

Anno 3 - Numero 1 - 2016

Ematologia **Oncologica.it**

Farmaci bersaglio (II)

Organo Ufficiale
della **Fondazione Matarelli** - Milano

Con il supporto non condizionato di



Farmaci bersaglio (II)

Leucemia acuta promielocitica

Laura Cicconi, Mariadomenica Divona, Francesco Lo-Coco

7

Leucemia mieloide acuta

Giovanni Martinelli

15

Leucemia acuta linfoide

*Monica Messina, Anna Lucia Fedullo, Valentina Gianfelici,
Sara Grammatico, Anna Guarini, Robin Foà, Sabina Chiaretti*

27

Hairy cell leukemia

Brunangelo Falini, Enrico Tiacci

51

Linfoma di Hodgkin

Andrea Gallamini, Anna Borra

61

Ematologia Oncologica.it

Vol 3 - n.1 - 2016

Direttore Responsabile

Giorgio Maggiani

Direttore Scientifico

Giorgio Lambertenghi Deliliers

Fondazione Matarrelli, Milano

Comitato Editoriale

Sergio Amadori

Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccardo

Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi

Università degli Studi, Firenze

Michele Cavo

Università degli Studi, Bologna

Antonio Cuneo

Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi

Università degli Studi, Genova

Cristina Mecucci

Università degli Studi, Perugia

Fabrizio Pane

Università degli Studi, Napoli

Francesco Passamonti

Università degli Studi, Varese

Gianni Pizzolo

Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia

Università degli Studi, Bari

Ematologia Oncologica.it

è una rivista quadrimestrale monotematica, di aggiornamento in lingua italiana, che ha essenzialmente lo scopo educativo di rendere disponibili le informazioni più aggiornate su argomenti pertinenti le malattie del sangue, in particolare quelle neoplastiche. Per raggiungere questo obiettivo la rivista desidera coinvolgere gli specialisti italiani più qualificati e informare il lettore sui più recenti progressi nel campo della ricerca di base, della clinica e della terapia.

La rivista si attiene alle raccomandazioni indicate dal World Association of Medical Editors (WAME) riguardante l'etica delle pubblicazioni in ambito sanitario.

Registrazione Tribunale di Milano

n. 348 del 19/11/2013

Progetto grafico

Dynamicom srl

Sito Internet

www.ematologiaoncologica.it

Coordinamento editoriale

Dynamicom - Milano

Tel. (+39)0289693750 - Fax (+39)02201176

Editore

Fondazione Matarrelli

Periodicità

Quadrimestrale

Avvertenze ai lettori

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni eventualmente citati negli articoli, ed invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

Norme per gli Autori

- L'accettazione dei testi inviati è comunque subordinata al parere del Comitato Editoriale che deve verificare la loro compatibilità con le norme redazionali.

- Gli Autori dei testi sono gli unici responsabili del loro contenuto, e della riproduzione delle immagini allegate.

- Il primo Autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora utilizzi figure e/o tabelle già pubblicate altrove.

- La proprietà dell'articolo, una volta pubblicato, appartiene alla Fondazione Matarrelli, (Largo Crocetta, 2 - 20122 MI) che ha depositato il nome della rivista presso il Tribunale di Milano in data 19/11/2013

- Il manoscritto deve essere inviato a Dynamicom Edizioni (segreteria@ematologiaoncologica.it) che, dopo averlo controllato ed impaginato, lo invierà al Direttore Scientifico (giorgio.lambertenghi@unimi.it) per la revisione e il controllo della stesura secondo le norme redazionali. Le bozze di stampa verranno quindi rinviare all'Autore per le opportune correzioni, che dovrà provvedere entro cinque giorni lavorativi a rinviarle a: segreteria@ematologiaoncologica.it

Norme redazionali

Il contenuto dell'articolo, redatto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh, non deve superare le 30-35 cartelle dattiloscritte (2000 battute cad.) compresa la bibliografia, e corredato delle illustrazioni (tabelle, grafici, figure) nel numero che l'Autore ritiene necessario, in file ad alta risoluzione (salvate in formato pdf, jpg o eps).

Lo stile del manoscritto, le citazioni bibliografiche e il loro riferimento nel testo del manoscritto devono seguire le raccomandazioni dell'International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Per le relative informazioni, gli Autori sono pregati di consultare il sito <http://www.icmje.org>.

L'articolo deve essere così strutturato:

- **Titolo conciso** e pertinente con il tema della rivista;

- **Prima pagina** con nome e cognome degli Autori, istituzione di appartenenza, foto tessera a colori del primo Autore;

- **Introduzione iniziale** che esponga in maniera chiara lo scopo dell'articolo;

- **Corpo del testo** suddiviso in sottocapitoli a contenuto omogeneo;

Pagina finale:

1) nome e cognome del primo autore, con telefono, fax, e-mail al quale andrà indirizzata la corrispondenza;

2) eventuali **ringraziamenti** a persone e/o associazioni;

3) 3-5 parole chiave.

Bibliografia

Per lo stile nella stesura seguire le seguenti indicazioni o consultare il sito "International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals Sample References". Le **voci bibliografiche** non devono superare il numero massimo di 150, numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo, citate tra parentesi con il testo in apice e con i numeri arabi, tenendo presente gli esempi sottostanti.

Articoli con 1-6 autori

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Articoli con più di 6 autori

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E, De Giglio I, Baldoni A, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Abstract e Congressi

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts. 2000;100(10):1000.

Capitoli di libri

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. The Hemoglobin, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 1980:10-15.

Editoriale

Giorgio Lambertenghi Delilieri

Fondazione Matarrelli - Milano



Il primo numero dell'annata 2016 di *Ematologia Oncologica.it* viene pubblicato, a seguito del vol.3-2015, per illustrare altre emopatie sistemiche dove l'identificazione di lesioni genetiche ha portato allo sviluppo di farmaci volti a interferire direttamente con i meccanismi di segnalazione aberranti, responsabili della crescita neoplastica. L'esperienza clinica è solo all'inizio, ma i risultati preliminari indicano che in queste malattie la terapia mirata potrebbe rappresentare nel prossimo futuro una valida alternativa ai trattamenti convenzionali. L'esempio paradigmatico viene dalla storia della leucemia promielocitica acuta, già negli anni '80 considerata una leucemia con caratteristiche di chemiosensibilità diverse rispetto ad altri sottotipi. Le novità rivoluzionarie arrivano negli anni '90 con l'introduzione dell'acido all-trans retinoico capace di far differenziare le cellule, e più recentemente del triossido d'arsenico che, inducendo apoptosi e inibendo l'angiogenesi, contribuisce al differenziamento. Oggi questi due "farmaci bersaglio", associati alle antracicline o all'anticorpo anti-CD33 nelle forme ad alto rischio, rappresentano un caposaldo riconosciuto della terapia della promielocitica. Viceversa, le esperienze di terapie mirate nelle altre forme di leucemia mieloide acuta sono solo all'inizio, rese complicate per la grande eterogeneità delle lesioni genetiche, peraltro utili sul piano della classificazione e della prognosi. In fase di sperimentazione clinica sono gli inibitori di FLT3, marker prognostico negativo, numerosi anticorpi radio o non-coniugati contro marcatori di superficie cellulare, ed infine nuovi farmaci demetilanti come target epigenetici.

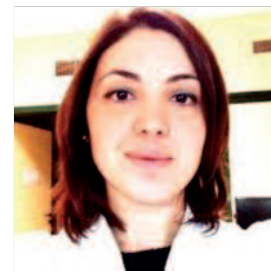
Nella leucemia linfatica acuta la biologia ha ampliato notevolmente il panorama delle lesioni bersaglio e quindi le prospettive terapeutiche soprattutto dei pazienti adulti che hanno una sopravvivenza libera da malattia ancora insoddisfacente. Nella leucemia linfatica B hanno dimostrato un'efficacia clinica: gli inibitori di tirosin chinasi che, scelti sulla base dello

studio dello stato mutazionale, hanno nettamente migliorato la gestione e la prognosi della leucemia Ph+; i farmaci che inibiscono le vie del segnale di RAS, le cui mutazioni sono frequenti nella malattia ad alto rischio o in fase di recidiva; gli inibitori della cascata JAK/STAT come il ruxolitinib, largamente testato nelle malattie mieloproliferative; gli inibitori di geni coinvolti nella regolazione epigenetica, ancora in fase di sperimentazione soprattutto nei pazienti pediatrici. Per contro la leucemia linfatica T è da considerarsi ancora una malattia ad alto rischio di recidiva, dove i potenziali farmaci bersaglio non hanno ancora trovato una collocazione clinica.

Nell'ambito delle neoplasie a derivazione B linfoide, l'hairy cell leukemia rappresenta l'unica condizione patologica che riconosce, come evento genetico causale, la mutazione puntiforme di una chinasi, la proteina BRAF. Questa peculiarità, che richiama l'etiopatogenesi monogenica delle leucemie promielocitica e mieloide cronica, ha indotto ad utilizzare farmaci bersaglio anti-BRAF, originariamente messi a punto per il melanoma metastatico. Le risposte in pazienti refrattari a molteplici linee di terapia o in fase di recidiva sono state ottimali, anche per l'assenza di tossicità midollare. Strategie future prevedono la loro associazione con inibitori della via del segnale RAS per l'eradicazione completa delle cellule leucemiche capellute.

Infine, viene offerta al lettore una completa e aggiornata revisione del linfoma di Hodgkin, dove la costante evoluzione tecnologica dei metodi diagnostici ha permesso la definizione di categorie di pazienti a prognosi differente e quindi una strategia terapeutica adattata al rischio. Alcuni problemi ancora esistono per gli effetti tardivi della radio-chemioterapia e per la mortalità correlata al trattamento nei pazienti anziani. Nuove opzioni terapeutiche sono quindi auspicabili, soprattutto mirate al bersaglio CD30, intensamente espresso sulle cellule di Hodgkin e di Reed-Sternberg. I risultati preliminari su pazienti refrattari o in recidiva sono molto promettenti.

Leucemia acuta promielocitica



Laura Cicconi, Mariadomenica Divona, Francesco Lo-Coco

Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Università Tor Vergata, Roma

Introduzione

La leucemia acuta promielocitica (LAP) è un raro sottotipo di leucemia acuta: si stima infatti che non più di 150 casi vengano diagnosticati ogni anno in Italia. La malattia può colpire soggetti di qualsiasi età: bambini, adolescenti, adulti e anziani, con una età mediana dei pazienti intorno ai 40 anni, e con una simile prevalenza nei due sessi. La LAP è stata storicamente classificata come una varietà di leucemia mieloide acuta (LMA), di cui rappresenta circa il 10% dei casi; tuttavia rispetto alle altre varietà di LMA essa presenta caratteristiche biologiche e cliniche peculiari e, soprattutto, necessita di un approccio terapeutico mirato e assai diverso da quello utilizzato nelle altre forme ⁽¹⁻³⁾.

La LAP si caratterizza a livello morfologico per la infiltrazione del midollo osseo da parte di elementi mieloidi displastici che mostrano un arresto maturativo a livello del promielocito. La malattia si associa frequentemente a una grave coagulopatia da consumo con piastrinopenia, ipofibrinogenemia ed aumento dei prodotti di degradazione del fibrinogeno. Ha un decorso estremamente aggressivo, a volte addirittura fulminante per via di frequenti gravi emorragie che si manifestano all'esordio della malattia. Senza una rapida e accurata diagnosi e senza le terapie adeguate, questa leucemia ancora oggi può avere esito fatale in poche ore o giorni, soprattutto se non riconosciuta in tempo ⁽⁴⁻⁵⁾. Per questo è essenziale che sia ben diffusa, soprattutto presso i centri di pronto soccorso, l'informazione educativa per la diagnosi differenziale, affinché non ci siano ritardi nella sua identificazione. Il paziente che presenta sintomi e segni sospetti della malattia (piastrinopenia e/o pancitopenia, alterazioni della coagulazione, ecchimosi, petecchie o altre manifestazioni emorragiche) va rapidamente indirizzato ai centri specialistici di ematologia per le cure specifiche, ciò che consente oggi nella maggior parte dei casi di ribaltare completamente la prognosi della malattia, da rapidamente mortale a guaribile definitivamente.

In seguito ad una serie di scoperte in campo biologico e clinico registrate negli ultimi 25 anni, oggi è possibile guarire la stragrande maggioranza (oltre il 90%) dei pazienti con leucemia promielocitica,

purché la malattia sia prontamente e correttamente diagnosticata ed il paziente indirizzato presso un centro di riferimento. Inoltre, da una condizione prognostica estremamente sfavorevole che si registrava in tutto il mondo fino ai primi anni '90, con circa il 70%-80% dei malati che morivano entro un 1-2 anni, oggi siamo passati alla cura di questa malattia, nella maggior parte dei casi, addirittura senza fare ricorso alla chemioterapia ed utilizzando soltanto farmaci mirati⁽⁶⁾. I successi ottenuti nella LAP vengono oggi considerati, insieme a quelli registrati nella cura della leucemia mieloide cronica, come un esempio paradigmatico della terapia con farmaci bersaglio. Possiamo anche dire con orgoglio, che la ricerca biologica e clinica italiana ed in particolare il gruppo GIMEMA (Gruppo Italiano per lo studio delle Malattie Ematologiche dell'Adulto), hanno dato un contributo fondamentale ai progressi ottenuti. Questi successi sono essenzialmente dovuti all'uso di acido all-trans retinoico (ATRA) e successivamente del triossido di arsenico (ATO) in varie combinazioni (con e senza chemioterapici) nonché alla possibilità di diagnosticare e monitorare con estrema precisione la malattia grazie alla identificazione di una specifica alterazione genetica.

Cenni storici sulle terapie mirate

Già nei primi anni '80 la LAP veniva riconosciuta dal gruppo GIMEMA come una leucemia acuta con caratteristiche di chemiosensibilità diverse rispetto alle altre LMA. In particolare, in seguito alla descrizione da parte di J. Bernard dell'alta percentuale di risposta alle antracicline⁽⁷⁾, il GIMEMA aveva sviluppato protocolli specifici per la malattia utilizzando daunorubicina ed in seguito idarubicina in monochimioterapia.

Nonostante un buon numero di risposte in termini di remissione completa (circa 70%), la maggior parte dei pazienti trattati con questi protocolli andava incontro a mortalità precoce o a recidiva⁽⁸⁻⁹⁾. Pur tuttavia, era interessante osservare che circa il 30-40% dei pazienti trattati con daunorubicina o idarubicina diventavano lungo sopravviventi. Possiamo dunque affermare che la monochimioterapia a base di antracicline rappresentava in qualche modo un trattamento

mirato nelle LAP. Ancora oggi di fatto, specialmente nelle forme ad altro rischio (iperleucocitarie), le antracicline sono i farmaci di prima scelta da associare a ATRA e/o ATO ed esse rimangono dunque un caposaldo della terapia della LAP.

Nel 1988 i ricercatori di Shanghai in Cina pubblicavano i risultati su una serie di pazienti trattati con un semplice derivato della vitamina A, l'ATRA⁽¹⁰⁾. Questa pubblicazione veniva accolta con stupore e meraviglia poiché, per la prima volta in tutta la storia della terapia anti-tumorale, si otteneva la remissione completa facendo differenziare le cellule maligne (cioè convertendole in cellule terminali mature) ed evitando la chemioterapia. Questi risultati potevano a buon diritto essere definiti rivoluzionari, in quanto a seguito della loro riproducibilità in tutto il mondo, veniva abbattuto un dogma e cioè quello che il cancro fosse sempre e comunque una condizione irreversibile.

Benché l'ATRA fosse efficace nell'ottenimento della remissione completa in un'alta percentuale dei pazienti, ben presto si capì che, ai fini della risposta a lungo termine e dunque ai fini della guarigione definitiva era necessario combinare a questa vitamina una chemioterapia, sia pure a dosi ridotte rispetto a quelle utilizzate nelle altre LMA. Con i protocolli di combinazione a base di ATRA e chemioterapia ideati dal GIMEMA e da diversi altri gruppi cooperativi nel mondo (PETHEMA, MRC, gruppo Franco-Belga-Svizzero ed altri), si ottenevano già verso la metà degli anni '90 risultati straordinari, con 70%-80% di pazienti lungo sopravvivenuti e potenzialmente guariti⁽¹¹⁻¹⁹⁾. Contemporaneamente alla scoperta dell'attività dell'acido retinoico, da un punto di vista biologico veniva riconosciuta nel 1990 una alterazione genetica acquisita che è assolutamente specifica e patognomonica della malattia e cioè il gene di fusione PML/RARα. Questa fondamentale scoperta, a cui contribuiva in Italia il gruppo di lavoro coordinato da P.G. Pelicci, consentiva tra l'altro di ottenere una diagnosi più rapida e precisa della malattia attraverso test genetico-molecolari tipo RT-PCR⁽³⁾.

