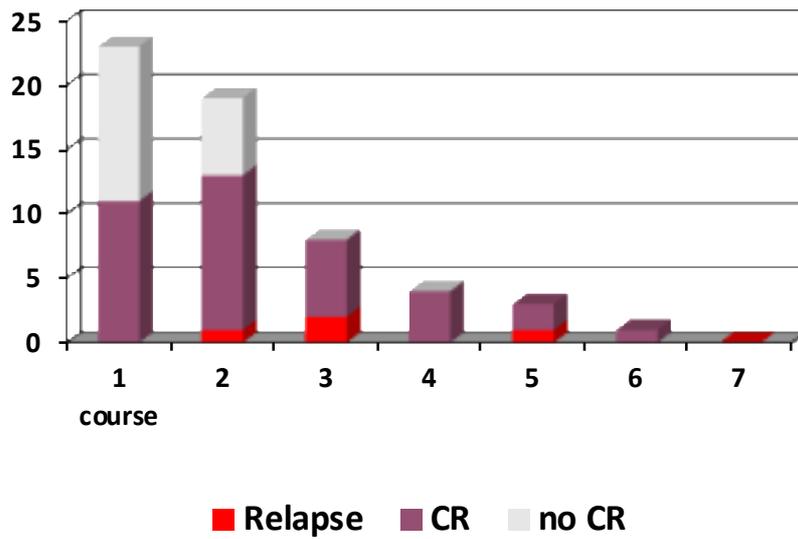
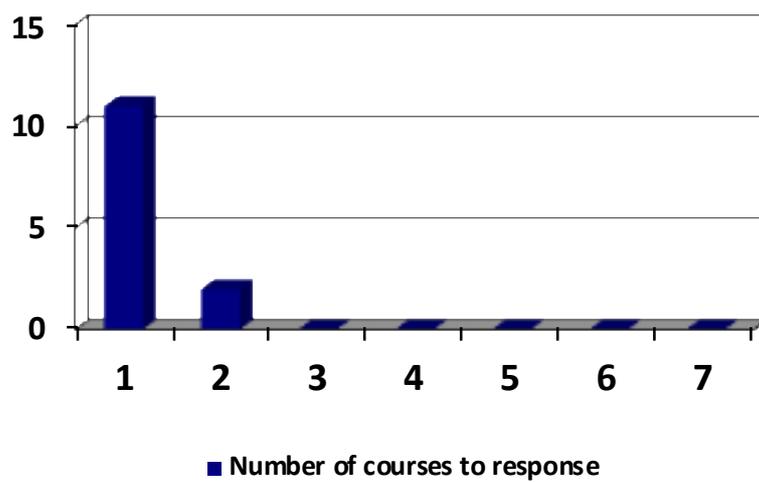


Figura 8

Numero di ciclo ed ottenimento di risposta completa.



*Figura 9*

Risposta al trattamento *MRD-* vs. *MRD+* vs. *no CR*.

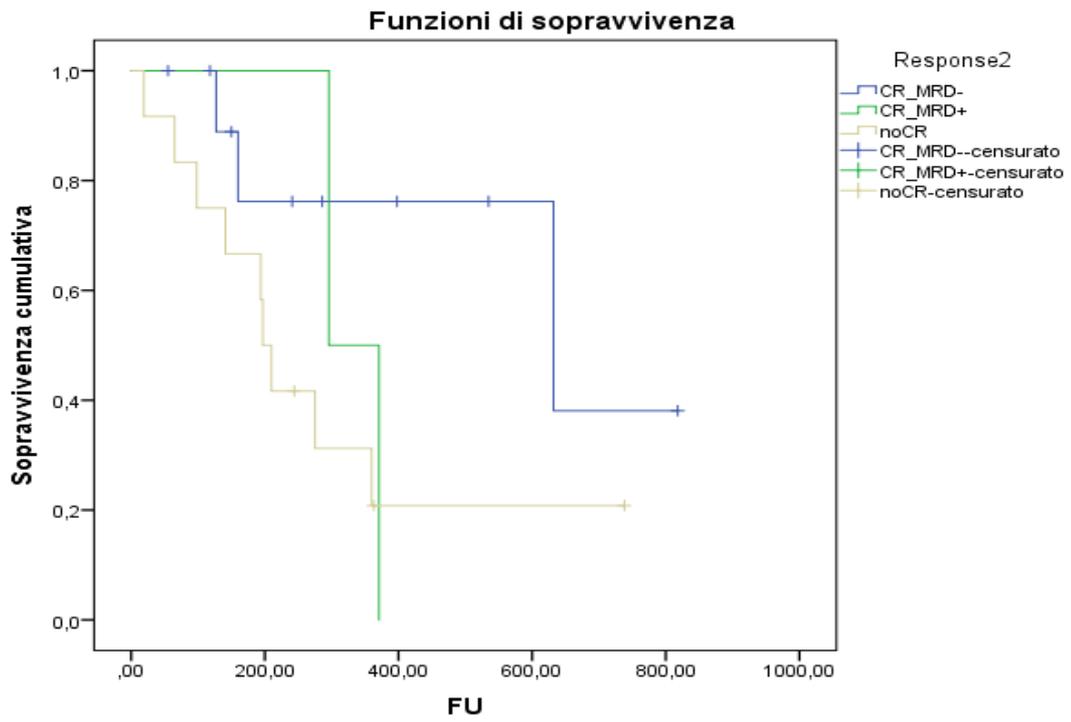
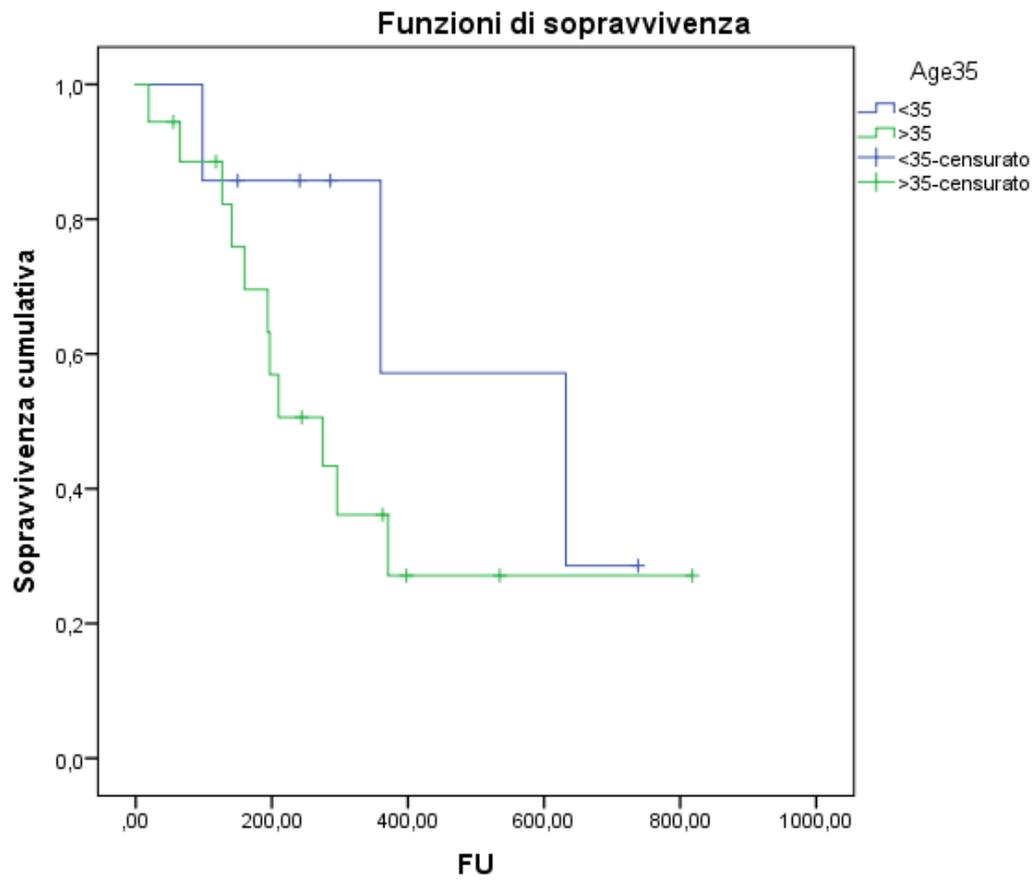