Come si è detto, i risultati ottenuti negli anni '90 con chemioterapia e acido retinoico avevano cambiato in modo straordinario la prognosi della malattia. Tuttavia, i noti effetti collaterali della chemioterapia (immunosoppressione, infezioni, perdita di capelli, nausea e vomito etc.) benché il più delle volte transitori, influivano assai negativamente sulla qualità di vita dei pazienti, associandosi peraltro ad un rischio di mortalità non trascurabile.

Al fine di diminuire la tossicità, i vari gruppi cooperativi incluso il GIMEMA svilupparono negli anni 2000 protocolli adattati al rischio, nei quali l'intensità della chemioterapia veniva modulata in base al rischio iniziale di recidiva⁽¹⁶⁾.

Verso la fine degli anni '90 venivano resi noti i risultati ottenuti, ancora una volta in Cina, utilizzando per la terapia della LAP il triossido di arsenico (ATO)⁽²⁰⁻²¹⁾. Una sostanza popolarmente nota come un potente veleno, e utilizzata da secoli con scarso successo per la

cura di diverse malattie infettive e tumorali, si rivelava essere l'arma più efficace nella cura della LAP. Molti gruppi nel mondo cominciarono a sperimentare questa sostanza e tra questi E. Estey all'MD Anderson negli USA, proponeva uno schema di combinazione con ATRA e ATO, con risultati particolarmente favorevoli nei pazienti con LAP a basso rischio (e cioè con numero di globuli bianchi non elevato alla diagnosi)⁽²²⁾.

Nel 2006, il GIMEMA disegnava uno studio randomizzato per paragonare la combinazione ATRA-ATO (dunque priva di chemioterapici) proposta da Estey, con il tradizionale schema di acido retinoico e chemioterapia. I risultati di questo studio, pubblicati nel 2013 sul New England Journal of Medicine, unitamente a quelli di uno studio indipendente (anche esso multicentrico randomizzato) condotto in Gran Bretagna, dimostravano in modo assai chiaro e inconfutabile la possibilità di curare la LAP senza ricorrere alla chemioterapia, almeno nelle forme a basso rischio (che peraltro costituiscono circa il 75% dei casi)⁽²³⁻²⁴⁾.

Acido all-transretinoico e chemioterapia

Il gruppo GIMEMA ha riportato nel 1997 alti tassi di remissione molecolare nella LAP di nuova diagnosi utilizzando in simultanea ATRA e idarubicina (schema AIDA) seguiti da consolidamento con polichemioterapia e mantenimento con basse dosi di chemioterapia associate ad ATRA⁽²⁵⁾. Lo schema AIDA, con leggere modifiche, fu adottato dal gruppo spagnolo PETHEMA che lo perfezionò riducendo il carico terapeutico omettendo l'ARA-C e altri farmaci non intercalanti, ottenendo simili risultati⁽²⁶⁾. A seguito di una meta-analisi condotta insieme dai gruppi PETHEMA e GIMEMA sui risultati degli studi citati, si poté definire nel 2000 uno *score* prognostico per determinare il rischio di recidiva nella malattia all'esordio⁽²⁷⁾. L'utilizzo di questo, che classifica come pazienti ad alto rischio quelli con leucociti alla diagnosi >10.000/μl, consente a sua volta di stratificare i pazienti e diversificare la terapia includendo l'ARA-C nel consolidamento per i casi ad alto rischio (circa un 25-30%) e soprattutto, risparmiare tossicità non necessaria nei pazienti a basso rischio. I risultati della terapia della LAP adattata al rischio, riprodotti da GIMEMA⁽¹⁶⁾, PETHEMA⁽²⁸⁾ e diversi altri gruppi nel mondo, consentirono di ottenere percentuali di lungo sopravvivenza libera da malattia superiori al 90%⁽²⁹⁾.

Oltre che nel paziente giovane adulto, lo schema AIDA si è dimostrato assai efficace anche nel paziente anziano. In questa categoria di pazienti la LAP conserva caratteristiche assolutamente uniche e diverse rispetto alla LMA dell'anziano⁽³⁰⁾. Va aggiunto che nell'anziano con LAP è meno frequente la presentazione di malattia ad alto rischio, ragion per cui, fatta eccezione dei seri problemi legati alla minore tolleranza della chemioterapia intensiva, la malattia è in teoria più facilmente eradicabile e guaribile nell'anziano rispetto al giovane adulto. Nonostante i notevoli progressi registrati con l'avvento

dei protocolli di combinazione ATRA + chemioterapia, circa un 15% dei pazienti trattati con questi schemi va incontro a recidiva. Inoltre, si è visto come questi schemi sono associati a significativa tossicità (principalmente dovuta alla mielosoppressione e conseguenti gravi infezioni), nonché al rischio di cardiopatie e soprattutto sviluppo in circa il 2% dei casi di leucemie secondarie ⁽³¹⁾.

Triossido di Arsenico

Composti derivati dall'arsenico sono stati utilizzati sin dall'antichità nella medicina tradizionale cinese per il trattamento dei disordini neoplastici e infiammatori. ⁽²⁾ In seguito agli eccellenti risultati nei pazienti recidivati, il triossido di arsenico è stato approvato in Europa e negli Stati Uniti per il trattamento della LAP in recidiva o refrattaria. Il meccanismo d'azione dell'arsenico nella LAP è complesso e ancora non compreso nei dettagli. Ad alte concentrazioni (0,5 - 2,0 µmol/l) il triossido di arsenico induce apoptosi in vitro, attraverso la via delle caspasi 2 e 3, mentre a concentrazioni inferiori (0,1 - 0,5 µmol/l) induce parziale differenziamento dei promielocitici leucemici attraverso la degradazione della oncoproteina PML/RARα; inoltre, studi di laboratorio hanno dimostrato che il triossido di arsenico inibisce l'angiogenesi tramite la *down*-regolazione del *vascular endothelial growth factor* (VEGF). ⁽³²⁾ Riguardo al suo profilo di tossicità, il triossido di arsenico è generalmente ben tollerato ed il suo utilizzo è associato a un serie di eventi avversi reversibili che includono la iperleucocitosi, la sindrome da differenziamento, il prolungamento del QT, neuropatia periferica, rialzo degli enzimi epatici, modesta mielosoppressione, iperglicemia ed ipokaliemia.

Fra questi, il prolungamento del QT e la sindrome da differenziamento sono gli effetti avversi più seri e potenzialmente fatali per lo sviluppo di complicanze come aritmie ventricolari e insufficienza respiratoria acuta. Alla luce della frequenza e della pericolosità di queste complicanze, i moderni studi clinici prevedono comunque misure terapeutiche e accorgimenti atti a prevenire e contrastare tali effetti collaterali ^(23,24).

Secondo i primi studi clinici condotti in Cina, il triossido d'arsenico è in grado di indurre remissione completa ematologica in più dell'85% dei pazienti recidivati dopo la terapia di prima linea con ATRA. ⁽³³⁻³⁴⁾ Questi risultati sono stati poi riprodotti negli Stati Uniti, dapprima in uno studio pilota e successivamente in un esteso studio multicentrico per pazienti recidivati dopo ATRA ⁽³⁵⁻³⁶⁾. A differenza dell'ATRA, il triossido di arsenico era in grado di indurre una remissione molecolare duratura dopo due cicli di terapia nella maggioranza dei pazienti trattati in recidiva ⁽³⁶⁾.

La conferma dell'efficacia dell'arsenico nella LAP in recidiva è stata fornita da diversi studi clinici successivi condotti in tutto il mondo che hanno riportato tassi di remissioni complete >70% e sopravvivenza a 1-3 anni nel range del 50-70% ⁽³⁷⁾. A seguito di questi dati e del profilo di tossicità favorevole, diversi studi hanno esplorato l'ef-

fetto dell'ATO utilizzato come terapia di prima linea. ATO come singolo agente è stato utilizzato, infatti come terapia di induzione e consolidamento in pazienti con APL di nuova diagnosi in due studi condotti in Iran ⁽³⁸⁾ ed in India ⁽³⁹⁾, con tassi di sopravvivenza globale tra il 65% ed il 75% a 3 anni e sopravvivenza libera da malattia > 85% in entrambi gli studi con dati particolarmente favorevoli nei pazienti non iperleucocitari (basso rischio) ^(38,39). Successivi trials hanno esplorato l'efficacia ed il profilo di tossicità in combinazione con altri agenti, incluso l'ATRA. Uno studio clinico randomizzato cinese ha dimostrato per la prima volta un forte sinergismo tra ATO ed ATRA, unitamente a un'augmentata efficacia antileucemica comparata al solo ATO o al solo ATRA utilizzati come singoli farmaci ⁽⁴⁰⁾. In questo studio, tuttavia, l'induzione con ATRA ed ATO era seguita da consolidamento con chemioterapia convenzionale. Più recentemente, diversi studi condotti in vari paesi anche a livello internazionale hanno dimostrato l'efficacia di ATO combinato con ATRA e chemioterapia. In particolare, il trial australiano-asiatico APML4 che associava il regime classico AIDA con ATO in induzione, seguito da 2 cicli di consolidamento con ATRA e ATO, ha riportato tassi di sopravvivenza globale del 93% e sopravvivenza libera da recidiva pari al 98% ⁽⁴¹⁾. Questi risultati sono stati confermati a medio-lungo termine in un recente aggiornamento dello studio ⁽⁴²⁾.

Un interessante studio pilota condotto a Houston negli Stati Uniti, ha sperimentato per la prima volta la combinazione di ATRA e ATO per pazienti di nuova diagnosi senza l'aggiunta della chemioterapia. Gli investigatori dell'MD Anderson Cancer Center (MDACC) hanno riportato inizialmente in 44 pazienti (sia basso che alto rischio) tassi di risposta completa pari all'89% con solo tre recidive tra i pazienti ad alto rischio; un recente aggiornamento di questo studio su una serie estesa ha confermato alti tassi di risposta ematologica completa (92%) con sopravvivenza globale (OS) a 2 anni pari all'86%, con migliore tasso di risposta nei bassi rischi ⁽⁴³⁾.

Sebbene mancasse ancora la conferma con studi clinici randomizzati che prevedessero un confronto diretto tra ATRA+chemioterapia e approcci terapeutici con ATO, questo studio indicava la elevata efficacia della combinazione ATO-ATRA in assenza di chemioterapici convenzionali nel trattamento della LAP. Particolarmente favorevoli erano, come si è detto, i risultati ottenuti con questo schema nei pazienti a rischio basso-intermedio ⁽⁴³⁾.

Terapia mirata con ATRA e ATO

La possibilità di curare la LAP senza chemioterapia è stata valutata per la prima volta in un trial randomizzato, nello studio disegnato dal gruppo cooperativo italiano GIMEMA. La sperimentazione, condotta in associazione ai gruppi cooperativi tedeschi AMLSG e SAL, ha comparato l'approccio ATRA-ATO con la terapia standard AIDA (studio APL 0406) nei pazienti con LAP a rischio basso-intermedio. I risultati, pubblicati nel 2013, hanno mostrato che la

STUDI	N. PAZIENTI	SCHEMA DI TERAPIA	REMISSIONE COMPLETA	RECIDIVA	SOPRAVVIVENZA GLOBALE	SOPRAVVIVENZA LIBERA DA MALATTIA
Shen et al ⁽⁴⁰⁾	61	ATO ATRA+ATO ATRA	95% 90% 95%	11% - 26%	n.r.	88% 100% 70%
Hu et al ⁽³³⁾	85	ATRA+ATO	94,1%	4%	91,7%	n.r.
Ravandi et al ⁽⁴³⁾	82	ATO+ATRA(+GO)	92%	4%	85%	n.r.
Mathews et al ⁽³⁹⁾	72	ATO	86%	n.r.	74,2%	80%
Ghavamzadeh et al ⁽³⁸⁾	94	ATO	86,3%	25,3%	64,4%	66,7%
Lou et al ⁽⁴¹⁾	137	ATRA+ATO	93,4%	4%	99%	98% (RFS)
Lo Coco et al ⁽³⁰⁾	162	ATRA+ATO vs ATRA+Chemioterapia	100% 95%	1% 6%	99% 91%	97% 90%
Zhu et al ⁽⁴⁷⁾	242	Arsenico orale vs ATO i.v.	99,1% 97,4%	0,8% 0,8%	99,1% 96,6%	98,1% 95,5%
Iland et al ⁽⁴²⁾	124	ATO+ATRA+Chemioterapia	95%	1,7%	94%	95%
Burnett et al ⁽²⁴⁾	235	ATRA+ATO vs ATRA+Chemioterapia	94% 89%	1% 18%	93% 89%	n.r.
Abbreviazioni: GO, Gemtuzumab Ozogamicin; RFS: sopravvivenza libera da recidiva; ATO: Triossido di arsenico; ATRA: Acido all-trans retinoico; i.v.: intravenoso, n.r.: non riportato						

Tabella 1 – Principali studi con triossido di arsenico nella LAP di nuova diagnosi.

combinazione ATRA-ATO ha efficacia almeno comparabile rispetto alla terapia standard nei pazienti con LAP non ad alto rischio di nuova diagnosi ⁽²³⁾. Dei 156 pazienti valutabili in questo studio, 77/77 (100%) nel gruppo ATRA-ATO hanno raggiunto la remissione completa dopo l'induzione contro 75/79 (94%) nel braccio AIDA. Dopo un follow up mediano di 34 mesi, la sopravvivenza libera da eventi, obiettivo primario dello studio, era del 97% nel gruppo ATRA-ATO contro un 86% nel gruppo AIDA ($p = 0,02$) mentre sopravvivenza globale era del 99% contro il 91%, $p = 0,02$). Nello studio è stata inoltre riportata una incidenza significativamente minore di tossicità ematologica e complicanze infettive nel gruppo di trattamento ATRA-ATO rispetto al braccio di terapia standard. Tuttavia, i pazienti trattati con ATRA-ATO hanno mostrato una più alta incidenza di rialzo degli indici di funzionalità epatica (transaminasi, bilirubina, fosfatasi alcalina) e del prolungamento del QTc rispetto al gruppo ATRA-chemioterapia; queste complicanze sono risultate comunque sempre reversibili e gestibili con modifiche o interruzioni temporanee del trattamento con ATRA e/o ATO. I risultati di questo studio sono stati recentemente aggiornati con un follow up più lungo, dimostrando una differenza ancora maggiore in favore del gruppo ATRA-ATO ⁽⁴⁴⁾.

Il trial AML-17 condotto autonomamente dal gruppo cooperativo britannico NCRI ha recentemente confermato l'efficacia dell'ap-

proccio ATRA-ATO senza chemioterapia ⁽²⁴⁾. Analogamente allo studio italo-tedesco su citato, lo studio del NCRI ha confrontato l'approccio standard AIDA (senza terapia di mantenimento) con la combinazione ATRA-ATO, impiegando una schedula diversa dell'ATO somministrato alla dose di 0,3 mg / kg nei giorni 1-5 di ogni ciclo di 0,25 mg / kg due volte a settimana nelle settimane 2-8 del ciclo 1 e 2- 4 dei cicli 2-5.

Inoltre, poiché erano inclusi i pazienti con LAP ad alto rischio, era previsto per questa categoria l'impiego di 1 o 2 dosi di GO, 6 mg/m² nei primi 4 giorni della terapia di induzione.

Con un follow up mediano di 32,5 mesi, i risultati di questo studio hanno confermato un beneficio significativo a favore del regime ATRA-ATO rispetto all'AIDA in termini di sopravvivenza libera da eventi a 4 anni (91% vs 70%; $p = 0,002$), sopravvivenza libera da recidiva molecolare a 4 anni (98% vs 70%; $p = <0,0001$) ed incidenza cumulativa di recidiva molecolare (1% *versus* 18%; $p = 0,0007$).

La sopravvivenza globale, a differenza dell'APL0406, non ha mostrato differenze tra il braccio ATRA-ATO ed il gruppo AIDA (93% vs 89%, $p=ns$) ⁽²⁴⁾. Sulla base dei risultati di questi due studi randomizzati, oggi si raccomanda che la terapia con ATRA-ATO debba rappresentare il nuovo standard di trattamento di prima linea per i pazienti con LAP a rischio basso-intermedio.