Figura 10

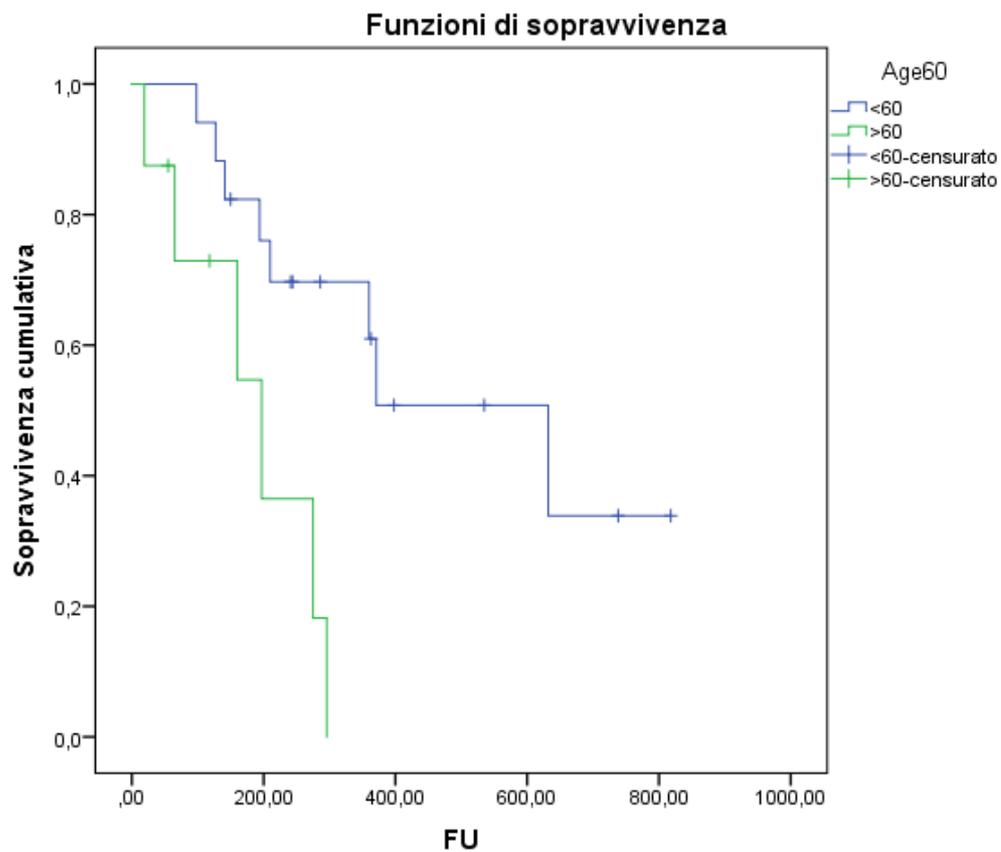
Sopravvivenza globale in funzione dell'età (Cox,  $p=0.0124$ ).



**<35 vs. >35**

*Figura 11*

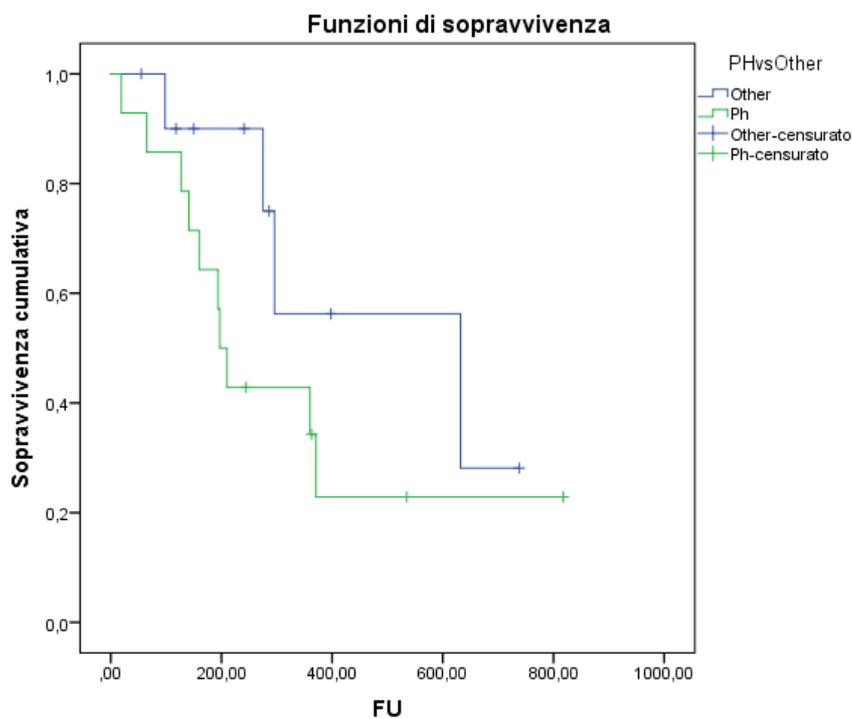
Sopravvivenza globale in funzione dell'età (Cox,  $p=0.0124$ ).



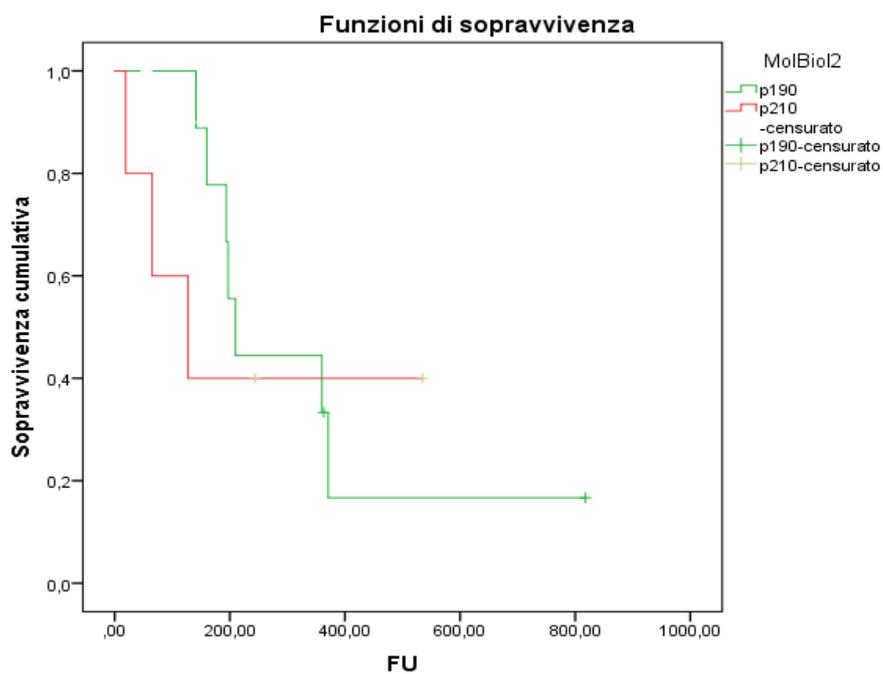
**<60 vs. >60**

*Figura 12*

Sopravvivenza globale in funzione delle caratteristiche genetiche della patologia.