Altri agenti terapeutici

Gemtuzumab ozogamicin

Il GO è un anticorpo monoclonale anti-CD33 coniugato, disegnato per dirigere un agente chemioterapico (N-acetil gamma caliceamicina) direttamente sulle cellule bersaglio. I blasti della leucemia acuta promielocitica rappresentano bersagli ideali per la terapia con GO data la elevata espressione dell'antigene CD33 nella pressochè totalità dei casi.

Il GO è stato testato come agente singolo in 16 pazienti affetti da APL in recidiva molecolare in uno studio pilota italiano alla dose di 6 mg/m² per un minimo di 2 dosi. Con questo programma terapeutico, la remissione molecolare è stata raggiunta nel 91% dei casi dopo due dosi e nel 100% nei pazienti testati dopo la terza dose. Sette su 14 pazienti che avevano risposto sono rimasti in remissione molecolare sostenuta per un periodo di follow up mediano di 15 mesi, mentre 7 pazienti hanno recidivato a 3-15 mesi. La tossicità osservata in questo studio è stata transitoria e consisteva principalmente in mielosoppressione ed aumento degli enzimi epatici.

Un solo paziente ha presentato grave tossicità epatica senza alcun segno di malattia veno-occlusiva.

In sintesi, GO è un agente ben tollerato e mostra elevata efficacia nella LAP avanzata ⁽⁴⁵⁾. Come già accennato sopra, diversi studi clinici che utilizzano ATRA e ATO in prima linea includevano anche l'uso di GO ai fini di contrastare la iperleucocitosi in pazienti a alto rischio ^(24, 43).

Arsenico orale

Una formulazione orale di arsenico (tetra-arsenico orale tetra solfuro) è stata recentemente valutata come trattamento di prima linea nella LAP e confrontata con la formulazione endovenosa di triossido di arsenico in uno studio di non inferiorità ⁽⁴⁶⁾. Un totale di 242 pazienti sono stati assegnati a *random* ad un trattamento con arsenico orale o per via endovenosa insieme ad ATRA come terapia di induzione, seguita da 3 cicli di consolidamento e mantenimento.

Dopo un follow up mediano di 39 mesi, non sono state riscontrate differenze significative nei tassi di sopravvivenza globale a 3 anni (99,1% vs 96,6%) tra i due bracci di terapia. L'arsenico orale ha inoltre mostrato un profilo di tossicità comparabile con quello dell'ATO endovenoso, senza differenze nel tasso di effetti collaterali non ematologici (tossicità epatica di grado 3-4) ⁽⁴⁶⁾. Uno studio pilota è stato condotto dallo stesso gruppo di ricercatori in 20 pazienti con LAP a rischio basso con terapia orale con arsenico e ATRA, seguita da cicli di consolidamento con gli stessi farmaci e senza chemioterapia. Ad un follow up mediano di 14 mesi, tutti i pazienti hanno raggiunto la remissione morfologica e molecolare e non si sono verificate recidive ⁽⁴⁷⁾.

Tamibarotene

L'AM80 (o tamibarotene) è un retinoide sintetico che è stato inizialmente testato nei pazienti con LAP recidivati o refrattari. Questo agente ha mostrato una maggiore affinità in vitro per i recettori dell'acido retinoico (RAR), ed una bassa affinità di legame per le proteine recettoriali intra-citoplasmatiche CRABP ⁽⁴⁸⁾. In uno studio preliminare su 24 pazienti, 14 (58%) hanno ottenuto la remissione completa ed i principali effetti collaterali registrati sono la ipercolesterolemia e ipertrigliceridemia. ⁽⁴⁹⁾ Recentemente, lo stesso tamibarotene è stato testato come terapia di mantenimento in uno studio randomizzato di confronto con ATRA. Nessuna differenza significativa è stata riportata nelle analisi di follow up a lungo termine, tuttavia una maggiore efficacia del tamibarotene rispetto all'ATRA è stata osservata nei pazienti con malattia ad alto rischio ⁽⁵⁰⁾.

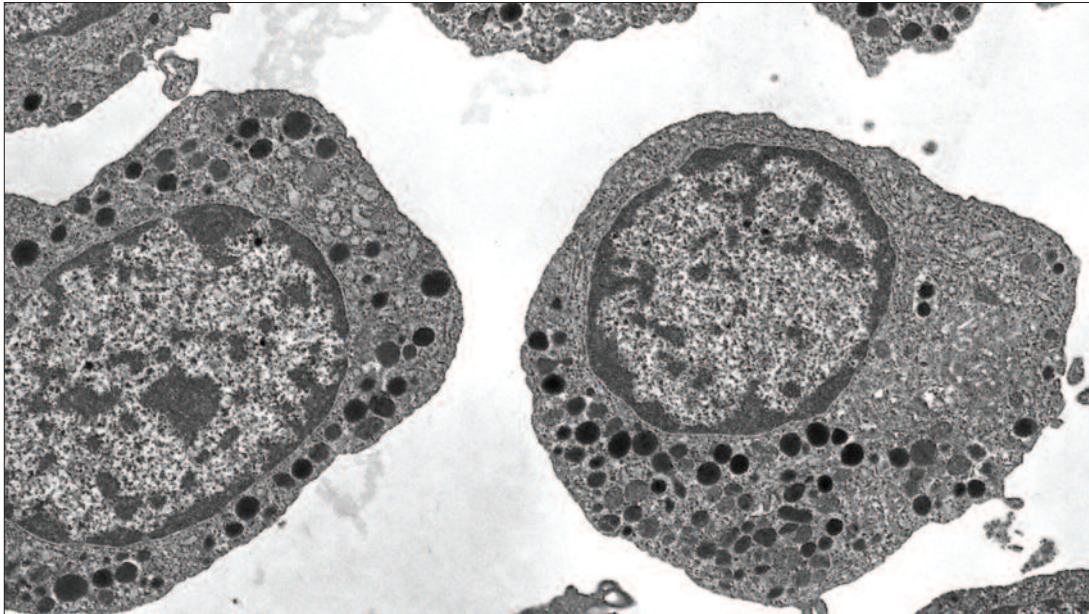
Il tamibarotene è stato infine anche testato a 6 mg/m² come terapia di induzione e di consolidamento in uno studio di fase II in pazienti LAP refrattari o recidivati dopo il trattamento con ATO e ATRA: il tasso di risposta complessiva è stato del 64% con il 21% di risposte molecolari ⁽⁵¹⁾. Questi dati suggeriscono attività del farmaco nella malattia avanzata e suggeriscono la possibilità di associare questo composto con l'ATO in studi sperimentali.

Bibliografia

1. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009;113(9):1875-91.
2. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008;111(5):2505-15.
3. Grimwade D, Mistry AR, Solomon E, Guidez F. Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for differentiation therapy. *Cancer Treat Res*. 2010;145(13):219-35.
4. Lehmann S, Ravn A, Carlsson L, Antunovic P, Deneberg S, Möllgård L, et al. Continuing high early death rate in acute promyelocytic leukemia: a population-based report from the Swedish Adult Acute Leukemia Registry. *Leukemia*. 2011;25(7):1128-1134.
5. Park JH, Qiao B, Panageas KS, Schymura MJ, Jurcic JG, Rosenblatt TL, et al. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. *Blood*. 2011;118(5):1248-1254.
6. Lo-Coco F, Cicconi L, Breccia M. Current standard treatment of adult acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2016;172(6):841-54.
7. Bernard J, Weil M, Boiron M, Jacquillat C, Flandrin G, Gemon MF. Acute promyelocytic leukemia: results of treatment by daunorubicin. *Blood*. 1973;41(4):489-96.
8. Petti MC, Avvisati G, Amadori S, Baccarani M, Guarini AR, Papa G, et al. Acute promyelocytic leukemia: clinical aspects and results of treatment in 62 patients. *Haematologica*. 1987;72(2):151-5.
9. Avvisati G, Mandelli F, Petti MC, Vegna ML, Spadea A, Liso V, et al. Idarubicin (4-demethoxydaunorubicin) as single agent for remission induction of previously

- untreated acute promyelocytic leukemia: a pilot study of the Italian cooperative group GIMEMA. *Eur J Haematol*. 1990;44(4):257-60
10. Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1988;72(2):567-72.
11. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Woods WG, et al. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood*. 2002;100(13):4298-4302.
12. Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Kawai Y, Tsuzuki M, et al. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RARalpha transcript after consolidation therapy: the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood*. 2007;110(1):59-66.
13. Lengfelder E, Haferlach C, Saussele S, Haferlach T, Schultheis B, Schnittger S, et al. High dose ara-C in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term results of the German AMLCG. *Leukemia*. 2009;23(12):2248-58.
14. Ades L, Guerci A, Raffoux E, Sanz M, Chevallier P, Lapusan S, et al. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience. *Blood*. 2010;115(9):1690-96.
15. Sanz MA, Montesinos P, Rayón C, Holowiecka A, de la Serna J, Milone G, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia based on all-trans retinoic acid and anthracycline with addition of cytarabine in consolidation therapy for high-risk patients: further improvements in treatment outcome. *Blood*. 2010;115(25):5137-46.
16. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Breccia M, Gallo E, Rambaldi A, et al. Front-line treatment of acute promyelocytic leukemia with AIDA induction followed by risk-adapted consolidation for adults younger than 61 years: results of the AIDA-2000 trial of the GIMEMA Group. *Blood*. 2010;116(17):3171-79.
17. Avvisati G, Lo-Coco F, Paoloni FP, Petti MC, Diverio D, Vignetti M, et al. AIDA 0493 protocol for newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: very long-term results and role of maintenance. *Blood*. 2011;117(18):4716-25.
18. Iland HJ, Bradstock K, Supple SG, Catalano A, Collins M, Hertzberg M, et al. All-trans-retinoic acid, idarubicin, and IV arsenic trioxide as initial therapy in acute promyelocytic leukemia (APML4). *Blood*. 2012;120(8):1570-80.
19. Burnett AK, Hills RK, Grimwade D, Jovanovic JV, Craig J, McMullin MF, et al. Inclusion of chemotherapy in addition to anthracycline in the treatment of acute promyelocytic leukaemia does not improve outcomes: results of the MRC AML15 Trial. *Leukemia*. 2013;27(4):843-51
20. Zhang P, Wang SY, Hu LH. Arsenic trioxide treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin J Hematol*. 1996;17:58-62.
21. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, et al. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL), II: clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*. 1997;89(9):3354-60.
22. Estey E, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Faderl S, Verstovsek S, Jones D, et al. Use of all-trans retinoic acid plus arsenic trioxide as an alternative to chemotherapy in untreated acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2006;107(9):3469-73.
23. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(2):111-21.
24. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Bowen D, Kell J, Knapper S et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(13):1295-1305.
25. Mandelli F, Diverio D, Avvisati G, Luciano A, Barbui T, Bernasconi C, et al. Molecular remission in PML/RARα-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. *Blood*. 1997;90(3):1014-1021.
26. Sanz MA, Martín G, Rayón C, Esteve J, González M, Díaz-Mediavilla J, et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARα-positive acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(9):3015-3021.
27. Sanz MA, Lo-Coco F, Martín G, Avvisati G, Rayón C, Barbui T, et al. Definition of relapse risk and role of non-anthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood*. 2000;96(4):1247-53.
28. Sanz MA, Martín G, González M, León A, Rayón C, Rivas C, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*. 2004;103(4):1237-1243.
29. Sanz MA, Lo-Coco F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):495-503.
30. Lo-Coco F, Latagliata R, Breccia M. Management of acute promyelocytic leukemia in the elderly. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1):e1-e6.
31. Latagliata R, Petti MC, Fenu S, Mancini M, Spiriti MA, Breccia M, et al. Therapy-related myelodysplastic syndrome-acute myelogenous leukemia in patients treated for acute promyelocytic leukemia: an emerging problem. *Blood*. 2002;99(3):822-824.
32. Davison K, Mann KK, Miller WH Jr. Arsenic trioxide: mechanisms of action. *Semin Hematol*. 2002;39(2 Suppl 1):3-7.
33. Hu J, Liu YF, Wu CF, Xu F, Shen ZX, Zhu YM, et al. Long-term efficacy and safety of all-trans retinoic acid/arsenic trioxide-based therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3342-7.
34. Shen Z, Chen G, Ni J. Use of arsenic trioxide in the treatment of APL, clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*. 1997;89(9):3354-3360.
35. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, et al. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med*. 1998;339(19):1341-1348.
36. Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *Jo Clin Oncol*. 2001;19(18):3852-60.
37. Breccia M, Lo-Coco F. Arsenic trioxide for management of acute promyelocytic leukemia: current evidence on its role in front-line therapy and recurrent disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13(7):1031-43.
38. Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Rostami S, Ghaffari SH, Jahani M, et al. Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia. *J. Clin Oncol*. 2011;29(20):2753-2757.
39. Mathews V, George B, Chendamarai E, Lakshmi KM, Desire S, Balasubramanian P, et al. Single agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term follow up data. *J. Clin Oncol*. 2010;28(24):3866-3871.
40. Shen ZX, Shi ZZ, Fang J, Gu BW, Li JM, Zhu YM, et al. All-trans retinoic acid/As₂O₃ combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101 (15): 5328-35.
41. Lou Y, Qian W, Meng H, Mai W, Tong H, Tong Y, et al. High efficacy of arsenic trioxide plus all-trans retinoic acid based induction and maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res*. 2013;37(1):37-42.
42. Iland HJ, Collins M, Bradstock K, Supple SG, Catalano A, Hertzberg M, et al. Use of arsenic trioxide in remission induction and consolidation therapy for acute promyelocytic leukemia in the Australasian Leukaemia and Lymphoma Group (ALLG) APML4 study: a non-randomized phase 2 trial. *Lancet Hematology*. 2015;(2):e357-e366.
43. Ravandi F, Estey E, Jones D, Faderl S, O'Brien S, Fiorentino J, et al. Effective treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):504-510.
44. Lo-Coco F, Di Donato L, Schlenk R. Targeted therapy alone for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2016 (in corso di stampa).
45. Lo-Coco F, Cimino G, Breccia M, Noguera NI, Diverio D, Finolezzi E, et al. Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) as a single agent for molecularly relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2004;104(7):1995-1999.
46. Zhu HH, Wu DP, Jin J, Li JY, Ma J, Wang JX, et al. Oral tetra-arsenic tetra-sulfide formula versus intravenous arsenic trioxide as first-line treatment of acute promyelocytic leukemia: a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2014;31(33):4215-21.
47. Zhu HH, Huang XJ. Oral arsenic and retinoic acid for non-high-risk acute pro-

- myelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371(23):2239-224.
48. Ohnishi K. PML-RARalpha inhibitors (ATRA, tamibaroten, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia. *Int J Clin Oncol.* 2007;12(5):313-7.
 49. Tobita T, Takeshita A, Kitamura K, Ohnishi K, Yanagi M, Hiraoka A, M et al. Treatment With a New Synthetic Retinoid, Am80, of Acute Promyelocytic Leukemia Relapsed From Complete Remission Induced by All-trans Retinoic Acid. *Blood.* 1997;90(3):967-973.
 50. Shinagawa K, Yanada M, Sakura T, Ueda Y, Sawa M, Miyatake J, et al. Tamibarotene as maintenance therapy for acute promyelocytic leukemia: results from a randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 2014;32(33):3729-35.
 51. Sanford D, Lo-Coco F, Sanz MA, Di Bona E, Coutre S, Altman JK, et al. Tamibarotene in patients with acute promyelocytic leukaemia relapsing after treatment with all-trans retinoic acid and arsenic trioxide. *British Journal of Haematology.* 2015;171(4):471-477.



Promielociti al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).

Parole Chiave

LAP, ATRA, antracicline, ATO

Indirizzi per la corrispondenza

Laura Cicconi
Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione
Università degli Studi Tor Vergata - 00133 Roma
E-mail: cicconi.laura@yahoo.it

ESSERCI.

Momenti. Persone. Passioni. Celgene lavora ogni giorno per dare a ogni paziente il tempo di viverli. Nonostante la malattia.

celgene.com

Improving the lives of patients worldwide.



Leucemia mieloide acuta

Giovanni Martinelli

Istituto di Ematologia "L. E A. Seràgnoli", Bologna



Introduzione

La leucemia mieloide acuta (LMA) è una malattia proliferativa acuta del midollo osseo che origina da cellule progenitrici mieloidi. Fin dalla pubblicazione della terza edizione della classificazione WHO (2001), è divenuto via via sempre più chiaro come diverse lesioni genetiche cooperino non solo al fine di stabilire il processo leucemico, ma influenzino anche le sue caratteristiche morfologiche e cliniche, rappresentando in alcuni casi potenti indicatori prognostici utili alla definizione del rischio di malattia ed alla conseguenziale classificazione dei pazienti ⁽¹⁾.