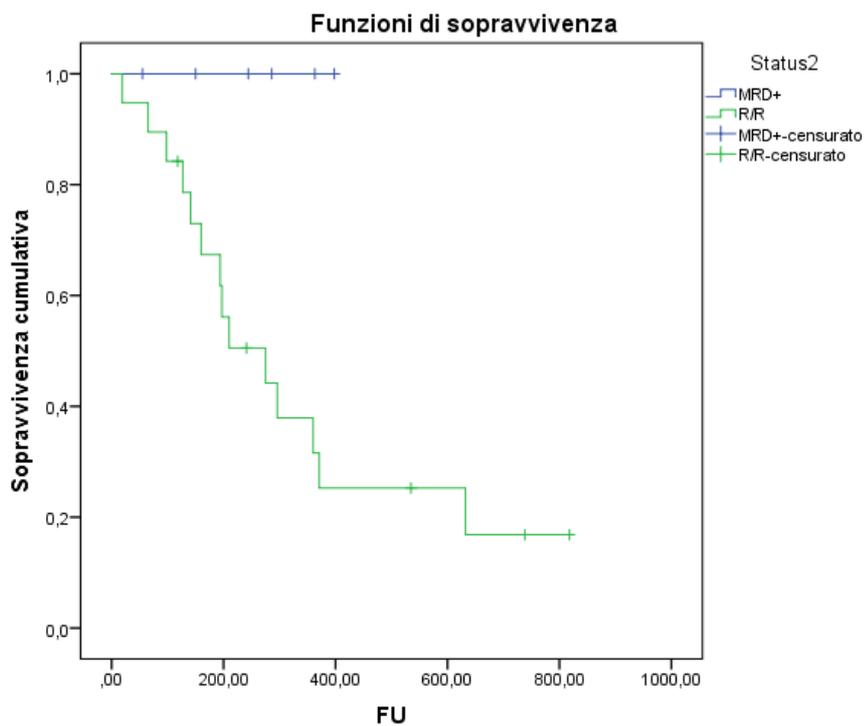
*BCR-ABL1*-pos vs. Others



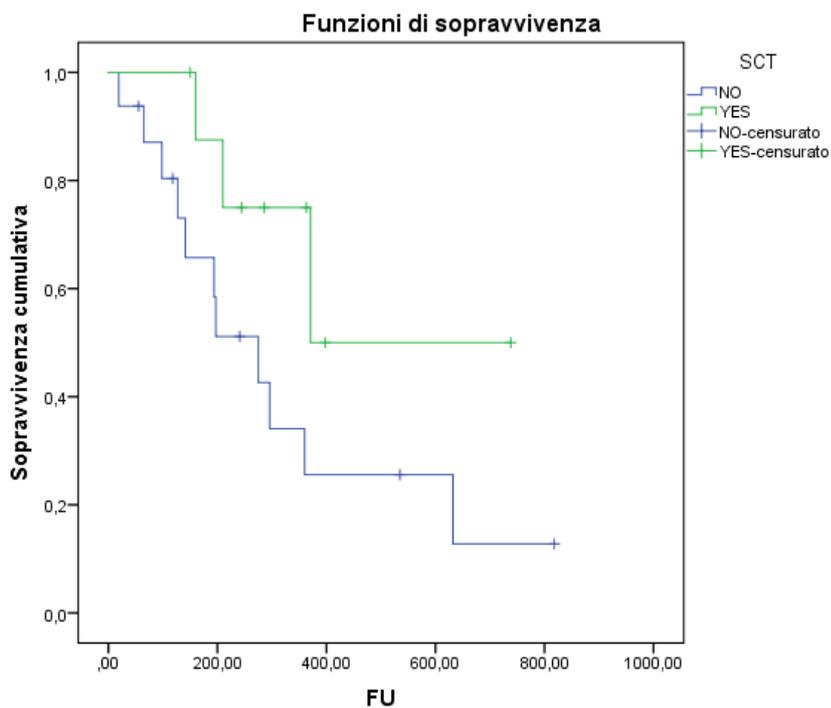
p190 vs p210

Figura 13

Sopravvivenza globale in funzione dello stato di malattia e SCT.



MRD+ vs. malattia attiva



Confronto tra pazienti sottoposti o meno ad AlloSCT.

Figura 14

Sopravvivenza globale in funzione della risposta al trattamento.

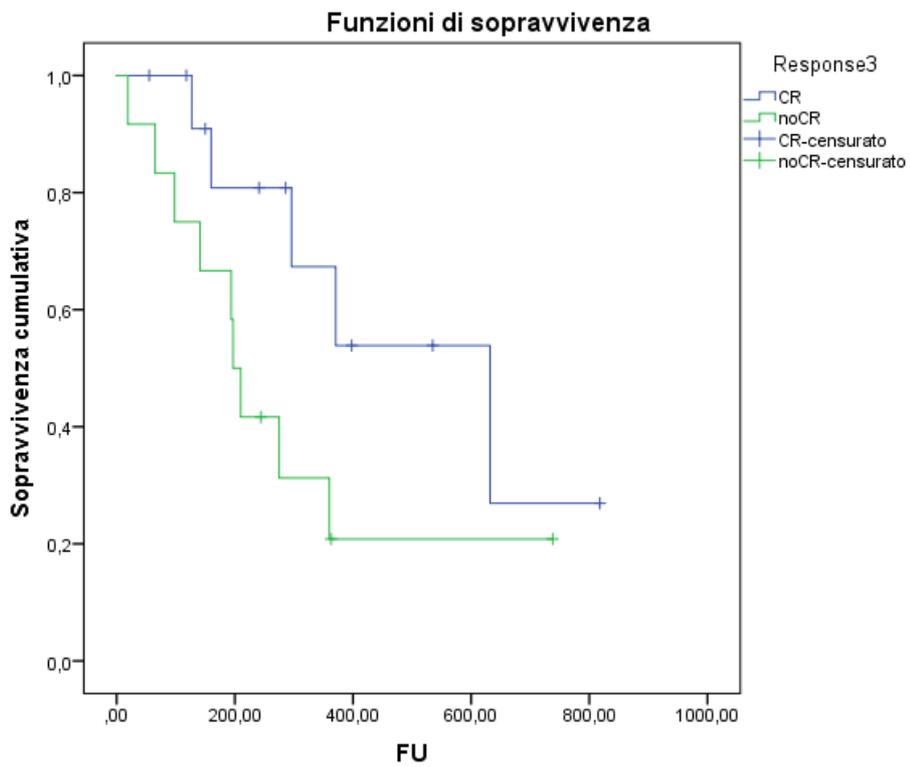
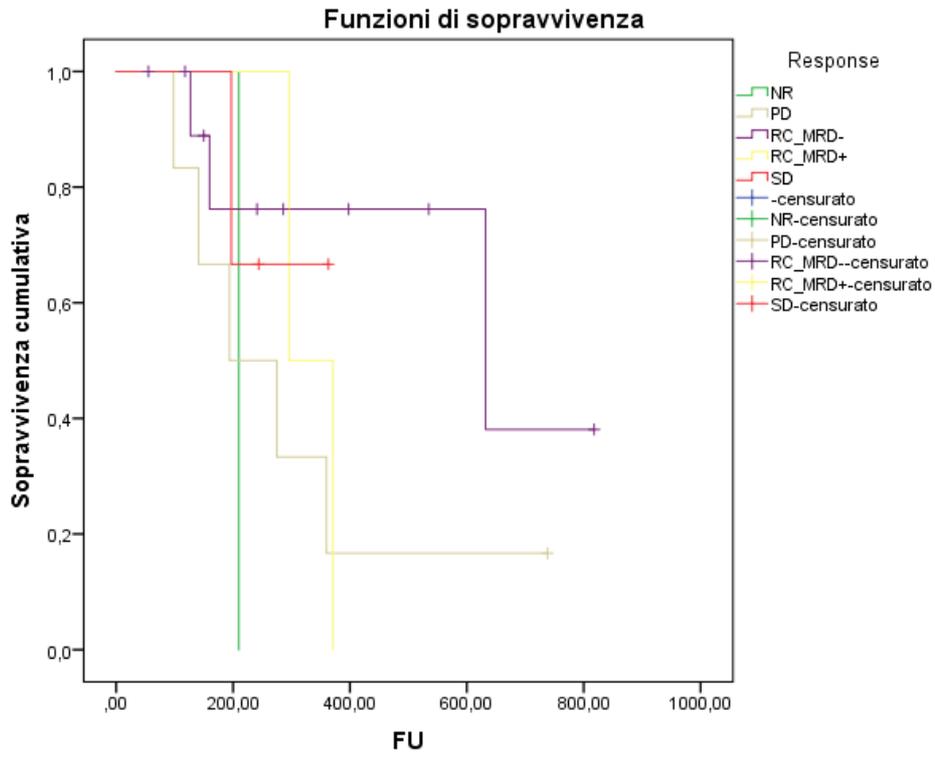


Figura 15

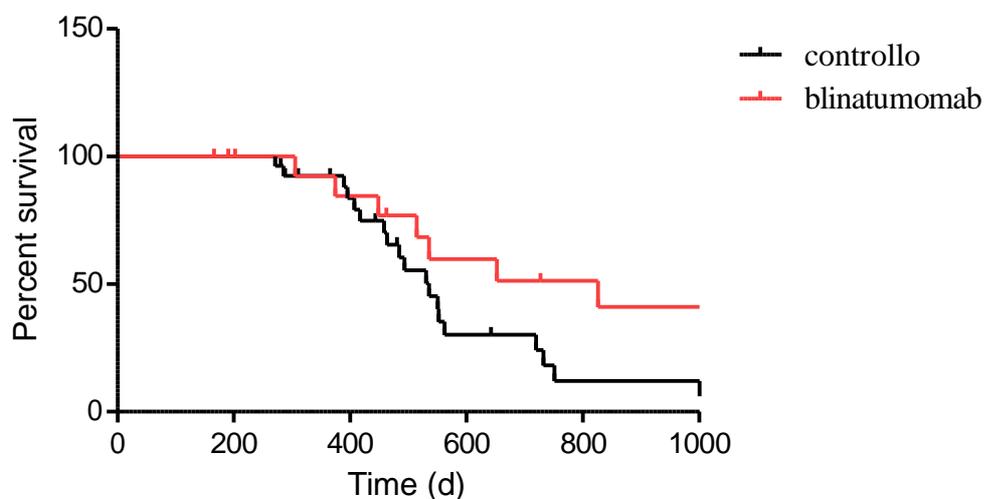
Benché la popolazione a confronto sia stata selezionata nel decennio precedente, le tecniche terapeutiche in questo intervallo di tempo non hanno apportato miglioramenti in termini percentuali di outcome e DSF quindi possiamo considerare il confronto scevro da eventuali bias statistici. Tale analisi è stata condotta sui primi 16 pazienti analizzati non sulla casistica completa.

Del totale dei 180 pazienti in archivio sono stati selezionati solo i pazienti valutati come alto rischio, per prendere una coorte con prognosi iniziale simile ai pazienti arruolati nel nostro studio, per un totale di 11 donne e 16 uomini, con età media 45,7 anni.

Sono stati confrontati:

- L'overall survival dalla data di diagnosi a quella del decesso nelle due popolazioni in esame.
- L'intervallo di tempo tra l'inizio del trattamento con il blinatumomab e il decesso nella nostra coorte con l'intervallo di tempo dalla data di prima ricaduta al decesso nel gruppo confronto.
- L'intervallo di tempo tra l'inizio del trattamento con il blinatumomab e il decesso nella nostra coorte con l'intervallo di tempo dalla data di seconda ricaduta al decesso.
- Il tempo libero da ricaduta invece dopo remissione clinica ottenuta con blinatumomab a confronto di terapie convenzionali.

OS Controllo vs blina: proporzioni di sopravvivenza.

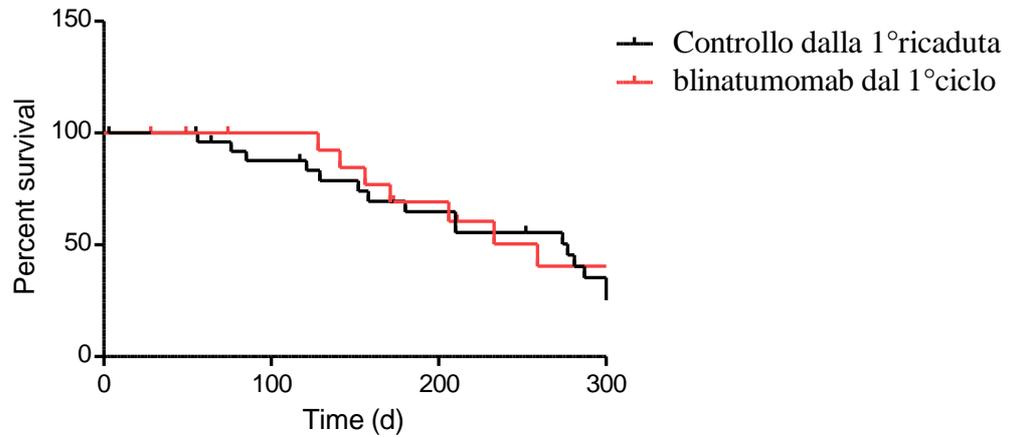


Comparison of Survival Curves	
Log-rank (Mantel-Cox) Test	
Chi square	4.803
df	1
P value	0.0284
P value summary	*
Are the survival curves sig different?	Yes
Gehan-Breslow-Wilcoxon Test	
Chi square	1.878
df	1
P value	0.1706
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No
Median survival	
control	535.0
blinatumomab	826.0
Ratio	0.6477
95% CI of ratio	0.1924 to 1.103
Hazard Ratio	
Ratio	2.397
95% CI of ratio	1.097 to 5.237

Figura 16

La curva ha mostrato un guadagno di sopravvivenza con un ‘median survival’ di 826 giorni (27.5 mesi) per i pazienti trattati con blinatumomab rispetto a 535 giorni (17.8 mesi) per la popolazione a confronto.

OS controllo dalla 1<sup>a</sup> ricaduta vs pt dall'inizio del 1<sup>o</sup> ciclo blina:  
proporzione di sopravvivenza.

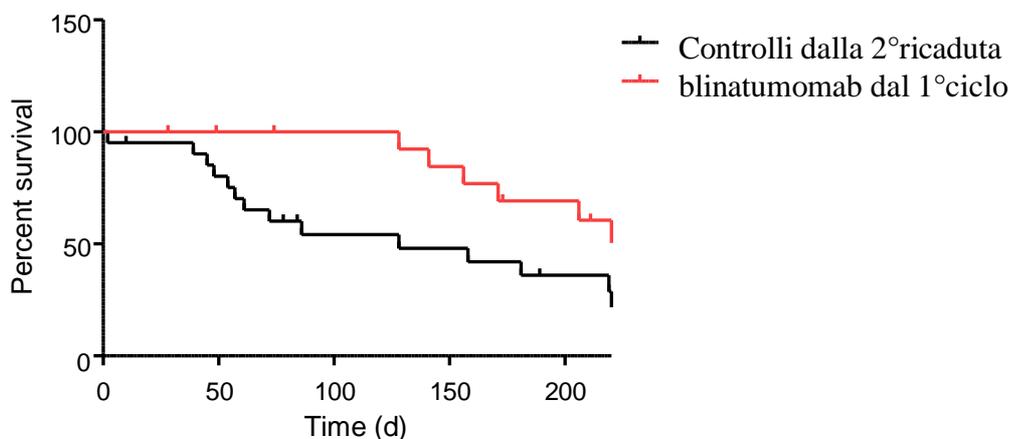


Comparison of Survival Curves	
Log-rank (Mantel-Cox) Test	
Chi square	0.03502
df	1
P value	0.8516
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No
Gehan-Breslow-Wilcoxon Test	
Chi square	0.1888
df	1
P value	0.6639
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No
Median survival	
control from 1st relapse	277.0
blinatumomab	259.0
Ratio	1.069
95% CI of ratio	0.6142 to 1.525
Hazard Ratio	
Ratio	1.080
95% CI of ratio	0.4819 to 2.421

Figura 17

Confrontando invece il tempo intercorso tra la data di prima ricaduta ed il decesso e il giorno di inizio trattamento con blinatumomab ed il decesso non si sono riscontrate differenze significative nelle curve di sopravvivenze delle due popolazioni, che sono sovrapponibili.

OS controlli dalla 2°ricaduta vs pt dal 1°ciclo di Blina:  
proporzioni di sopravvivenza

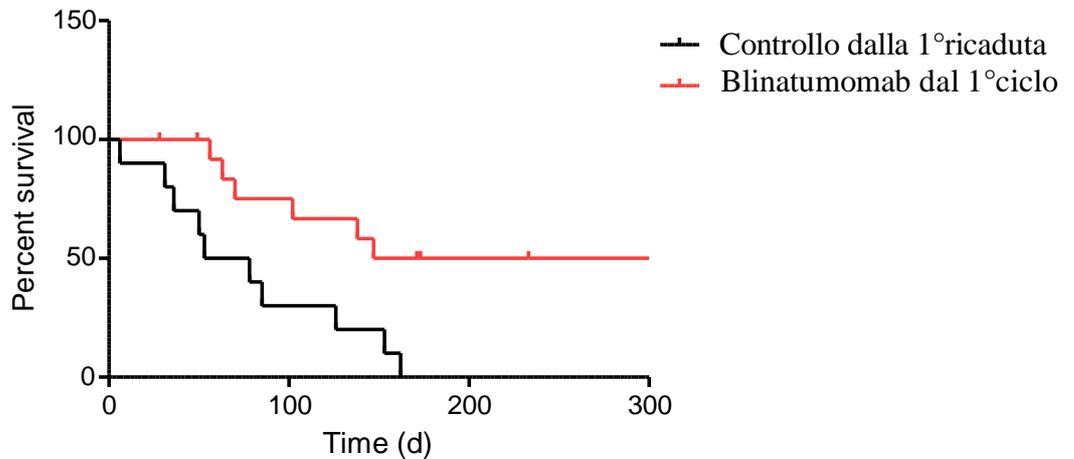


Comparison of Survival Curves	
Log-rank (Mantel-Cox) Test	
Chi square	7.009
df	1
P value	0.0081
P value summary	**
Are the survival curves sig different?	Yes
Gehan-Breslow-Wilcoxon Test	
Chi square	6.868
df	1
P value	0.0088
P value summary	**
Are the survival curves sig different?	Yes
Median survival	
control from 2nd relapse	128.0
blinatumomab	259.0
Ratio	0.4942
95% CI of ratio	0.04845 to 0.9400
Hazard Ratio	
Ratio	3.017
95% CI of ratio	1.332 to 6.833

Figura 18

Andando a valutare invece, come nel grafico seguente il tempo tra la seconda ricaduta e il decesso con lo stesso intervallo di tempo per la nostra coorte (inizio Blinatumomab-decesso) la differenza ottenuta è significativa con OR pari a 3,017 a sfavore di coloro che non hanno ricevuto il nostro farmaco (p value<0,05).