L'ultima classificazione delle neoplasie ematologiche riconosce infatti diversi sottotipi di LMA, distinti in base a specifiche alterazioni cariotipiche e genetiche ⁽²⁾. Numerosi sforzi sono stati condotti per definire profili mutazionali e loro significato ⁽³⁾, e ne sono ancora in corso altrettanti che si avvalgono anche di tecnologie innovative, come il *Next Generation Sequencing*.

Sebbene l'identificazione di nuove specifiche mutazioni genetiche abbia già consentito di ottimizzare l'approccio ai soggetti affetti da LMA, la percentuale di essi che riescono ad ottenere una remissione completa, se trattati con chemioterapia intensiva, varia dal 40 all'80%: e questo a seconda dei vari studi condotti e delle caratteristiche prognostiche della malattia alla diagnosi ^(4,5).

Inoltre, la maggior parte dei pazienti ricade entro i primi 2 anni dall'ottenimento della remissione completa, soprattutto quei pazienti in cui non viene effettuato il trapianto allogenico di midollo osseo come terapia di consolidamento.

La LMA è perciò caratterizzata da una scarsa sopravvivenza media anche nei soggetti giovani ^(6,7). Inoltre, ed ancor più preoccupante, la maggior parte dei vari regimi chemioterapici utilizzati fino ad ora non ha mai dimostrato significativi miglioramenti nella sopravvivenza, soprattutto nella categoria di pazienti che sono definiti ad alto rischio, classificando questi pazienti secondo i più diffusi *scores* prognostici ⁽⁸⁾.

I soggetti anziani, inoltre, che non hanno accesso a chemioterapie intensive per la spesso concomitante e diffusa comorbidità, o che

non sono candidabili a chemioterapie intensive, hanno prognosi generalmente infausta, e una sopravvivenza media che può essere stimata in mesi ⁽⁹⁾.

Si impone pertanto, nella maggior parte dei malati, la ricerca di *markers* molecolari fruibili come *targets* per un terapia mirata o per strategie personalizzate, che colpiscano il più possibile la cellula leucemica e risparmino la cellula non neoplastica. Terapie mirate o target specifici in via di sviluppo clinico e, associate a chemioterapia convenzionale, sono assai promettenti.

Abbiamo pertanto ritenuto importante, dopo un breve *excursus* riguardante lo stato dell'arte, con le terapie registrate, approfondire le più moderne conoscenze sui *markers* molecolari leucemie-associati, la loro identificazione, la loro applicazione diagnostica e le strategie terapeutiche innovative proposte nel contesto della LMA.

Terapie registrate

I protocolli di trattamento chemioterapici della LMA sono sostanzialmente basati sull'utilizzo di citarabina e antraciclina, con l'eventuale aggiunta di fludarabina o etoposide come terzo farmaco. Tali protocolli, utilizzabili nel soggetto giovane e *fit*: con appropriate riduzioni nei dosaggi, possono essere utilizzati anche nel soggetto anziano e *fit*.

Non esistono farmaci bersaglio mirati registrati nella LMA. Fanno eccezione, nel paziente anziano *unfit*, l'azacitidina, somministrabile ai malati che hanno tra il 20 e il 30% di blasti midollari, e la decitabina. Entrambi questi farmaci agiscono da demetilanti del DNA, e sono pertanto efficaci nel ridurre la quota blastica midollare uccidendo la cellula leucemica, con induzione e conseguente remissione completa in una piccola porzione della popolazione, e ottenimento della trasfusione indipendenza in una consistente parte dei pazienti trattati nonché miglioramento della loro qualità di vita ⁽¹⁰⁾.

Entrambi questi due farmaci, ad azione primariamente demetilante, non si possono definire propriamente target mirati, in quanto l'azione demetilante è relativamente diffusa sull'intero genoma e non specifica su particolari geni. Si potrebbe dire che è un'azione *signaling*

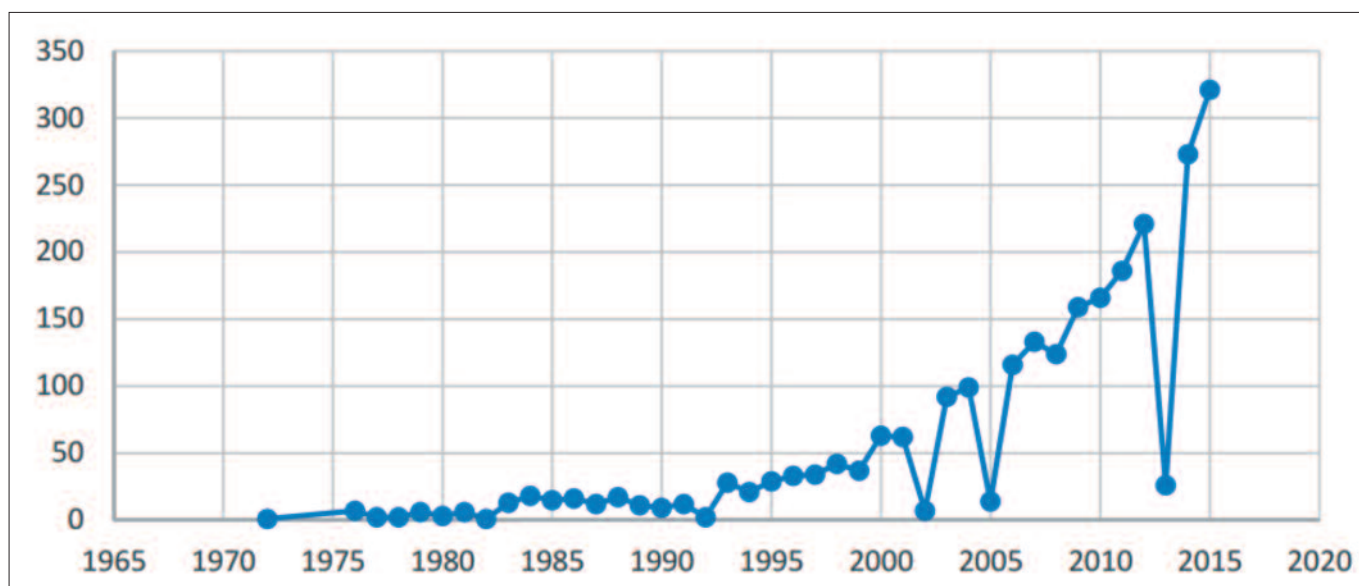


Figura 1 – Numero di lavori pubblicati contenenti nel titolo, o abstract, i termini acute myeloid leukemia e target (Elaborazione personale).

specific, nel senso che colpisce il processo di demetilazione delle citidine sul DNA, inibendo un processo specifico: la metilazione nucleotidica delle 5-methyl-citidine.

Vista la prognosi infausta, soprattutto nei soggetti anziani, in quelli che ricadono dopo breve tempo dalla terapia, ed in chi fallisce nell'ottenere una prima remissione completa, la LMA è stata ed è ad oggi un terreno di sviluppo di farmaci mirati e innovativi, capaci di colpire specifiche alterazioni e di avere un profilo di sicurezza, tale che alcuni di questi farmaci possano essere proposti anche alla popolazione anziana. La grande conoscenza biologica acquisita negli ultimi decenni si sta traducendo in proposte terapeutiche per il paziente, e il numero di pubblicazioni sull'argomento vede un *trend*

ascendente (Figura 1).

Il ruolo della genetica

La LMA è per la sua genesi prevalentemente, se non esclusivamente, una malattia genetica costituzionale o acquisita. I genomi hanno minor numero di mutazioni o lesioni genetiche rispetto ad altri tumori dell'adulto.

In uno studio recente condotto da Jay P. Patel ⁽³⁾ è stata evidenziata almeno una mutazione nel 97,8% dei pazienti analizzati per un pannello di 18 geni noti per essere coinvolti nell'emopoiesi (Figura 2). Come si può facilmente intuire ogni paziente alla diagnosi di LMA ha una probabilità del 25% di avere una mutazione in uno dei tre

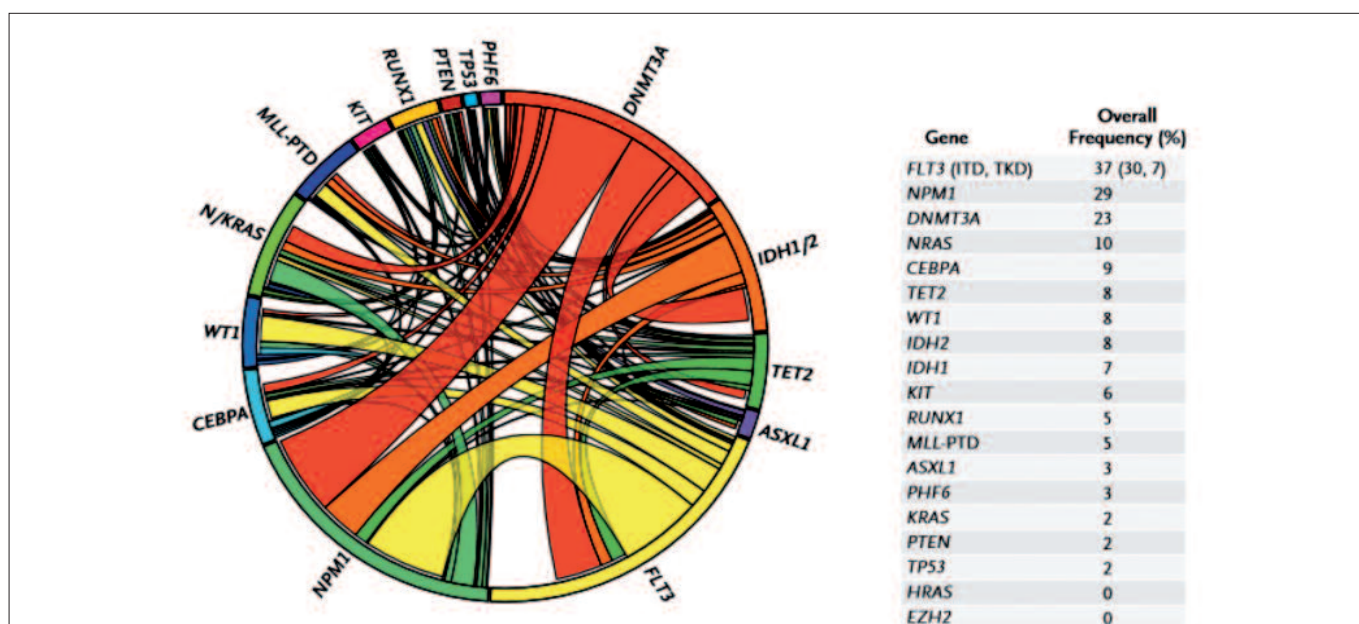


Figura 2 – Mutazioni in 398 pazienti con LMA ⁽³⁾.

geni (FLT3, NPM1, e DNMT3A) più frequentemente mutati.

Ogni sforzo nel definire le basi molecolari della LMA ha, in un certo senso, provvisto il clinico di un'arma a doppio taglio: da una parte, questa definizione molecolare è stata fondamentale dal punto di vista prognostico e per lo sviluppo terapeutico. Dall'altra parte, è stata fatta ancora troppo poca chiarezza sia sulle mutazioni in specifici sub-cloni, sia sul significato patogenetico di alcune di esse. In particolare, non è stata posta distinzione tra mutazioni inizianti o *driver* la leucemia e mutazioni pre-esistenti o considerate *passengers*, ossia mutazione il cui ruolo patogenetico è incerto.

La vastissima eterogeneità genetica rende così difficile tradurre tale conoscenza nella pratica clinica. Inoltre, la presenza di mutazioni che tipicamente interessano solo popolazioni sub-clonali, fa sì che non tutti i target siano ottimali ai fini terapeutici ⁽¹¹⁾.

Leucemia promielocitica acuta

L'esempio canonico per l'utilizzo delle terapie mirate è stato il caso della leucemia promielocitica acuta (FAB-M3).

Fin dal primo report, avvenuto nel 1957, la leucemia M3 è stata ritenuta, per molti anni, come la forma di leucemia più letale. L'introduzione in clinica dell'acido trans-retinoico (ATRA) nel 1985 e del triossido d'arsenico (ATO), e successivamente, l'utilizzo recente di entrambi questi farmaci in prima linea, ed in combinazione, hanno drasticamente cambiato la prognosi di tale patologia. L'esperienza, ora ancora più matura nel follow up di questi pazienti con M3 a rischio intermedio-basso, mostra una straordinaria attività antileucemica duratura nel tempo che fa ben sperare anche nei pazienti ad alto rischio. (Figura 3) ⁽¹²⁾.

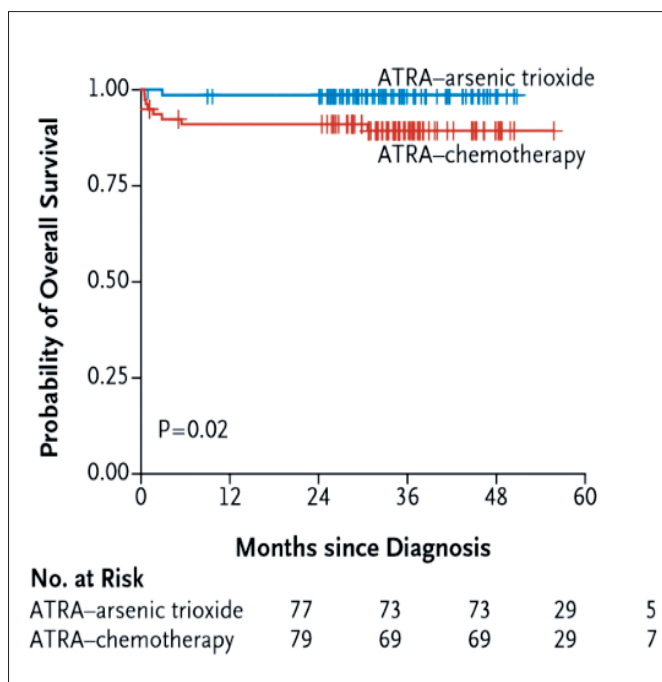


Figura 3 – Sopravvivenza di pazienti a rischio basso e intermedio trattati in prima linea con ATRA+chemioterapia vs ATRA+ATO ⁽¹²⁾.

In questo contesto, si è recentissimamente aperto, in molti Paesi europei e Centri italiani, il trial APOLLO, al fine di valutare in uno studio clinico prospettico ed in maniera randomizzata l'effetto della combinazione ATRA+ ATO verso un programma di chemioterapia più convenzionale, sui pazienti con leucemia M3 promielocitica ed a rischio alto.

Pertanto, ATRA ed ATO possono essere considerati a buon titolo il primo esempio vincente di terapia mirata nelle LMA, agendo sulla proteina di fusione PML-RARalpha prodotta dal riarrangiamento t(15;17), che è caratteristico dell'LMA M3 ⁽¹³⁾.

Terapie mirate rivolte contro target molecolari

L'esperienza nella terapia mirata della M3 tuttavia, è rimasta senza un vero seguito. Lo sviluppo di piccoli farmaci, non biologici, e diretti contro bersagli molecolari, costituisce sicuramente uno dei filoni più promettenti nella terapia delle leucemie acute, e, da molti anni, si sono cercate terapie mirate nei confronti di principali target leucemia associati, spesso e purtroppo, senza un reale beneficio terapeutico immediato ai malati in termini di sopravvivenza.

Di seguito analizzeremo, senza scopo di esaustività, le più promettenti terapie mirate, ora in fase avanzata di sviluppo clinico, utilizzate nell'induzione o nella ricaduta/refrattarietà delle LMA, esposte in base al meccanismo d'azione od al target terapeutico.

Inibitori di FLT3

FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3) è un recettore di membrana con un dominio chinasi intracellulare che trasmette stimoli proliferativi. Mutazioni attivanti di un allele di FLT3 sono state identificate, approssimativamente, nel 30% dei pazienti con LMA ⁽³⁾.

Per questi motivi, FLT3 si configura come un attraente bersaglio per terapie molecolari nelle LMA FLT3 positive. Sono stati sviluppati diversi farmaci (Figura 4): alcuni di questi sono tuttora in studio ed in sperimentazione clinica avanzata (studi di fase 3), altri sono stati approvati per il trattamento di tumori solidi e vengono utilizzati off-label da molti clinici ⁽¹⁴⁻¹⁵⁾.

Midostaurina (PKC-412)

Originalmente testata nel melanoma, la midostaurina si adatta ed inibisce numerose chinasi, tra cui il recettore mutato nelle leucemie acute, FLT3 ⁽¹⁶⁾. Lo studio di fase 2 su 95 pazienti condotto da Fischer et al. dimostra un buon profilo di sicurezza e l'ottenimento di una risposta ematologica nel sangue periferico nel 71% dei pazienti con LMA e mutazione di FLT3 ⁽¹⁷⁾.

Successivamente sono stati condotti studi pilota di combinazione tra midostaurina e agenti demetilanti o farmaci chemioterapici.

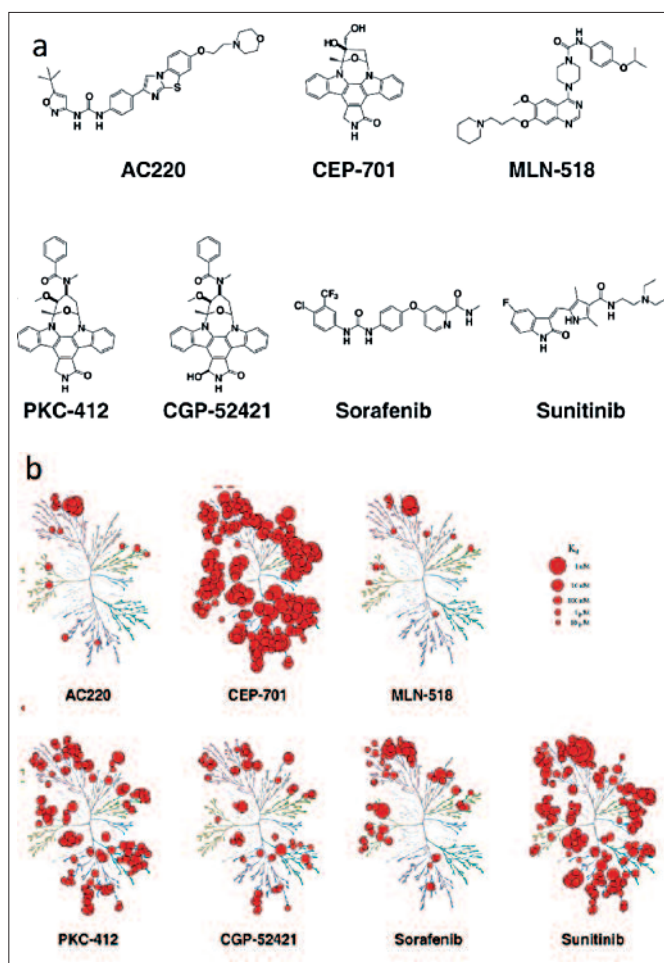


Figura 4 – Inibitori di FLT3 (a) e principali interazioni con 409 chinasi (b) ⁽¹⁵⁾.

Nel paziente *fit* con LMA all'esordio, è stato recentemente pubblicato lo studio di fase 3, che ha valutato l'efficacia terapeutica della combinazione di midostaurina, al dosaggio di 50 mg al giorno, e per 14 giorni, e chemioterapia intensiva convenzionale (secondo lo schema 3+7 *like*) ⁽¹⁸⁾. I dati presentati hanno evidenziato un significativo vantaggio in termini di sopravvivenza nei pazienti che hanno ricevuto midostaurina (Figura 5).

Quizartinib (AC-220)

Studi preclinici hanno dimostrato che il quizartinib (AC220), un nuovo inibitore sviluppato inizialmente da AMBIT, è altamente attivo nell'inibizione sia del recettore mutato che *wild type* di FLT3. Si è inoltre dimostrato attivo nell'inibire, a concentrazioni nanomolari, anche i recettori tirosin chinasi c-KIT, PDGFR α , PDGFR β e RET. Il farmaco AC220, si è inoltre dimostrato attivo nell'arresto del ciclo cellulare delle cellule leucemiche e nell'induzione della differenziazione e dell'apoptosi nelle cellule staminali e clonogeniche di LMA ⁽¹⁹⁾.

Lo studio di fase I, nei pazienti ricaduti o refrattari ad almeno una linea di chemioterapia convenzionale, ha mostrato un tasso di risposta globale del 30%, indipendentemente dalla dose.

I principali effetti avversi sono stati l'aumento del QTc e nausea ⁽²⁰⁾.

Lo studio di fase 2 ha mostrato un tasso di risposta globale del 45% (parziale 24%, completa 21%), ed ha confermato un accettabile profilo di *safety* ⁽²¹⁻²²⁾.

Lo studio di fase 3 al quale stanno partecipando numerosi centri ematologici italiani è ancora in corso, ed i primi risultati sono attesi per fine 2016. Sono stati inoltre condotti due studi di combinazione con chemioterapia che hanno dimostrato la sicurezza di tale combinazione ⁽²³⁾. Numerosi studi di combinazione di AC220 con o senza agenti ipometilanti sono attualmente in fase di studio ed aperti all'arruolamento, e sono attesi i risultati tra circa due anni.

Gilteritinib (ASP-2215)

È un nuovo inibitore che inibisce il dominio tirosino-chinasi di FLT3 e di AXL: è attivo non solo sulla variante FLT3 ITD e/o mutata ma anche verso molti subcloni FLT3 mutati nel dominio tirosino-chinasi. È un farmaco che ha, tra le varie sue caratteristiche chimiche, un legame con FLT3 altamente specifico. I dati preliminari finora presentati ed ai quali abbiamo contribuito, sono relativi ad uno studio di Fase 1-2 sulla sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia di ASP2215, a dosaggi crescenti in pazienti con la LMA, ricaduti o refrattari. Lo studio iniziale è stato presentato nel 2015 ⁽²⁴⁻²⁵⁾.

I dati preliminari raccolti hanno dimostrato un tasso di risposta globale (ORR = CRc + PR) di 57,5% e un tasso di risposta completa composita (CRc = CR + CRp + CR) del 47,2% in 106 pazienti con le mutazioni FLT3.

Il farmaco era attivo fin dai dosaggi più bassi (80 mg/die) ma, ed ancor più, alle dosi più elevate, nelle successive coorti terapeutiche arruolate (fino a 240 mg/die).

Ancora, la durata mediana della risposta era di 18 settimane, a tutte le dosi testate, e la sopravvivenza globale mediana era di circa 27 set-

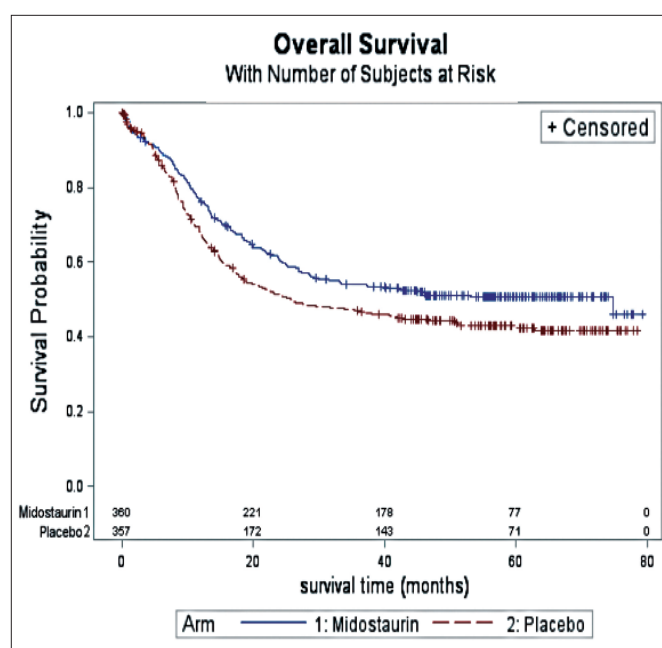


Figura 5 – Pazienti trattati con midostaurina* chemioterapia vs pazienti trattati con placebo in combinazione a chemioterapia ⁽¹⁸⁾.

timane, nei pazienti trattati al dosaggio di 80 mg/die.

Il profilo di sicurezza si è rivelato buono alle dosi di 80, 120 e 240 mg, con i principali effetti avversi caratterizzati da astenia, stipsi, diarrea e effetti di carattere ematologico dovuti presumibilmente alla soppressione midollare. È attualmente in corso lo studio di fase 3, con il farmaco randomizzato 2:1 *vs* chemioterapia.

Crenolanib

Valutato inizialmente nei tumori stromali gastrointestinali, il crenolanib si è dimostrato efficace in uno studio preclinico contro le cellule di LMA FLT3⁺ (26). In particolare ha mostrato di inibire la mutazione del gene FLT3 chiamata D835, che costituisce un comune meccanismo di resistenza ad altri inibitori di FLT3 (21). Basandosi su questo razionale, uno studio di fase 2 nelle LMA refrattarie è ad oggi aperto all'arruolamento.

Ponatinib

Il ponatinib è attivo nell'inibire numerose chinasi, tra cui ABL e BCR-ABL, anche mutato nella variante T315I, e, pertanto, è stato registrato nel trattamento delle leucemie mieloidi croniche. Un recente studio di fase 1 ha esplorato l'utilizzo nelle LMA refrattarie FLT3 mutate. Dodici pazienti sono stati trattati con ponatinib, e il tasso di risposta globale con remissione completa è stato del 25% (3/12), con 2 remissioni complete.

Tutti i pazienti che hanno tratto beneficio dall'uso del ponatinib erano FLT3 positivi (28). Inoltre, la nota attività inibitoria del ponatinib, che risente poco di mutazioni dei domini chinasi, fa sì che questo possa essere un buon farmaco da testare nelle leucemie FLT3 positive nel prossimo futuro.

Sorafenib

Il sorafenib è un inibitore aspecifico di molte tirosin-chinasi impiegato in numerose neoplasie. Nel contesto della LMA si è dimostrato in grado *in vivo* e *in vitro* di inibire FLT3. In due studi di fase 1 come singolo farmaco il sorafenib si è mostrato in grado di provocare remissione completa in circa il 10% dei pazienti trattati (29,30).

Recentemente sono stati inoltre riportati i primi risultati di uno studio condotto in combinazione sia con terapie citotossiche, sia con agenti demetilanti, sia con agenti attivi sugli istoni (*histone demethylasi*). In generale, tutti questi studi hanno dimostrato sicurezza ed efficacia delle combinazioni. In particolare una delle combinazioni più promettenti sembra quella tra sorafenib e 5-azacitidina (23).

Mantenimento dopo trapianto

La presenza di mutazioni attivanti FLT3 risulta essere un marker prognostico negativo, anche nei pazienti che eseguono il trapianto allogenico di midollo osseo, come consolidamento alla remissione completa della malattia. Per questo motivo, esiste nel mondo scientifico un sostenuto interesse nella possibilità di utilizzare gli inibitori di FLT3 come terapia di mantenimento dopo trapianto. Il primo farmaco, ad essere investigato in questo contesto, è stato il sorafenib, che ha dato buoni risultati sia nell'uso dopo trapianto che nel breve

periodo prima e dopo il trapianto (31). Inibitori di FLT3 con un profilo diverso non sono ancora stati valutati in maniera prospettica, ma tale valutazione è inserita negli studi di fase 3 che sono attualmente condotti sia con quizartinib che gilteritinib.

Inibitori di MDM2

La *tumor suppressor protein 53* (TP53) è un potente regolatore pro-apoptotico del ciclo cellulare di tutte le cellule, comprese quelle leucemiche. In alcuni casi di leucemia, TP53 è funzionalmente mutato⁽³⁾ o deletato, ma nella maggior parte dei casi la proteina risulta solamente funzionalmente inattivata.

In condizioni fisiologiche il livello di TP53 è regolato attraverso un feedback negativo: se i livelli di TP53 sono elevati, TP53 attiva la trascrizione del suo stesso inattivatore, la proteina chiamata *murine double minute 2* (MDM2). Le emivite di TP53 e MDM2 sono molto brevi e i loro livelli sono tenuti estremamente bassi da questo circuito a feedback. In alcuni tumori, tra cui le LMA, la funzione di TP53 è soppressa da un'over-produzione di MDM2 ed MDM4. Bloccando MDM2, può essere ripristinata la funzione biologica di TP53 e, conseguentemente, la cellula leucemica può essere spinta in apoptosi (32). È stata identificata una classe di piccole molecole che inibiscono selettivamente, ed a concentrazioni nanomolari, le proteine della famiglia di MDM, ed in particolare la MDM2, chiamate nutline. Uno studio preclinico ha correlato l'efficacia di inibizione di queste molecole sull'espressione e sulla funzione di MDM2 (27).

Un trial di fase 1-2 ha testato sicurezza ed efficacia di due composti di questa famiglia (RG7112 e poi RG7388) ed ha portato allo sviluppo clinico precoce dell'idasanutlin (RG7388): è stato testato su 130 pazienti affetti da LMA resistenti e refrattari a più linee terapeutiche convenzionali o sperimentali, e/o ricaduti anche dopo trapianto di midollo osseo allogenico. Il trial è attualmente chiuso all'arruolamento e sono attesi i risultati definitivi: tuttavia, sono stati già riportati i risultati clinici e di sicurezza, che seppur preliminari, sono molto incoraggianti (34). È in corso un trial di fase 3, chiamato MIRROS, per valutare la superiorità di idasanutlin + chemioterapia *vs* chemioterapia.

Inibitori di BCL2 e del pathway apoptotico mitocondriale

Un ulteriore ed alternativo approccio di induzione dell'apoptosi, nelle terapie personalizzate delle LMA, è l'inibizione di BCL-2. Le proteine della famiglia BCL (BAK e BAX con effetto apoptotico, BCL-2, BCL-XL e MCL con effetto anti-apoptotico) operano nella regolazione del pathway apoptotico intrinseco o mitocondriale, che governa l'induzione della morte cellulare leucemica dopo stress indotto da chemioterapia. In uno stato di equilibrio, BCL-2 si lega alle proteine pro-apoptotiche, evitando l'apoptosi cellulare attraverso la via mitocondriale (35). Piccole molecole BH3 mimetiche legano le proteine antiapoptotiche (BCL-2 e BCL-XL) e rimuovono, in que-

sto modo, il blocco dell'apoptosi, un meccanismo che può essere presente in molti tipi di cancro, inclusa la leucemia acuta.

Sono state sviluppate varie molecole inibenti BCL-2, in particolare due molecole (ABT199 ed ABT737). In studi pre-clinici e clinici precoci di fase 1, quest'ultimo, l'ABT737, è risultato meno specifico e meno sicuro: è stata notata una forte attività sul megacariocita (effetto mediato dall'inibizione di BCL-XL) che induceva piastrinopenia. Il venetoclax (ABT199) è un inibitore selettivo di BCL-2 che si è mostrato attivo in vari tipi di malattie ematologiche ⁽³⁶⁾, inclusa la leucemia linfatica cronica. Nello studio di fase 1 sono stati trattati 32 pazienti, con LMA ricaduta o refrattaria, e con dosi crescenti di venetoclax (da 20 a 800mg/die, in combinazione con citarabina). Questo studio ha dimostrato un tasso di risposta complessiva del 19% indipendentemente dai dosaggi del farmaco sperimentale. In particolare, una buona percentuale dei pazienti che hanno risposto positivamente al trattamento con il farmaco era portatrice della mutazione di IDH2 ⁽³⁷⁾. È attualmente in corso la fase di estensione dello studio per valutare l'efficacia del farmaco al dosaggio di 600mg/die ⁽³⁸⁾.

Inibitori di IDH1 e IDH2

I due enzimi, isocitrato deidrogenasi 1 e 2 (IDH1 citoplasmatico e IDH2 mitocondriale), sono in grado di convertire l'isocitrato in alfa-chetoglutarato. In uno screening mutazionale su un'ampia casistica di leucemie acute e in glioblastomi cerebrali, si è rilevato che IDH2 è mutato in circa il 10% delle LMA e nel 90% dei tumori cerebrali. Le mutazioni di IDH1 e IDH2 causano la conversione dell'alfa-chetoglutarato in beta-idrossiglutarato, aumentando i livelli cellulari di quest'ultimo e causando la metilazione di specifici geni che bloccano il differenziamento mieloide ⁽³⁹⁾. Inibitori di IDH2 sono correntemente studiati in trial clinici di fase 1, e i risultati preliminari hanno dimostrato che questi agenti hanno un'efficacia nei pazienti con malattia acuta ricaduta o refrattaria. Dati preliminari hanno mostrato una risposta complessiva del 41% nelle leucemie ricadute e refrattarie ⁽⁴⁰⁾. Un'ulteriore percentuale di pazienti ha dimostrato una stabilità della malattia, mantenendo la trasfusione indipendente se presente all'origine. Gli inibitori di IDH1 utilizzati in trial di fase 1 sono AG-120 e IDH305. Risultati molto preliminari sembrano indirizzare su un profilo di efficacia simile agli inibitori di IDH2 ⁽⁴¹⁾.