DFS controllo alla 1°ricaduta vs pt dal 1°ciclo di Blina: proporzioni di sopravvivenza



Comparison of Survival Curves	
Log-rank (Mantel-Cox) Test	
Chi square	8.055
df	1
P value	0.0045
P value summary	**
Are the survival curves sig different?	Yes
Gehan-Breslow-Wilcoxon Test	
Chi square	7.425
df	1
P value	0.0064
P value summary	**
Are the survival curves sig different?	Yes
Median survival	
control from 1st relapse	65.50
blinatumomab	294.5
Ratio	0.2224
95% CI of ratio	-0.1582 to 0.6031
Hazard Ratio	
Ratio	4.780
95% CI of ratio	1.623 to 14.08

Figura 19

Considerando infine il tempo libero da ricaduta dopo remissione clinica ottenuta con blinatumumab a confronto di terapie convenzionali, troviamo una differenza statisticamente significativa tra le due curve con OR di 0,2 a favore dei pazienti trattati con blinatumomab (p value<0,5).

Nei primi 16 pazienti, è stata eseguita poi un'analisi multivariata per analizzare se eventuali fattori di rischio/protettivi all'inizio della terapia potessero influire sull'outcome finale e l'ottenimento della remissione clinica.

Sono state eseguite analisi di tipo Cox e Regressione logistica su:

- Positività per cromosoma Philadelphia (indicativo di bassa chemiosensibilità-fattore presunto negativo).
- Presenza di mutazione T315I nei pazienti Ph+ (indicativo di alta chemioresistenza-fattore presunto negativo).
- Valori ematologici all'arruolamento: globuli bianchi (indicativi di blastosi-fattore presunto negativo), piastrine, emoglobina (indicativi della normale funzione midollare-fattori presunti positivi).
- LDH arruolamento (indicativo della massa tumorale-fattore presunto negativo)
- Valori linfociti T CD3 all'arruolamento e sottopopolazioni CD4 T helper e CD8 T citotossici (cellule effettrici della risposta blinatumomab-indotta, fattore presunto positivo).
- Valori di linfociti B CD19 positivi (cellule blastiche blinatumomab-sensibili, fattore presunto negativo).

Nessuna delle analisi compiute (multivariata) ha però mostrato differenze significative tra i pazienti della nostra coorte che hanno ottenuto una remissione al primo ciclo (CR1-primary end point) o al secondo ciclo (CR2-second end point) rispetto ai pazienti che non l'hanno ottenuta o l'hanno persa al secondo ciclo.

Mediante il test di associazione di Fisher e considerando il valore di Linfociti CD3, stratificato in due livelli alto e basso, e considerando come soglia il valore di 70% di CD3 al momento dell'inserimento nel trial del paziente (screening) ed ottenendo così una variabile dicotomica che esprima la presenza di CD3 come valore alto e basso, abbiamo rilevato una associazione tra il valore alto di CD3 e l'ottenimento di CR1 (Tabella 19). L'Odd Ratio associato al test ha inoltre mostrato una forte associazione positiva (OD=26). È stato infine calcolato il rischio relativo RR che è risultato pari a 5.3.

Analisi test di Fisher

Cut off:  $CD3 < 0 \geq 70\%$

	CR (outcome)	YES	NO
Risk Factor			
CD3 HIGH		7	0
CD3 LOW		0	4

Tabella 14

Fisher's Exact Test for Count Data

data: count

p-value = 0.01099

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

1.395479 2069.735649

sample estimates:

odds ratio

26.03588

RR=5.333333

## 8. Discussione

I risultati del nostro studio in termini di percentuale di induzione di remissione clinica, DFS e OS possono essere discussi secondo tre termini di paragone. In primo luogo prendendo a confronto la nostra coorte di a) pazienti trattati con Blinatumomab e confrontandola con le analisi svolte sulla casistica di Bologna, dei b) pazienti con LAL-B trattati con terapia convenzionale possiamo dire che il blinatumomab ha mostrato un netto miglioramento in termini di sopravvivenza totale media (Figura 10).

Il rapporto tra tempo di sopravvivenza media dalla prima ricaduta al decesso nella popolazione a confronto e il tempo di sopravvivenza media tra l'inizio del blinatumomab (C1D1) al decesso nella nostra coorte è stato valutato su tutti i pazienti: infatti tutti i pazienti arruolati nello studio con BITE, erano almeno in prima ricaduta. Era possibile pertanto valutare gli intervalli di tempo ricaduta-trattamento convenzionale-decesso e ricaduta-blinatumomab-decesso e paragonarlo tra le due popolazioni a e b, trattati diversamente (Figura 11).

Mentre non abbiamo notato differenze significative in termini di OS ed andamento clinico, tra tali due coorti di pazienti, queste sono state riscontrate usando come confronto pazienti in seconda od ulteriore ricaduta: infatti, il nostro studio mostra un guadagno significativo in termini di sopravvivenza nei pazienti del gruppo a (Figura 12). Considerando che metà della nostra popolazione è stata arruolata in seconda /terza ricaduta con una media di 1,8 ricadute p/p precedenti l'arruolamento, possiamo ipotizzare che il primo tipo di analisi non abbia mostrato risultati poiché prendeva in esame due intervalli di tempo non equiparabili, a sfavore dei dati raccolti nella nostra coorte a.

Importante invece è stato ottenere un guadagno di intervallo libero da malattia (DFS) significativo per i pazienti trattati con blinatumomab rispetto al DFS dei pazienti dopo prima ricaduta nella popolazione a confronto trattati con altre terapie di salvataggio, a indicare un vantaggio in termini di 'mesi guadagnati' per i pazienti sottoposti al nostro trattamento.

Lo scopo della terapia con blinatumomab, nella maggior parte dei casi in ricaduta o resistenti, può non essere quello di ‘guarire’ il paziente direttamente con il solo farmaco (nelle casistiche internazionali questo avviene solo nel 23% dei casi, soprattutto in quelli trattati con malattia minima residua, al dosaggio del BITE di 69 microgrammi /Kg, e ottenenti la risposta ematologica completa al primo ciclo di Blinatumomab) ma quello di permettergli di ottenere una remissione clinica e/o una remissione molecolare così da poter esser sottoposto a trapianto allogenico di midollo (alloTMO).

Il trapianto di midollo da donatore rappresenta per molti pazienti, e per tutti quelli ad alto rischio, una se non l’unica chance curativa fino ad oggi conosciuta: e requisito fondamentale per potersi sottoporre è l’ottenimento di una remissione clinica completa.

Confrontando invece i nostri risultati di OS e DFS con la letteratura scientifica, nella popolazione generale di malati con LAL dell’adulto, e non stratificata per rischio, possiamo dire che il 27,3% di OS a 5 anni e il 26,9% di OS a un anno dall’inizio del trattamento con blinatumomab sono equiparabili, con un trend al di sotto delle percentuali di sopravvivenza media (34% a cinque anni)(102) riconosciute dalla casistica mondiale e il farmaco blinatumomab non sembra apportare un vantaggio significativo per i pazienti della nostra coorte rispetto al totale dei pazienti LAL-B finora non trattati con tale farmaco.

Se invece andiamo a fare un’analisi rischio specifica, come è stata con la casistica di Bologna, andando a considerare i risultati di OS e DFS per i pazienti high risk otteniamo risultati sovrapponibili agli studi di trattamento standardizzati per classi di rischio per cui l’outcome a 5 anni risulta del 49% per i pazienti rischio standard, 27% per i pazienti ad alto rischio (come 16/16 dei nostri pazienti) e 24% per i pazienti considerati ‘very high risk’, ovvero i pazienti con riarrangiamento BCR/ABL o t(4;11) (come 11/16 dei nostri pazienti) (102).

In fine possiamo confrontare i dati attesi con le precedenti esperienze cliniche ottenute dalla casistica tedesca del Dr Topp con l'utilizzo di Blinatumomab. Lo studio di 21 pazienti in CR con MRD+, primary end point regressione della MRD, aveva ottenuto tassi di risposta dell'80%. Tale popolazione però a differenza della nostra includeva solo pazienti che non avevano ricevuto precedenti trapianti allogenici da donatore, e con una blastosi periferica e midollare nulla e/o <5% rispettivamente. Dei nostri pazienti invece solo 2 erano in CR con MRD+ al momento dell'inizio della terapia e 7/16 erano stati sottoposti a precedente alloTMO: tutti erano comunque stati trattati con plurime terapie chemioterapiche di salvataggio.

Questo a indicare che il sistema immunitario dei pazienti della nostra popolazione era indubbiamente stato defedato dai precedenti cicli di trattamento e poiché un requisito chiave dell'efficienza del nostro farmaco è appunto la presenza di cellule T effettrici (CD3 positive) in grado di attuare l'azione citotossica sul clone neoplastico, iniziare il trattamento in condizioni 'unfit' influisce logicamente sull'outcome.