Inibitori del *pathway* di Hedgehog

Gli inibitori del *pathway* di Hedgehog, che media le interazioni tra la cellula leucemica e l'ambiente e la risposta agli stimoli proliferativi, sono stati testati sia nelle leucemie acute che nelle sindromi mielodisplastiche. I risultati non sono stati incoraggianti nell'utilizzo come *single agent*, ma hanno mostrato dei profili di attività *ex-vivo* e di sicurezza clinica, che candidano questi agenti ad essere un ottimo farmaco da aggiungere a regimi classici o innovativi ⁽⁴²⁾.

Altri farmaci a bersaglio molecolare

Molti altri promettenti farmaci sono in fase di sviluppo e sono testati in clinica e preclinica nelle LMA.

Il temsirolimus, un inibitore di mTOR, è stato utilizzato con successo in uno studio di fase 2 addizionato a clofarabina, in pazienti ricaduti e refrattari, con l'ottenimento di una *rate* di risposta complessiva del 21% ⁽⁴³⁾. Allo stesso modo lo studio di fase 1b ha mostrato una risposta completa complessiva del 68% in 28 pazienti alla prima ricaduta. Alcuni studi hanno mostrato un razionale biologico per l'utilizzo di ATRA ^(44,45) o ATRA+ATO ⁽⁴⁶⁾ nelle LMA non M3 con specifiche mutazioni (NPM1, PRAME, riarrangimenti coinvolgenti MLL). Il volasertib, inibitore della polo-*like* chinasi, ha dato promettenti risultati in uno studio randomizzato di fase 2 nel paziente anziano trattato con citarabina a basse dosi con o senza aggiunta di volasertib mostrando tassi di risposta complessiva rispettivamente del 13,3% e 30%, differenza vicina alla significatività statistica e una sopravvivenza libera di eventi IFS di 2,3 e 5,4 mesi rispettivamente (differenza statisticamente significativa). L'aggiunta di volasertib ha mostrato un aumento nella frequenza di eventi avversi senza gravare il tasso di mortalità ⁽⁴⁷⁾. Ciò fa supporre che il volasertib meriti di essere ulteriormente investigato nelle LMA, anche nel paziente non fragile. In uno studio CALGB, l'utilizzo del borte-zomib in combinazione a una chemioterapia intensiva tipo 3+7 in 94 pazienti tra i 60 e i 75 anni all'esordio ha mostrato un tasso di risposta complessivo del 69% e una risposta completa del 64% ⁽⁴⁸⁾. Questo risultato è un traguardo incoraggiante in una popolazione che storicamente vede la proposta di pochi trattamenti e bassi *rate* di risposta.

Le proteine BET (*Bromodomain e Extraterminal motif*) sono state identificate come proteine chiave nel mantenere la leucemia. L'inibizione di BDR2 e BDR4 con OXT015 si è mostrata attiva nell'indurre apoptosi e nel diminuire l'espressione di c-Myc nelle cellule di LMA. È attualmente in corso un trial di fase 1b su LMA e leucemie linfoblastiche ⁽⁴⁹⁾. Ad oggi sono stati presentati i risultati parziali di uno studio con OTX015 in cui sono stati trattati 28 pazienti con LMA: 2 hanno ottenuto una remissione mentre in altri 3 c'è stata evidenza clinica di attività ⁽⁵⁰⁾. Non si possono non segnalare i farmaci diretti contro LSD1 ⁽⁵¹⁾, STAT3 ⁽⁵²⁾ e PI3K ⁽⁵³⁾ per la loro potenziale futura utilità nelle LMA e CDC25 come potenziale target, soprattutto nelle leucemie *FLT3* positive ⁽⁵⁴⁾.

Terapie mirate rivolte contro marcatori di superficie cellulare

CD33-coniugato

Il gentuzumab-ozogamicin ha mostrato un significativo aumento della sopravvivenza e della sopravvivenza libera da malattia e un aumento della tossicità a dosi elevate, principalmente gastroenterolo-

gica ed ematologica ⁽⁵⁵⁾. Una meta-analisi ha rivisto le dosi utilizzate, mostrando che l'efficacia vista nei 3 mg/m² è paragonabile a quella con 9 mg/m², ma associata a un minor tasso di eventi avversi ⁽⁵⁶⁾.

Vari studi hanno esplorato l'utilizzo dell'anticorpo in contesti come il paziente anziano. In uno studio dell'MD Anderson di fase 2 in associazione con decitabina il tasso di risposta completa è arrivato al 60% nei pazienti ricaduti dopo più di un anno dall'ottenimento della remissione completa, e al 42% nei pazienti non precedentemente trattati ⁽⁵⁷⁾.

CD33

CD33 è un antigene essenziale per il differenziamento mieloide, e come mostrato dalle applicazioni del gentuzumab può essere un bersaglio contro cui dirigere la terapia nelle leucemie mieloidi. Molti tentativi che non comprendono immunoconiugati non hanno però prodotto risultati tanto incoraggianti quanto quelli visti nel gentuzumab-ozagomicin. I grandi effetti sulle cellule della normale emopoiesi rendono inoltre necessarie notevoli misure di supporto oltre che eventuale *rescue* con cellule staminali ⁽⁵⁸⁾.

Sono allo studio numerosi anticorpi non immunoconiugati, ma sicuramente le due strategie che generano le maggiori aspettative sono il BiTE AM330 ⁽⁵⁹⁾ e la terapia con cellule T con recettore chimerico diretto contro CD33 ⁽⁶⁰⁾, entrambi nelle fasi terminali di sviluppo preclinico.

CD123

Il CD123 è il recettore dell'interleuchina 3, ed è importante nello sviluppo di molte neoplasie ematologiche acute, tra cui la leucemia a cellule blastiche plasmocitoidi dendritiche. La sua espressione fa supporre una spinta proliferativa di tipo infiammatorio mediata, tra gli altri da NF-κB, e potrebbe costituire il razionale dell'impiego di

bortezomib nelle leucemie che lo esprimono ⁽⁶¹⁾. Il CD123 è inoltre espresso tra l'80 e il 99% nelle cellule di LMA, mentre ha bassissima espressione nelle cellule sane (Figura 6). Questo fa di lui un ottimo bersaglio per anticorpi ⁽⁶²⁾. L'anticorpo monoclonale CSL360 è stato testato in uno studio di fase 1 e a dosi maggiori di 3 mg/kg è risultato completamente saturante CD123. Due pazienti hanno ottenuto la remissione completa nel gruppo di 40 pazienti trattati con dosi scalari, ma l'anticorpo non ha mostrato intensa attività antileucemica, e quindi come *single-agent* non sembra essere attivo ⁽⁶³⁾. L'utilizzo di anticorpi a doppia affinità diretti verso CD123 e CD3 sembra una strada promettente ed è da poco aperto all'arruolamento uno studio di fase 1 ⁽⁶⁴⁾. Lo sviluppo di cellule con recettore chimerico diretto verso CD123 è invece in fase preclinica ^(65,66).

CD45

L'utilizzo di anticorpi radioconiugati è in studio preclinico come radioimmunoterapia mieloablativa nelle leucemie in stadio avanzato ⁽⁶⁷⁾. In particolare (221)At ha dimostrato un aumento della sopravvivenza nel modello animale ⁽⁶⁸⁾.

CD157

CD157 si è mostrato preferenzialmente espresso dalle cellule di LMA, ed è stato trovato espresso in tutti i campioni analizzati ⁽⁶⁹⁾. La cross-reattività con gli altri tessuti si è mostrata tollerabile e i test su animali hanno dimostrato un buon profilo di sicurezza. L'anticorpo defucosilato attivante le cellule *natural killer* MEN1112 è attualmente in studio in un trial di fase 1 con dosi scalari.

Terapie epigenetiche

Nell'ultimo decennio il sequenziamento massivo delle LMA ha portato ad identificare mutazioni in molti geni coinvolti in modifiche

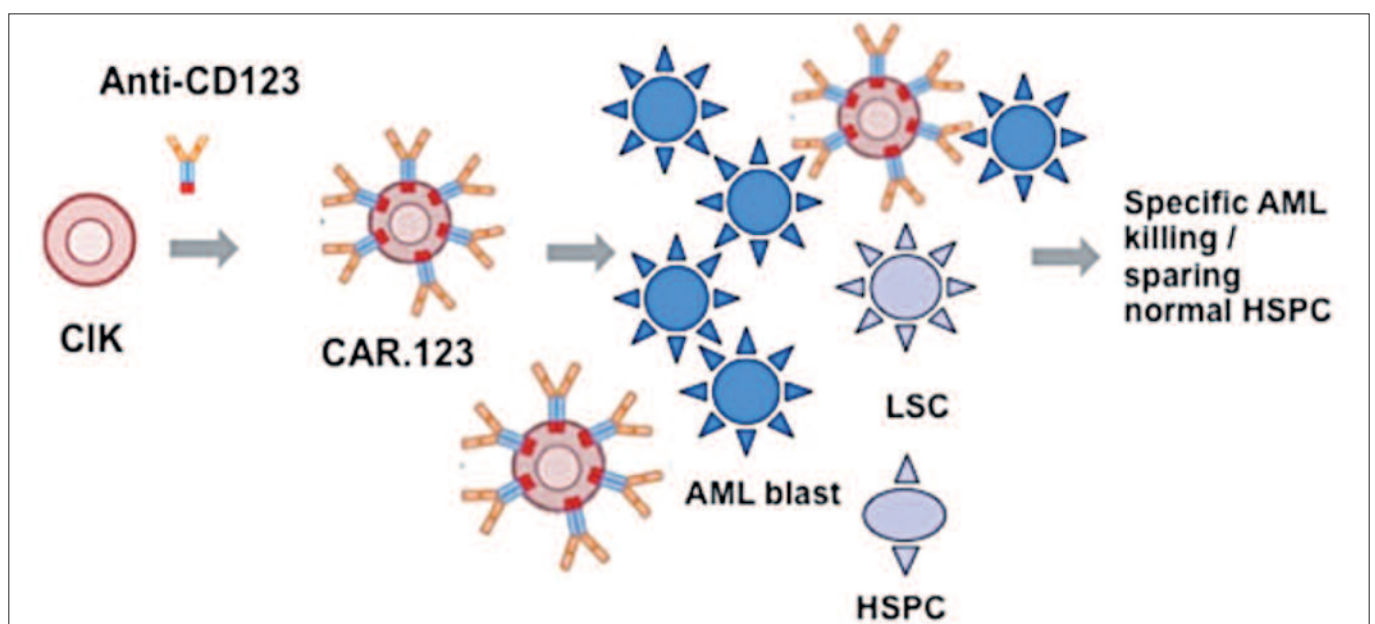


Figura 6 – CAR-T vs CD123 ⁽⁶⁵⁾

epigenetiche del DNA. Questo ha fatto sì che molte terapie che hanno target epigenetici entrassero nella pratica clinica, e ha posto le basi per lo sviluppo di nuovi farmaci ⁽⁷⁰⁾.

Nuovi demetilanti

La guadecitabina SGI-110 è un farmaco analogo alla citidina, formato da una molecola di decitabina legata ad un nucleotide guanidinico attraverso un gruppo fosfato (Figura 7). Tale legame protegge la molecola dalla degradazione extracellulare e lo rende un più potente e specifico inibitore della DNA-metil-trasferasi. La guadecitabina è attualmente in corso di studio nel paziente anziano, in particolare in un trial di fase 3 in cui è comparata alle altre terapie registrate.

DOT1 inhibitors

Eleganti esperimenti hanno dimostrato che i pazienti con riarrangiamento del gene MLL vedono nella proteina ad attività istone-metil-trasferasica DOT1 uno dei mantenitori chiave nella leucemia ⁽⁷¹⁾.

Traslare la preclinica nella clinica è difficoltoso: in questo caso l'EPZ-5676, un inibitore di DOT1L, ha portato alla remissione solo 2 pazienti su 34 trattati con MLL riarrangiato.

Inibitori dell'istone deacetilasi

Infine, il pracinostat è un inibitore orale dell'istone-deacetilasi (HDAC). Uno studio di fase 2 ha testato la doppia azione epigenetica di 5-azacitidina e pracinostat nel paziente anziano con leucemia all'esordio. Dati preliminari hanno mostrato un tasso di risposta complessivo del 54%, con un tasso di remissioni complete del 42% in 51 pazienti ⁽⁷²⁾.

Risultati simili sono stati ottenuti con panobinostat in associazione con 5-azacitidina (tasso di risposta complessivo del 31%) ⁽⁷³⁾.

Conclusioni

Considerando gli immediati futuri sviluppi sicuramente è ricco di valenza il tentativo di combinare farmaci che agiscono su diversi meccanismi di mantenimento della LMA. L'esperienza accumulata sino ad ora con farmaci singoli ci ha insegnato che questo tentativo porta con sé una scarsa possibilità di successo nell'induzione di una remissione e nel suo mantenimento a lungo termine. Ciò è possibilmente dovuto alla grande eterogeneità clonale della LMA e agli innumerevoli meccanismi di sopravvivenza attivi nella cellula leucemica, oltre alla scarsa accessibilità alla nicchia ossea da parte dei farmaci, in cui è portata a mantenersi quiescente attraverso processi di *homing* la cellula staminale ematopoietica, e quindi la sorella staminale leucemica. In particolare, sono attivi trial che combinano idasanutlin e venetoclax, trial che combinano l'inibizione di BCL-2 con agenti demetilanti o inibitori dell'istone-deacetilasi.

È inoltre auspicabile che nella LMA sia dato un maggior ruolo nel prossimo futuro all'inibizione del *checkpoint* immunitario nella terapia *front-line*, nel consolidamento (dove pure lo sfruttamento dell'allo-reattività NK sta dando ottimi risultati) ⁽⁷⁴⁾ e nel mantenimento, e che vengano indagati mezzi farmacologici per colpire la nicchia ossea e rendere vulnerabile la cellula staminale quiescente.

Inoltre, la notevole disponibilità di opzioni terapeutiche che si sta delineando sicuramente rende necessario un impiego razionale dei vari farmaci disponibili. La possibilità di agire su *target* cellulari, marcatori di superficie, epigenetica e modulazione della risposta immune contro il tumore in maniera simultanea apre la strada ai test di combinazioni poli-farmacologiche, più specifiche e meno tossiche della chemioterapia tradizionale.

Testare nuove combinazioni oggi significa andare incontro a com-

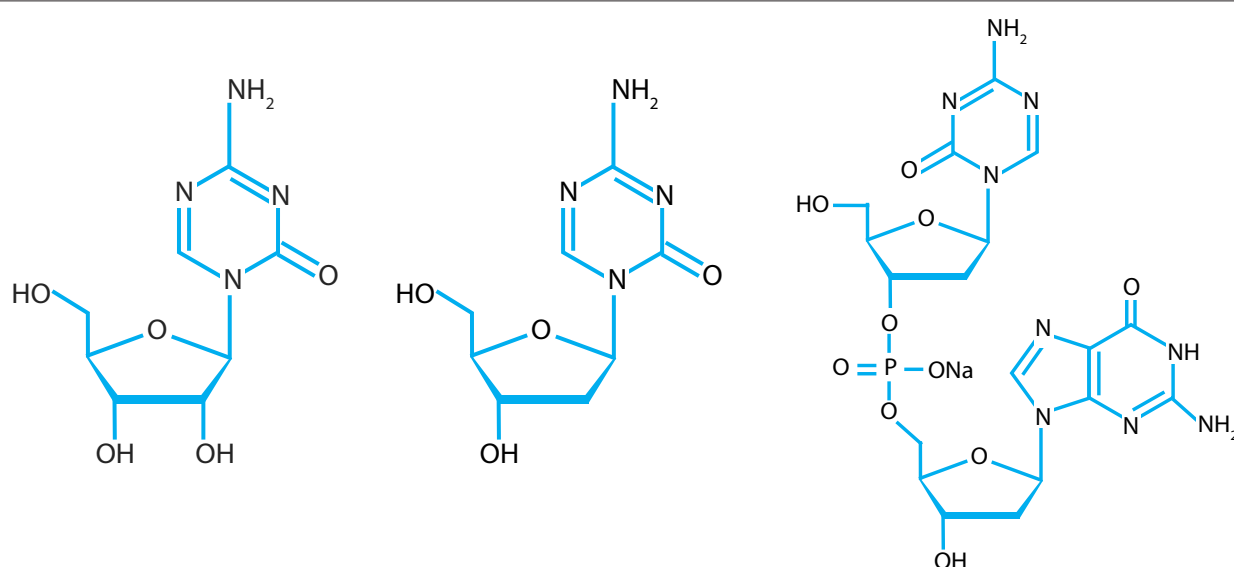


Figura 7 – Struttura dei farmaci demetilanti.

pleSSI iter normativi che non rendono semplice la sperimentazione farmacologica. Sicuramente una strada perseguibile immediatamente per ottimizzare lo sforzo nell'identificare disegni razionali di nuovi studi di associazione è quella proposta da Galluzzi et al.⁽⁷⁵⁾: combinando le evidenze prodotte sul ruolo che i vari farmaci chemioterapici e mirati giocano nei confronti del sistema immunitario si possono disegnare associazioni in cui da un lato si abbia un effetto attivante l'immuno-sorveglianza del sistema immunitario sul tumore, dall'altra si riducano le popolazioni T tollerogeniche e l'induzione di tolleranza al *self* verso gli antigeni tumore specifici⁽⁷⁴⁾.

D'altro canto la vera aspettativa per il futuro è quella di una terapia cucita sullo specifico paziente. Data la mole di farmaci bersaglio disponibili e la conoscenza di biomarkers di attività o non attività di ciascun farmaco mirato, la conoscenza del genoma completo della malattia, di mutazioni germinali, dell'espressione di RNA e proteine delle cellule leucemiche e della presenza di subcloni, oltre che lo stu-

dio dello stato epigenetico, della risposta immune verso il tumore e dell'espressione di antigeni di superficie può descrivere per ogni paziente un profilo ottimale di bersagli da colpire per una combinazione specifica e *tailored*. Inoltre lo studio di fattori di rischio e di determinanti biologici di tossicità in ciascun farmaco è essenziale per predire la risposta ad esso e ad associazioni tra farmaci in uno specifico organismo.

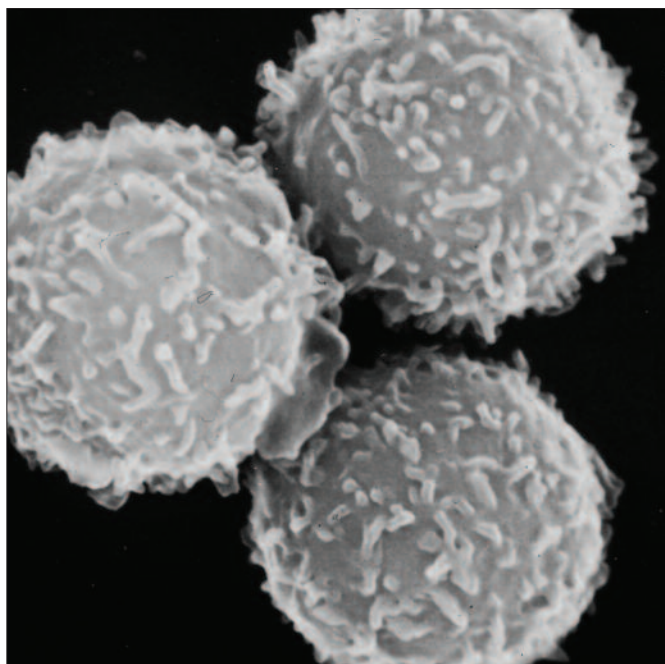
Queste specifiche conoscenze, che dovrebbero essere prodotte nei prossimi anni, nonché ricercate nella grande mole di dati già prodotta, sono il cardine del disegno di una terapia specifica e mirata per ciascun paziente, che minimizzi il rischio e massimizzi la possibilità di remissione. Come la conoscenza è stata portata dal laboratorio al letto del paziente in termini generali per la produzione dei farmaci molecolari, nel prossimo futuro dovremo portare la conoscenza dai dati di laboratorio di ogni specifico malato al suo letto, per impiegare razionalmente e con sicurezza i farmaci disponibili.

Bibliografia

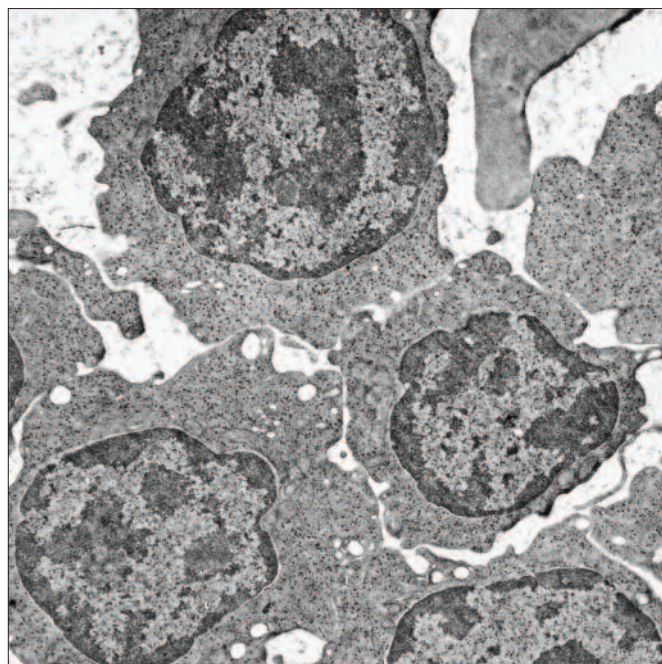
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
- Swerdlow S. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press; 2008.
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079-89.
- Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Hunter AE, Kjeldsen L, Yin J, et al. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council LMA15 trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3360-8.
- Bishop JF, Matthews JP, Young GA, Szer J, Gillett A, Joshua D, et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1996;87(5):1710-7.
- Breems DA, Van Putten WLJ, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Verhoef GEG, Verdonck LF, et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*. 2005;23(9):1969-78.
- 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;119(1):34-43.
- Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2012;87(1):89-99.
- Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113(18):4179-87.
- Crujjsen M, Lübbert M, Wijermans P, Huls G. Clinical Results of Hypomethylating Agents in LMA Treatment. *J Clin Med*. 2014;4(1):1-17.
- Grimwade D, Ivey A, Huntly BJJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2015;127(1):29-41.
- Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(2):111-21.
- Coombs CC, Tavakkoli M, Tallman MS. Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. *Blood Cancer J*. 2015;5(4):e304.
- Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, Gardner MF, Brigham D, Belli B, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2009;114(14):2984-92.
- Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):127-32.
- Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, Manley P, Fabbro D, Meyer T, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell*. 2002;1(5):433-43.
- Fischer T, Stone RM, Deangelo DJ, Galinsky I, Estey E, Lanza C, et al. Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *J Clin Oncol*. 2010;28(28):4339-45.
- Stone RM. The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High-Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients (pts) Age 18-60 with FLT3 Mutations (muts): An International Prospective Randomized (rand) P-Controlled Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). In: ASH Annual Meeting Abstracts. 2015;126(23):6.
- Sexauer A, Perl A, Yang X, Borowitz M, Gocke C, Rajkhowa T, et al. Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by FLT3 inhibition in FLT3/ITD LMA. *Blood*. 2012;120(20):4205-14.
- Bellott R, Auvrignon A, Leblanc T, Pélér 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.
- Martinelli G. Effect of quizartinib (AC220) on response rates and long-term survival in elderly patients with FLT3-ITD positive or negative relapsed/refractory acute myeloid leukemia. In: Asco Annual Meeting Abstract. 2013; J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 7021).
- Cortes JE. Final Results of a Phase 2 Open-Label, Monotherapy Efficacy and Safety Study of Quizartinib (AC220) in Patients ≥ 60 Years of Age with FLT3 ITD Positive or Negative Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. In: ASH Annual Meeting Abstracts. 2012;120(21):48.
- Pemmaraju N, Kantarjian H, Andreeff M, Cortes J, Ravandi F. Investigational FMS-like tyrosine kinase 3 inhibitors in treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014;23(7):943-54.
- Altman JK. Antileukemic Activity and Tolerability of ASP2215 80mg and Greater in FLT3 Mutation-Positive Subjects with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia: Results from a Phase 1/2, Open-Label, Dose-Escalation/Dose-Response Study. In: ASH Annual Meeting Abstracts. 2015;126(23):321.

25. Levis MJ. Results of a first-in-human, phase I/II trial of ASP2215, a selective, potent inhibitor of FLT3/Axl in patients with relapsed or refractory (R/R) acute myeloid leukemia (AML). In: *Asco Annual Meeting Abstract*. 2015; J Clin Oncol. 2015;(suppl 33:A7003).
26. Zimmerman EI, Turner DC, Buaboonnam J, Hu S, Orwick S, Roberts MS, et al. Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(22):3607-15.
27. Galanis A, Ma H, Rajkhowa T, Ramachandran A, Small D, Cortes J, et al. Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood*. 2014;123(1):94-100.
28. Shah NP, Talpaz M, Deininger MWN, Mauro MJ, Flinn IW, Bixby D, et al. Ponatinib in patients with refractory acute myeloid leukaemia: findings from a phase 1 study. *Br J Haematol*. 2013;162(4):548-52.
29. Borthakur G, Kantarjian H, Ravandi F, Zhang W, Konopleva M, Wright JJ, et al. Phase I study of sorafenib in patients with refractory or relapsed acute leukemias. *Haematologica*. 2011;96(1):62-8.
30. Crump M, Hedley D, Kamel-Reid S, Leber B, Wells R, Brandwein J, et al. A randomized phase I clinical and biologic study of two schedules of sorafenib in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: a NCIC (National Cancer Institute of Canada) Clinical Trials Group Study. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(2):252-60.
31. Metzelder SK, Schroeder T, Finck A, Scholl S, Fey M, Götze K, et al. High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses. *Leukemia*. 2012;26(11):2353-9.
32. Richmond J, Carol H, Evans K, High L, Mendo A, Robbins A, et al. Effective targeting of the P53-MDM2 axis in preclinical models of infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2015;21(6):1395-405.
33. Reis B, Jukofsky L, Chen G, Martinelli G, Zhong H, So V, et al. Acute myeloid leukemia patient clinical response to idasanutlin (RG7388) is associated with pre-treatment MDM2 protein expression in leukemic blasts. *Haematologica*. 2016; [Epub ahead of print].
34. Yee K. Phase 1/1b Study of RG7388, a Potent MDM2 Antagonist, in Acute Myelogenous Leukemia (LMA) Patients (Pts). In: *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2014;124(21):116.
35. Gibson CJ, Davids MS. BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2015;21(22):5021-9.
36. Pan R, Hogdal LJ, Benito JM, Bucci D, Han L, Borthakur G, et al. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov*. 2014;4(3):362-75.
37. DiNardo C, Pollyea D, Pratz K, Thirman MJ, Anthony Letai, Frattini M, et al. Phase 1b study of venetoclax (ABT-199/GDC-0199) in combination with decitabine or azacitidine in treatment-naïve patients with acute myelogenous leukemia who are ≥ 65 years and not eligible for standard induction therapy. In: *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):327.
38. Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla BJ, Busman T, McKeegan E, et al. A Phase 2 Study of ABT-199 (GDC-0199) in Patients with Acute Myelogenous Leukemia (LMA). *Blood*. 2014;124(21):118.
39. Kadia TM, Ravandi F, Cortes J, Kantarjian H. New Drugs in Acute Myeloid Leukemia (LMA). *Ann Oncol*. 2016; 27(5):770-8.
40. Stein EM, DiNardo C, Altman JK, Collins R, DeAngelo DJ, Kantarjian HM, et al. Safety and Efficacy of AG-221, a Potent Inhibitor of Mutant IDH2 That Promotes Differentiation of Myeloid Cells in Patients with Advanced Hematologic Malignancies: Results of a Phase 1/2 Trial. In: *ASH Annual Meeting Abstract*. 2015;126(23):323.
41. Stein EM, Altman JK, Collins R, DeAngelo DJ, Fathi AT, Flinn I, et al. AG-221, an Oral, Selective, First-in-Class, Potent Inhibitor of the IDH2 Mutant Metabolic Enzyme, Induces Durable Remissions in a Phase I Study in Patients with IDH2 Mutation Positive Advanced Hematologic Malignancies. In: *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2014;124(21):115.
42. Khan AA, Harrison CN, McLornan DP. Targeting of the Hedgehog pathway in myeloid malignancies: still a worthy chase? *Br J Haematol*. 2015;170(3):323-35.
43. Amadori S, Stasi R, Martelli AM, Venditti A, Meloni G, Pane F, et al. Temsirolimus, an mTOR inhibitor, in combination with lower-dose clofarabine as salvage therapy for older patients with acute myeloid leukaemia: results of a phase II GIMEMA study (LMA-1107). *Br J Haematol*. 2012;156(2):205-12.
44. Bullinger L, Schlenk RF, Götze M, Botzenhardt U, Hofmann S, Russ AC, et al. PRAME-induced inhibition of retinoic acid receptor signaling-mediated differentiation—a possible target for ATRA response in LMA without t(15;17). *Clin Cancer Res*. 2013; 19(9):2562-71.
45. Sakamoto K, Imamura T, Yano M, Yoshida H, Fujiki A, Hirashima Y, et al. Sensitivity of MLL-rearranged LMA cells to all-trans retinoic acid is associated with the level of H3K4me2 in the RAR promoter region. *Blood Cancer J*. 2014;4:e205.
46. Martelli MP, Gionfriddo I, Mezzasoma F, Milano F, Pierangeli S, Mulas F, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated LMA cells. *Blood*. 2015;125(22):3455-65.
47. Döhner H, Lübbert M, Fiedler W, Fouillard L, Haaland A, Brandwein JM, et al. Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in LMA patients not suitable for induction therapy. *Blood*. 2014;124(9):1426-33.
48. Attar EC, Johnson JL, Amrein PC, Lozanski G, Wadleigh M, DeAngelo DJ, et al. Bortezomib added to daunorubicin and cytarabine during induction therapy and to intermediate-dose cytarabine for consolidation in patients with previously untreated acute myeloid leukemia age 60 to 75 years: CALGB (Alliance) study 10502. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):923-9.
49. Coudé M-M, Braun T, Berrou J, Dupont M, Bertrand S, Masse A, et al. BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells. *Oncotarget*. 2015;6(19):17698-712.
50. Dombret H. A Phase 1 Study of the BET-Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Advanced Acute Leukemia. In: *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2014;124(21):117.
51. Mould DP, McGonagle AE, Wiseman DH, Williams EL, Jordan AM. Reversible inhibitors of LSD1 as therapeutic agents in acute myeloid leukemia: clinical significance and progress to date. *Med Res Rev*. 2015;35(3):586-618.
52. Bruserud Ø, Nepstad I, Hauge M, Hatfield KJ, Reikvam H. STAT3 as a possible therapeutic target in human malignancies: lessons from acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2015;8(1):29-41.
53. Allegretti M, Ricciardi MR, Licchetta R, Mirabili S, Orecchioni S, Reggiani F, et al. The pan-class I phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor NVP-BKM120 demonstrates anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia. *Sci Rep*. 2015;5:18137.
54. Brenner AK, Reikvam H, Lavecchia A, Bruserud Ø. Therapeutic targeting the cell division cycle 25 (CDC25) phosphatases in human acute myeloid leukemia—the possibility to target several kinases through inhibition of the various CDC25 isoforms. *Molecules*. 2014;19(11):18414-47.
55. Li X, Xu SN, Qin DB, Tan Y, Gong Q, Chen JP. Effect of adding gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia: a meta-analysis of prospective randomized phase III trials. *Ann Oncol*. 2014;25(2):455-61.
56. Thol F, Schlenk RF. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia revisited. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14(8):1185-95.
57. Daver N, Kantarjian H, Ravandi F, Estey E, Wang X, Garcia-Manero G, et al. A phase II study of decitabine and gemtuzumab ozogamicin in newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2016;30(2):268-73.
58. Laszlo GS, Estey EH, Walter RB. The past and future of CD33 as therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood Rev*. 2014;28(4):143-53.
59. Walter RB. Biting back: BiTE antibodies as a promising therapy for acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(3):317-9.
60. Kenderian SS, Ruella M, Shestova O, Klichinsky M, Aikawa V, Morrisette JJD, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(8):1637-47.
61. Sapienza MR, Fuligni F, Agostinelli C, Tripodo C, Righi S, Luginestra MA, et al. Molecular profiling of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm reveals a unique pattern and suggests selective sensitivity to NF- κ B pathway inhibition. *Leukemia*. 2014;28(8):1606-16.
62. Liu K, Zhu M, Huang Y, Wei S, Xie J, Xiao Y. CD123 and its potential clinical application in leukemias. *Life Sci*. 2015;122:59-64.
63. He SZ, Busfield S, Ritchie DS, Hertzberg MS, Durrant S, Lewis ID, et al. A Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics and anti-leukemic activity of the anti-