Paragoni sul DFS, 62% a 33 mesi per lo studio di Topp, non sono ancora possibili poiché il follow-up della nostra coorte ha permesso solo un'analisi a 300 giorni (con DFS pari a 47,3%). Tuttavia i dati, pur in presenza di una casistica profondamente diversa sono altamente incoraggianti. I risultati ottenuti dalla nostra coorte sono indubbiamente inferiori a quelli presumibilmente attesi, ma la differenza è ben spiegata dalla diversa selezione della coorte di partenza.

Confrontando invece i nostri valori di CR, alla fine del secondo ciclo, pari a 28,57%, con lo studio di Topp avviato nel 2013, su pazienti simili ai nostri, in full blastosi o pluritrattati, comprendendo anche pazienti che avevano ricevuto un precedente trapianto da donatore, con tassi di CR al secondo ciclo pari a 33%, possiamo dire che i nostri dati rispecchiano quelli attesi. Analizzando i risultati della nostra analisi multivariata infine possiamo affermare che non è stato possibile individuare un rapporto di causalità tra le variabili osservate e l'end-point (CR1 e/o CR2) nemmeno per la variabile di cellularità midollare con cut-off  $< 0 \geq 50\%$  individuata nello studio di Topp.

Da considerare il fatto che **la nostra coorte analizzata è costituita attualmente di soli 16 pazienti**, appartenenti a tre classi di protocollo diversi e selezionato con caratteristiche differenti, quindi possiamo considerare la casistica come troppo esigua per studi statistici di questo tipo dove le variabili possibili da considerare equipareggiano se non eccedono il numero di end point valutabili.

Rilevante invece è stato trovare una correlazione tra il rapporto di linfociti T CD3+ in circolo e l'ottenimento della remissione clinica con Odd Ratio di 26 altamente significativa. E' infatti importante valutare che il valore dei linfociti CD3 positivi nei pazienti responsivi sia significativamente più alto rispetto ai pazienti non responsivi, suggerendo strategie di "preparazione" del paziente al blinatumomab (IFN, IL2, etc) al fine di potenziare il sistema immunitario

Questo a conferma dell'importanza che ricopre lo stato del sistema immunitario del paziente all'inizio del trattamento con blinatumomab e del significato clinico che implicherebbe utilizzare tale terapia anche in prima linea di ricaduta, quando ancora il sistema immunitario non è stato indebolito da altri trattamenti quali chemioterapie, piuttosto che trapianti da donatore.

## 9. Conclusioni

In conclusione possiamo affermare che l'utilizzo clinico dell'anticorpo bispecifico BiTE Blinatumomab ha dato risultati promettenti e in linea con i dati attesi dai precedenti studi di fase I e II.

Il farmaco è stato approvato come trattamento di prima ricaduta (FDA già approvato) nelle LAL Ph neg, ma anche nelle Ph positive.

Per i farmaci che apportano infatti risultati significativi per la sopravvivenza in campi come quello delle leucemie linfoblastiche acute, ancora a pessima prognosi, è infatti previsto un canale rapido di validazione e approvazione in concordanza con i principi morali dei comitati etici.

Il farmaco è disponibile anche per studi di fase III come uso in prima linea delle LAL-B considerate ad alto rischio per ottenere subito una remissione clinica, e per tempi più duraturi, come i dati ottenuti dal nostro e dagli altri studi sembrano suggerire. Poiché la risposta al farmaco è basata sulla presenza di un sistema immunitario efficiente, si potrebbe valutare l'arresto dell'impiego del Desametasone in fase di screening e pre-trattamento alla prima infusione/dose step, poiché, come ben noto i corticosteroidi sono un importante classe di farmaci immunosoppressori e alcuni studi sembrano correlare l'utilizzo di tale farmaco con percentuali di risposta al blinatumomab inferiori, anche se i risultati sono controversi.

## 9.1 Sviluppi futuri

Sull'utilizzo del sistema linfocitario T, nella sua azione sia regolatoria che citotossica, si basa un'altra recente metodica di trattamento molto interessante e dagli sviluppi promettenti, che rappresenterà sicuramente il futuro del trattamento delle leucemie acute linfoblastiche a cellule B, nonché in molti altri tipi di patologie neoplastiche: stiamo parlando dei CART. L'acronimo sta per Chimeric Antigen Receptor (CAR) Therapy

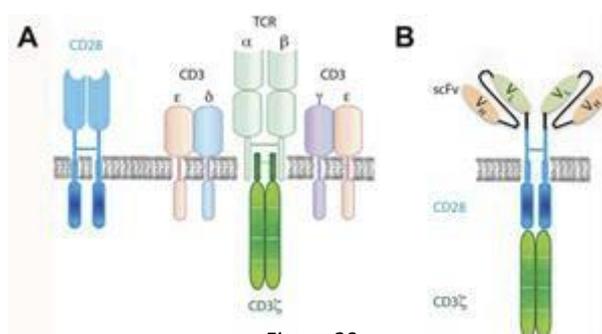


Figura 20

I linfociti T normalmente riconoscono le cellule target tramite i recettori TCR (T Cell Receptor) che si legano alle molecole HLA specifiche della serie bianca. I TCR non attivano loro stessi il segnale ma ne modulano la forza di attivazione in base all'affinità che hanno per la molecola riconosciuta sulla superficie. Lo stesso segnale è modulato anche da altre molecole costimolatorie come CD28 e 4-1BB o inibenti come CTLA-4 e PD-1 (103).

I ligandi delle molecole costimolatorie così come il complesso HLA sono normalmente espressi dalla cellule della linea linfocitaria B, ma vengono invece soppressi dalle cellule tumorali leucemiche per evadere alla risposta immunitaria.

Il principio dei CAR si basa appunto sull'idea di creare un recettore ibrido (Figura 21) che posto sulla superficie delle cellule T le renda in grado di riconoscere le cellule target e di attivarsi senza la necessità della presenza di segnali costimolatori e nemmeno del complesso HLA.(104)

I linfociti tumorali infatti sono in grado di down regolare l'espressione di HLA o di confinarla all'interno dei proteasomi citoplasmatici così da non poter essere neutralizzati dai linfociti T.

I CARs invece possono riconoscere molecole diverse sulla superficie cellulare in base al tipo di Fv anticorpale utilizzata per costruirli e autogenerare il segnale di attivazione linfocitaria. Proprio per la sua alta espressione su quasi il 100% delle cellule leucemiche della linea B, indipendentemente dallo stato maturativo del clone neoplastico, l'antigene CD19 q anche in questo campo il candidato ideale.

Trials con CARs di seconda generazione CD19-CD28z sono stati avviati da due anni e i risultati finora riportati sono riportati in Tabella 20.

Publication/Meeting Date	Number/Age of Subjects	Complete Remission Rate
Brentjens, <i>Sci Transl Med</i> <sup>27</sup> March 21, 2013	5 (adults)	100%
Grupp, <i>N Engl J Med</i> <sup>28</sup> April 18, 2013	2 (children)	100%
Davila, <i>Sci Transl Med</i> <sup>29</sup> February 19, 2014	16 adults	88%
Lee, <i>Lancet</i> <sup>20</sup> October 13, 2014	21 (children)	67%
Maude, <i>N Engl J Med</i> <sup>21</sup> October 16, 2014	30 (25 children, 5 adults)	90%
Park, ASCO-2015 May 30, 2015	33 adults	91%

Tabella 15

Le risposte ottenute sono promettenti indipendentemente dall'uso pediatrico o in adulti e il tasso di CR atteso si aggira attorno al 90%, senza grande differenza tra le diverse classi di rischio di partenza dei pazienti, sia in prima linea che in pazienti ricaduti (105).

Il procedimento si basa sulla raccolta delle cellule T del paziente tramite aferesi, nel cui DNA sono poi inserite le sequenze geniche trasducenti per i CARs con utilizzo di lentivirus, i quali vengono poi reinfusi e.v. con chemioterapico di consolidamento in singola dose.

Gli eventi avversi registrati con tale tipo di terapia sono stati totale aplasia di cellule B non tumorali e importanti manifestazioni di Cytokine Release Syndrome.

Nel primo caso la complicanza è risolta facilmente con utilizzo di Ig e.v. fino all'arresto della terapia con CARs, poiché l'aplasia risulta reversibile e la ripopolazione midollare è ottenuta tramite normale tecnica di trapianto da donatore.

Per la CRS invece si è visto che l'utilizzo di anticorpo anti IL-6 Tocilizumab associato o meno a corticosteroidi riesce a contenere il verificarsi di episodi gravi quali insufficienza respiratoria o sindromi nervose.

Per concludere, poiché sono stati riscontrati alcuni casi di relapse a cellule CD19 negative, si stanno studiando anche CARs specifici per la molecola CD22, per il quale sono ora in atto studi clinici di fase I in pazienti pediatrici (106).

## 10. Bibliografia

1. Tura Sante; Baccarani Michele. Malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici. Quinta. 2011.
2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019-32.
3. Larson RA. Acute lymphoblastic leukemia: older patients and newer drugs. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;131-6.
4. Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Jun;50(3):223-61.
5. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):34-43.
6. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Dec;17(12):3835-49.
7. Lippincott Williams & Wilkins. Flow cytometry, immunohistochemistry, and molecular genetics for hematologic neoplasms. 2012.
8. Pui CH, Rubnitz JE, Hancock ML, Downing JR, Raimondi SC, Rivera GK, et al. Re-appraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1998 Dec;16(12):3768-73.
9. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 1998 Jun 1;91(11):3995-4019.
10. Gleißner B, Gökbuget N, Bartram CR, Janssen B, Rieder H, Janssen JWG, et al. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1536-43.
11. Secker-Walker LM, Craig JM. Prognostic implications of breakpoint and lineage heterogeneity in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: a review. *Leukemia*. 1993 Feb;7(2):147-51.
12. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008 May 1;453(7191):110-4.

13. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009 Jan 29;360(5):470-80.
14. Pui C-H, Evans WE. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Jan 12;354(2):166-78.
15. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GAN, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3189-97.
16. Hilden JM, Dinndorf PA, Meerbaum SO, Sather H, Villaluna D, Heerema NA, et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2006 Jul 15;108(2):441-51.
17. Hematology AS of. Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings outcome. A Collaborative Study of the Group Francais de Cytogenetique Hematologique [published erratum appears in *Blood* 1996 Oct 1;88(7):2818]. *Blood*. 1996 Apr 15;87(8):3135-42.
18. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010 May;11(5):429-38.
19. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Liu-Mares W, Lange BJ, Bostrom BC, et al. Association of Chromosome Arm 9p Abnormalities With Adverse Risk in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children's Cancer Group. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1537-44.
20. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137):758-64.
21. Moorman AV, Schwab C, Ensor HM, Russell LJ, Morrison H, Jones L, et al. IGH@ Translocations, CRLF2 Deregulation, and Microdeletions in Adolescents and Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Sep 1;30(25):3100-8.
22. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2012 Aug 14;22(2):153-66.
23. Stock W, Tsai T, Golden C, Rankin C, Sher D, Slovak ML, et al. Cell cycle regulatory gene abnormalities are important determinants of leukemogenesis and disease biology in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000 Apr 1;95(7):2364-71.
24. Mertens F, Johansson B, Mitelman F. Dichotomy of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia on the basis of the distribution of gained chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet*. 1996 Nov;92(1):8-10.

25. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2004 Jun;125(5):552-9.
26. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. THE GENOMIC LANDSCAPE OF HYPODIPLOID ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. *Nat Genet.* 2013 Mar;45(3):242-52.
27. Gökbüget N, Hoelzer D. Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol.* 2009 Jan;46(1):64-75.
28. Gleissner B, Goekbuget N, Rieder H, Arnold R, Schwartz S, Diedrich H, et al. CD10-pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). *Blood.* 2005 Dec 15;106(13):4054-6.
29. Fielding AK. Current Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *ASH Educ Program Book.* 2011 Dec 10;2011(1):231-7.
30. Moorman AV, Chilton L, Wilkinson J, Ensor HM, Bown N, Proctor SJ. A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010 Jan 14;115(2):206-14.
31. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, Chopra R, Wiernik PH, Richards SM, et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood.* 2005 Dec 1;106(12):3760-7.
32. Bassan R, Hoelzer D. Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 10;29(5):532-43.
33. Legha SS. Vincristine neurotoxicity. Pathophysiology and management. *Med Toxicol.* 1986 Dec;1(6):421-7.
34. Nowak-Göttl U, Ahlke E, Fleischhack G, Schwabe D, Schobess R, Schumann C, et al. Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BFM protocols): prednisone versus dexamethasone administration. *Blood.* 2003 Apr 1;101(7):2529-33.
35. Vrooman LM, Stevenson KE, Supko JG, O'Brien J, Dahlberg SE, Asselin BL, et al. Postinduction Dexamethasone and Individualized Dosing of Escherichia Coli L-Asparaginase Each Improve Outcome of Children and Adolescents With Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From a Randomized Study—Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 00-01. *J Clin Oncol.* 2013 Mar 20;31(9):1202-10.
36. Larson RA, Dodge RK, Bloomfield CD, Schiffer CA. Treatment of Biologically Determined Subsets of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Cancer and Leukemia Group B Studies. In: Büchner PDT, Schellong PDG, Ritter PDJ, Creutzig PDDU, Hid-

demann PDW, Wörmann PDDB, editors. Acute Leukemias VI [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 1997 [cited 2015 Jun 16]. p. 677-87. Available from: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-60377-8\\_103](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-60377-8_103)

37. Wetzler M, Sanford BL, Kurtzberg J, DeOliveira D, Frankel SR, Powell BL, et al. Effective asparagine depletion with pegylated asparaginase results in improved outcomes in adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9511. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4164-7.
38. Earl M. Incidence and management of asparaginase-associated adverse events in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol HO*. 2009 Sep;7(9):600-6.
39. Douer D, Yampolsky H, Cohen LJ, Watkins K, Levine AM, Periclou AP, et al. Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007 Apr 1;109(7):2744-50.
40. Hoelzer D, Gökbuget N. Chemoimmunotherapy in acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev*. 2012 Jan;26(1):25-32.
41. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1116-23.
42. Thiebaut A, Vernant JP, Degos L, Huguet FR, Reiffers J, Sebban C, et al. ADULT ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA STUDY TESTING CHEMOTHERAPY AND AUTOLOGOUS AND ALLOGENEIC TRANSPLANTATION. *Hematol Clin*. 2000 Dec 1;14(6):1353-66.
43. Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, Tallman MS, Buck G, Fielding AK, et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):1827-33.
44. Duration and intensity of maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukaemia: overview of 42 trials involving 12 000 randomised children. *The Lancet*. 1996 Jun 29;347(9018):1783-8.
45. Ottmann OG, Wassmann B, Pfeifer H, Giagounidis A, Stelljes M, Dührsen U, et al. Imatinib compared with chemotherapy as front-line treatment of elderly patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL). *Cancer*. 2007 May 15;109(10):2068-76.
46. Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, Yagasaki F, et al. High complete remission rate and promising outcome by combination of imatinib and chemotherapy for newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Jan 20;24(3):460-6.

47. Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Faderl S, Jones D, Garris R, et al. First report of phase 2 study of dasatinib with hyper-CVAD for the frontline treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2070-7.
48. Pfeifer H, Goekbuget N, Völp C, et al. Long-term outcome of 335 adult patients receiving different schedules of imatinib and chemotherapy as front-line treatment for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL) [abstract]. *Blood ASH Annu Meet Abstr*. 2010;116.
49. Kebriaei P, Saliba R, Rondon G, Chiattonne A, Luthra R, Anderlini P, et al. Long-Term Follow-up of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Impact of Tyrosine Kinase Inhibitors on Treatment Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Apr;18(4):584-92.
50. Fielding AK, Rowe JM, Buck G, Foroni L, Gerrard G, Litzow MR, et al. UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014 Feb 6;123(6):843-50.
51. Brincker H, Christensen BE. Long-term survival and late relapses in acute leukaemia in adults. *Br J Haematol*. 1990 Feb 1;74(2):156-60.
52. Thomas DA, Kantarjian H, Smith TL, Koller C, Cortes J, O'Brien S, et al. Primary refractory and relapsed adult acute lymphoblastic leukemia: characteristics, treatment results, and prognosis with salvage therapy. *Cancer*. 1999 Oct 1;86(7):1216-30.
53. Dworzak MN, Schumich A, Printz D, Pötschger U, Husak Z, Attarbaschi A, et al. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):3982-8.
54. Weiss MA, Aliff TB, Tallman MS, Frankel SR, Kalaycio ME, Maslak PG, et al. A single, high dose of idarubicin combined with cytarabine as induction therapy for adult patients with recurrent or refractory acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2002 Aug 1;95(3):581-7.
55. O'Brien S, Schiller G, Lister J, Damon L, Goldberg S, Aulitzky W, et al. High-dose vincristine sulfate liposome injection for advanced, relapsed, and refractory adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Feb 20;31(6):676-83.
56. Ottmann O, Dombret H, Martinelli G, Simonsson B, Guilhot F, Larson RA, et al. Dasatinib induces rapid hematologic and cytogenetic responses in adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia with resistance or intolerance to imatinib: interim results of a phase 2 study. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2309-15.

57. Benjamini O, Dumlao TL, Kantarjian H, O'Brien S, Garcia-Manero G, Faderl S, et al. Phase II trial of HyperCVAD and Dasatinib in patients with relapsed Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia or blast phase chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2014 Mar 1;89(3):282-7.
58. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, et al. Ponatinib in Refractory Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *N Engl J Med*. 2012 Nov 29;367(22):2075-88.
59. Rowe JM, Goldstone AH. How I treat acute lymphocytic leukemia in adults. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2268-75.
60. Bellott R, Auvrignon A, Leblanc T, Pérel Y, Gandemer V, Bertrand Y, et al. Pharmacokinetics of liposomal daunorubicin (DaunoXome) during a phase I-II study in children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001;47(1):15-21.
61. Fox E, Maris JM, Cohn SL, Goodspeed W, Goodwin A, Kromplewski M, et al. Pharmacokinetics of orally administered ABT-751 in children with neuroblastoma and other solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Sep;66(4):737-43.
62. Abdel-Karim I, Plunkett WK, O'Brien S, Giles F, Thomas D, Faderl S, et al. A phase I study of pemetrexed in patients with relapsed or refractory acute leukemia. *Invest New Drugs*. 2011 Apr;29(2):323-31.
63. Messinger Y, Gaynon P, Raetz E, Hutchinson R, DuBois S, Glade-Bender J, et al. Phase I study of bortezomib combined with chemotherapy in children with relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): A report from the therapeutic advances in childhood leukemia (TACL) consortium. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Ago;55(2):254-9.
64. Martin A, Morgan E, Hijiya N. Relapsed or refractory pediatric acute lymphoblastic leukemia: current and emerging treatments. *Paediatr Drugs*. 2012 Dec 1;14(6):377-87.
65. Teachey DT, Obzut DA, Cooperman J, Fang J, Carroll M, Choi JK, et al. The mTOR inhibitor CCI-779 induces apoptosis and inhibits growth in preclinical models of primary adult human ALL. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1149-55.
66. Plimack ER, Kantarjian HM, Issa J-P. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2007 Jan 1;48(8):1472-81.
67. Scuto A, Kirschbaum M, Kowolik C, Kretzner L, Juhasz A, Atadja P, et al. The novel histone deacetylase inhibitor, LBH589, induces expression of DNA damage response genes and apoptosis in Ph- acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*. 2008 May 15;111(10):5093-100.
68. Le Jeune C, Thomas X. Antibody-based therapies in B-cell lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Haematol*. 2015 Feb;94(2):99-108.
69. Mathisen MS, Kantarjian HM, Jabbour EJ. Emerging drugs for acute lymphocytic leukemia. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2013 Dec 20;19(1):37-50.

70. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, et al. Ofatumumab As Single-Agent CD20 Immunotherapy in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1749-55.
71. Portell CA, Advani AS. Novel targeted therapies in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013 Jul 11;55(4):737-48.
72. Mathisen MS, Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, Jabbour E. Acute lymphoblastic leukemia in adults: encouraging developments on the way to higher cure rates. *Leuk Lymphoma*. 2013 Apr 2;54(12):2592-600.
73. Portell CA, Advani AS. Antibody Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012 Mar 16;7(2):153-9.
74. Cruz RI, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Olejniczak S, Deeb G, Knight J, Wallace P, et al. CD52 over-expression affects rituximab-associated complement-mediated cytotoxicity but not antibody-dependent cellular cytotoxicity: Preclinical evidence that targeting CD52 with alemtuzumab may reverse acquired resistance to rituximab in non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2007 Jan 1;48(12):2424-36.
75. Kochuparambil ST, Litzow MR. Novel Antibody Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2014 Mar 13;9(2):165-73.
76. Zein N, Poncin M, Nilakantan R, Ellestad GA. Calicheamicin gamma 1I and DNA: molecular recognition process responsible for site-specificity. *Science*. 1989 May 12;244(4905):697-9.
77. Jain N, O'Brien S, Thomas D, Kantarjian H. Inotuzumab ozogamicin in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Front Biosci Elite Ed*. 2014; 6:40-5.
78. Rathi C, Meibohm B. Clinical pharmacology of bispecific antibody constructs. *J Clin Pharmacol*. 2015 Mar 1;55(S3): S21-8.
79. Löffler A, Kufer P, Lutterbüse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 × CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):2098-103.
80. Pezzutto A, Dörken B, Rabinovitch PS, Ledbetter JA, Moldenhauer G, Clark EA. CD19 monoclonal antibody HD37 inhibits anti-immunoglobulin-induced B cell activation and proliferation. *J Immunol*. 1987 May 1;138(9):2793-9.
81. Haas C, Krinner E, Brischwein K, Hoffmann P, Lutterbüse R, Schlereth B, et al. Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. *Immunobiology*. 2009 Jun;214(6):441-53.
82. Gruen M, Bommert K, Bargou RC. T-cell-mediated lysis of B cells induced by a CD19xCD3 bispecific single-chain antibody is perforin dependent and death receptor independent. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Feb 6;53(7):625-32.

83. Raponi S, Stefania De Propriis M, Intoppa S, Laura Milani M, Vitale A, Elia L, et al. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk Lymphoma*. 2011 Feb 24;52(6):1098-107.
84. Kong Y, Yoshida S, Saito Y, Doi T, Nagatoshi Y, Fukata M, et al. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia*. 2008 Jun;22(6):1207-13.
85. Wilson K, Case M, Minto L, Bailey S, Bown N, Jesson J, et al. Flow minimal residual disease monitoring of candidate leukemic stem cells defined by the immunophenotype, CD34+CD38<sup>low</sup>CD19+ in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematologica*. 2010 Apr;95(4):679-83.
86. Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, Hoffmann P, Syring U, Hanakam F, et al. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Int J Cancer*. 2002 Agosto;100(6):690-7.
87. Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R. Blinatumomab: A historical perspective. *Pharmacol Ther*. 2012 Dicembre;136(3):334-42.
88. Brandl C, Haas C, d' Argouges S, Fisch T, Kufer P, Brischwein K, et al. The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 Feb 20;56(10):1551-63.
89. Baeuerle PA, Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res*. 2009 Jun 15;69(12):4941-4.
90. Kufer P, Zettl F, Borschert K, Lutterbüse R, Kischel R, Riethmüller G. Minimal costimulatory requirements for T cell priming and TH1 differentiation: activation of naive human T lymphocytes by tumor cells armed with bifunctional antibody constructs. *Cancer Immun*. 2001 Nov 12;1:10.
91. Dreier T, Baeuerle PA, Fichtner I, Grün M, Schlereth B, Lorenczewski G, et al. T Cell Costimulus-Independent and Very Efficacious Inhibition of Tumor Growth in Mice Bearing Subcutaneous or Leukemic Human B Cell Lymphoma Xenografts by a CD19-/CD3- Bispecific Single-Chain Antibody Construct. *J Immunol*. 2003 Apr 15;170(8):4397-402.
92. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, et al. Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody. *Science*. 2008 Aug 15;321(5891):974-7.
93. Topp MS, Kufer P, Gökbuget N, Goebeler M, Klinger M, Neumann S, et al. Targeted Therapy With the T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results in High Response Rate and Prolonged Leukemia-Free Survival. *J Clin Oncol*. 2011 Jun 20;29(18):2493-8.

94. Topp MS, Gökbuget N, Zugmaier G, Degenhard E, Goebeler M-E, Klinger M, et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5185-7.
95. Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou RC, Topp MS, et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood*. 2012 Jun 28;119(26):6226-33.
96. Topp MS, Gökbuget N, Stein AS, Zugmaier G, O'Brien S, Bargou RC, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2015 Jan;16(1):57-66.
97. V. Torri. *Gli strumenti per trovare una risposta: il disegno giusto per ciascun quesito*. Milano.
98. Bader P, Kreyenberg H, Henze GHR, Eckert C, Reising M, Willasch A, et al. Prognostic Value of Minimal Residual Disease Quantification Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol*. 2009 Jan 20;27(3):377-84.
99. Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010 Aug 1;150(4):389-405.
100. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57-e57.
101. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia*. 2010 Mar;24(3):521-35.
102. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4153-62.
103. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):227-42.
104. CD19 CAR Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. [cited 2015 Jun 23]; Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/11500360-156>
105. Brentjens R, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 20;5(177):177ra38.

106. Annesley CE, Brown P. Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. *Ther Adv Hematol.* 2015 Apr;6(2):61-79.