- CD123 monoclonal antibody CSL360 in relapsed, refractory or high-risk acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(5):1406-15.
64. Al-Hussaini M, Rettig MP, Ritchey JK, Karpova D, Uy GL, Eissenberg LG, et al. Targeting CD123 in acute myeloid leukemia using a T-cell-directed dual-affinity retargeting platform. *Blood*. 2016;127(1):122-31.
 65. Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, Brown CE, Wang X, Budde LE, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(18):3138-48.
 66. Tettamanti S, Biondi A, Biagi E, Bonnet D. CD123 LMA targeting by chimeric antigen receptors: A novel magic bullet for LMA therapeutics? *Oncoimmunology*. 2014;3:e28835.
 67. Orozco JJ, Balkin ER, Gooley TA, Kenoyer A, HLMaIn DK, Wilbur DS, et al. Anti-CD45 radioimmunotherapy with 90Y but not 177Lu is effective treatment in a syngeneic murine leukemia model. *PLoS One*. 2014;9(12):e113601.
 68. Orozco JJ, Bäck T, Kenoyer A, Balkin ER, HLMaIn DK, Wilbur DS, et al. Anti-CD45 radioimmunotherapy using (211)At with bone marrow transplantation prolongs survival in a disseminated murine leukemia model. *Blood*. 2013;121(18):3759-67.
 69. Anani L, Coffre C, Binet C, Degenne M, Domenech J, Hérault O. Expression of CD157 and CD38 antigens on human myeloid leukaemia cells: a similar pattern of modulation with differentiating inducers. *Acta Haematol*. 2001;105(4):249-51.
 70. Kon Kim T, Gore SD, Zeidan AM. Epigenetic Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current and Future Directions. *Semin Hematol*. 2015;52(3):172-83.
 71. Chang M-J, Wu H, Achille NJ, Reisenauer MR, Chou C-W, Zeleznik-Le NJ, et al. Histone H3 lysine 79 methyltransferase Dot1 is required for immortalization by MLL oncogenes. *Cancer Res*. 2010;70(24):10234-42.
 72. Garcia-Manero G. Pracinostat in Combination with Azacitidine Produces a High Rate and Rapid Onset of Disease Remission in Patients with Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia (AML). In: *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2014;124(21):947.
 73. Tan P, Wei a, Mithraprabhu S, Cummings N, Liu HB, Perugini M, et al. Dual epigenetic targeting with panobinostat and azacitidine in acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood Cancer J*. 2014;4:e170.
 74. Ruggeri L, Parisi S, Urbani E, Curti A. Alloreactive Natural Killer Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: From Stem Cell Transplantation to Adoptive Immunotherapy. *Front Immunol*. 2015;6:479.
 75. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*. 2015;28(6):690-714.



LMA: blasti mieloidi al ME a scansione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



LMA: blasti mieloidi al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).

Parole Chiave

Anticorpi monoclonali, leucemia acuta mieloide; terapia mirata

Indirizzi per la corrispondenza

Giovanni Martinelli

Tel: +39 3487704650

E-mail: giovanni.martinelli2@unibo.it

Si ringraziano

ELN, AIL, AIRC, PRIN, progetto Regione-Università 2010-12 (L. Bolondi), FP7 NGS-PTL

ESSERCI.

I momenti di ogni giorno fanno una vita. Celgene sviluppa terapie contro il mieloma multiplo da somministrare a casa. Per avere anche il tempo di vivere.

celgene.com

Improving the lives of patients worldwide.



Leucemia acuta linfoide



*Monica Messina, Anna Lucia Fedullo, Valentina Gianfelici,
Sara Grammatico, Anna Guarini, Robin Foà, Sabina Chiaretti*

Ematologia, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, "Sapienza" Università di Roma

Introduzione

La prognosi della leucemia acuta linfoblastica (LAL) è andata negli anni migliorando progressivamente nei casi pediatrici, al punto che oggi si parla di guarigioni in oltre l'80% dei bambini ^(1,2). Al contrario, i risultati negli adulti sono significativamente inferiori a quelli conseguiti nelle casistiche pediatriche: infatti, sebbene circa l'80-90% dei casi ottenga la remissione completa (RC), la sopravvivenza libera da malattia (DFS) rimane ancora largamente insoddisfacente, raggiungendo il 40-50% a 5 anni ^(3,4).

Il miglioramento della prognosi nell'età pediatrica è dovuto soprattutto all'introduzione di regimi multichemioterapici, ad una prolungata fase di mantenimento e ad un'adeguata profilassi del sistema nervoso centrale (SNC). Inoltre, gli attuali approcci terapeutici contemplano la stratificazione in diversi gruppi di rischio basata sulle caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti, quali ad esempio la conta dei globuli bianchi alla diagnosi ($\geq 30.000/\mu\text{l}$ nelle LAL-B e $\geq 100.000/\mu\text{l}$ nelle LAL-T), l'età (≥ 10 anni) e la presenza di riarrangiamenti di significato prognostico (cromosoma Philadelphia-Ph/BCR-ABL1, TCF3-PBX1, ETV6-RUNX1 e riarrangiamenti del gene MLL, r-MLL), nonché sulla risposta alla chemioterapia iniziale. La risposta alla chemioterapia iniziale è quantificata dall'entità della malattia minima residua (MMR) ⁽⁵⁻⁸⁾, che costituisce oggi il principale parametro prognostico. Complessivamente, tali fattori consentono di riconoscere pazienti ad alto rischio e quindi intensificare la terapia.

Approcci simili sono stati estesi negli ultimi anni anche al trattamento dei giovani adulti.

In aggiunta, l'avanzamento delle conoscenze ha aperto nuove prospettive terapeutiche che hanno rivoluzionato l'approccio ad alcuni sottogruppi di pazienti e che hanno portato ad importanti miglioramenti nella prognosi. I due esempi più eclatanti sono la LAL di tipo Burkitt e la LAL Ph+, sottogruppi che nel passato si associavano a prognosi estremamente sfavorevole. Nel caso della LAL di tipo Burkitt, l'introduzione di regimi chemioterapici intensivi e ravvicinati nel tempo unitamente all'impiego dell'anticorpo monoclonale

(AcMo) anti-CD20 - che riconosce il CD20 espresso da tutte le cellule leucemiche - hanno migliorato significativamente i tassi di sopravvivenza. Nel caso della LAL Ph+, gli inibitori di tirosin chinasi (TKI) diretti contro la proteina di fusione leucemogenica BCR-ABL1 hanno radicalmente modificato tanto la gestione quanto la prognosi di questi pazienti. Infine, il miglioramento della conoscenza delle basi molecolari della LAL, grazie a metodiche di biologia molecolare d'avanguardia, ha consentito di identificare nuovi sottogruppi di LAL e le alterazioni che li caratterizzano, tanto alla diagnosi che alla recidiva di malattia ⁽⁹⁾.

Tali progressi stanno non solo arricchendo la classificazione della LAL, ma anche ampliando il panorama delle lesioni bersaglio e quindi dei pazienti che potrebbero beneficiare di terapie mirate. Infatti, nonostante l'estrema complessità genetica, i numerosi sottotipi di LAL si possono raggruppare sulla base delle terapie bersaglio disponibili. Sia nell'ambito delle LAL-B (75-80% dei casi adulti, 85-90% dei casi pediatrici) che delle LAL-T (20-25% negli adulti, 10-15% nei casi pediatrici) vi sono sottogruppi di pazienti il cui approccio potrebbe essere migliorato dall'uso dei TKI, altri che potrebbero giovare di farmaci che inibiscono le vie del segnale di RAS e JAK/STAT, e altri ancora caratterizzati da alterazioni di geni coinvolti nei meccanismi epigenetici, altro promettente bersaglio terapeutico.

In questo capitolo passeremo in rassegna i farmaci bersaglio attualmente in uso nelle LAL. Descriveremo, inoltre, quali sottogruppi potrebbero giovare in futuro di nuove terapie mirate e come questi progressi si stiano trasferendo dal laboratorio alla sperimentazione clinica.

LAL di tipo Burkitt

La LAL di tipo Burkitt rappresenta circa l'1-5% delle LAL; è caratterizzata da una morfologia peculiare (sottotipo L3 della classificazione FAB) ^(10,11), così come da un immunofenotipo che riflette lo stadio di maturazione terminale della cellula B (positività per CD19, CD20, CD22, CD79a, CD10 e sIgM, e negatività per TdT, CD5 e CD23) ⁽¹²⁾. Inoltre, l'analisi cariotipica mostra la presenza di riar-

rangimenti tra la regione 8q24 ed il locus delle catene pesanti delle Ig nella regione 14q32, o, più raramente, il locus delle catene leggere κ (2p12) o λ (22q11). Tali riarrangiamenti determinano una deregolazione ed iperespressione del protooncogene c-MYC⁽¹³⁾. Inoltre, l'attivazione di PI3K e delle chinasi ciclico-dipendenti concorre, insieme a c-MYC, ad incrementare la progressione e la crescita cellulare⁽¹⁴⁾.

Le cellule leucemiche di questo sottogruppo sono altamente proliferanti e tendono ad invadere sedi extranodali, tra cui il SNC. L'alta frazione di crescita favorisce l'entrata nel ciclo cellulare di cellule vitali residue tra i cicli di chemioterapia ed è responsabile dello sviluppo di resistenza. La prognosi di questi pazienti è nettamente migliorata grazie all'introduzione di trattamenti intensivi e di breve durata per minimizzare i tempi tra un ciclo e l'altro e alla profilassi intratecale⁽¹⁵⁾. Un ulteriore miglioramento è stato ottenuto grazie all'aggiunta dell'AcMo anti-CD20 (rituximab) alla terapia. Il razionale di questo approccio risiede negli alti livelli di espressione dell'antigene CD20 sui blasti leucemici^(16,17).

Ad oggi, con questo schema immunochemioterapico, le percentuali di RC sono dell'80-90%, a seconda della fascia di età, e la sopravvivenza globale (OS) è superiore al 90% nell'adolescente, dell'84%

nei giovani adulti e del 64% negli adulti (>50 anni)^(17,18).

LAL-B Ph+

Il cromosoma Philadelphia rappresenta la prima aberrazione cromosomica identificata in campo oncologico. È generato da una traslocazione tra i cromosomi 9 e 22, t(9;22)(q34;q11.2), che porta alla giustapposizione di due geni - BCR e ABL1 - formando il gene di fusione BCR-ABL1⁽¹⁹⁾. Il riarrangiamento BCR-ABL1 è presente nel 95% dei casi di leucemia mieloide cronica (LMC), nel 3-5% delle LAL del bambino e nel 25-30% dei casi di LAL dell'adulto; inoltre, l'incidenza di questa aberrazione tende ad incrementare con l'età, fino ad essere presente in circa il 50% dei casi dell'adulto oltre la 5^a decade di vita⁽²⁰⁾. I pazienti LAL Ph+ possono presentare un elevato numero di globuli bianchi all'esordio, associato a blastosi periferica, e spesso mostrano marcatori della linea mieloide⁽²¹⁾.

A seconda del punto di rottura all'interno del gene BCR si possono formare almeno 3 differenti trascritti di fusione, i.e. p190 (e2a2), p210 (b2a2, b3a2) e p230 (Figura 1). Il trascritto p210 si riscontra principalmente nella LMC ed in un terzo delle LAL Ph+, mentre due terzi dei pazienti LAL Ph+ hanno la proteina di fusione p190;

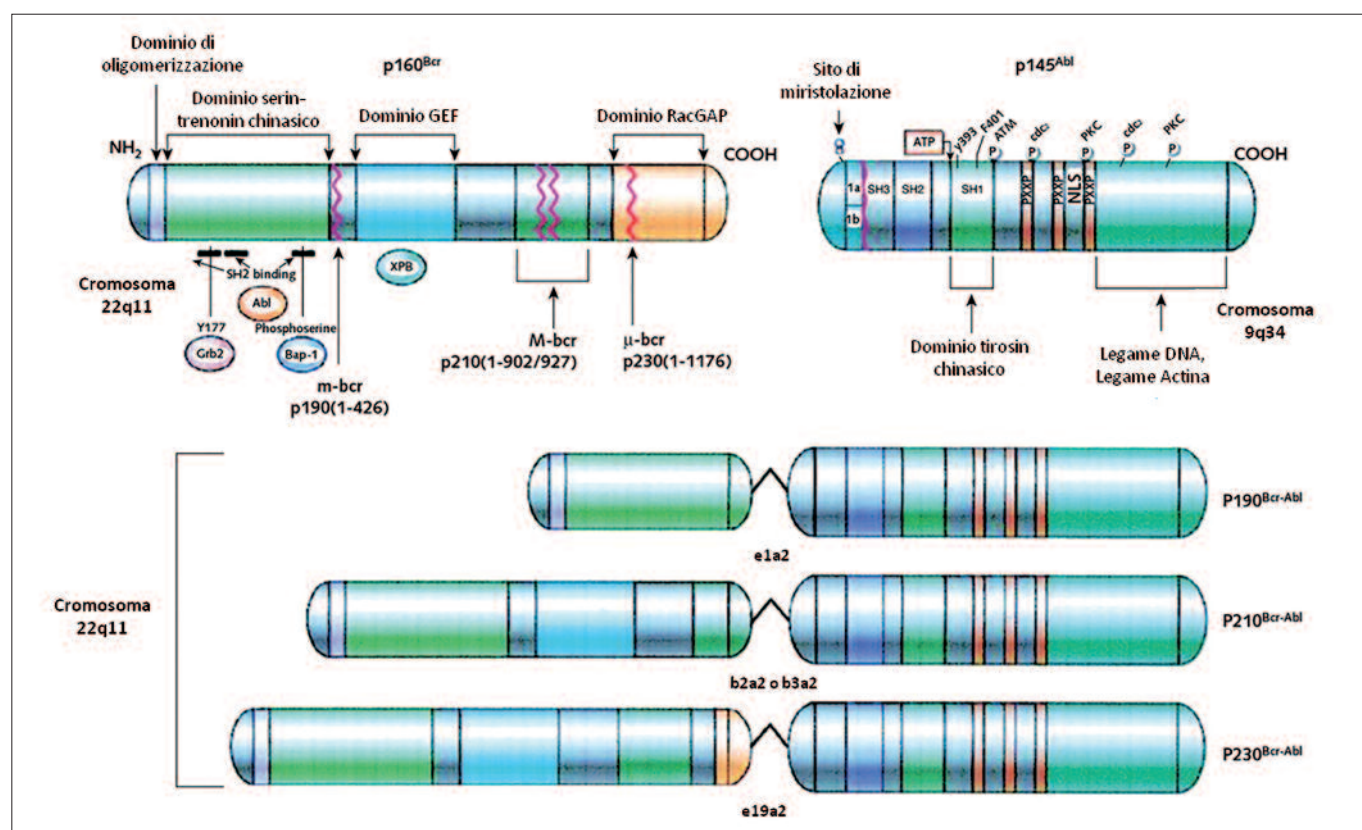


Figura 1 – Le proteine BCR e ABL e i diversi trascritti di fusione BCR-ABL1. La proteina BCR ha diversi siti funzionali: un dominio serin-treonin chinasi, un dominio GEF, un dominio GAP e un sito di legame SH2. La proteina associata a BCR (Bap-1) interagisce col sito SH2 più distale. GRB2 si associa al sito di legame SH2 più prossimale tramite la tirosina 177. ABL si lega al secondo e terzo sito per SH2. Il dominio GEF interagisce con la proteina di riparo del DNA, XPB. La proteina ABL contiene tre domini SH al suo N-terminale. La tirosina nella posizione 393 (Y393) è il sito principale di autofosforilazione. La regione C-terminale contiene siti di legame al DNA, siti di legame con l'actina e segnali di esportazione e localizzazione nucleare. Le linee fucsia indicano i punti di rottura. In basso, sono rappresentate le 3 isoforme della proteina BCR-ABL ed i diversi punti di fusione⁽¹⁹⁾.

infine, la proteina p230, più rara, è stata trovata nella leucemia neutrofilica cronica ⁽¹⁹⁾.

La proteina di fusione BCR-ABL1: funzione

Le tirosin chinasi (TK) sono una classe di proteine implicate nel trasferimento di gruppi fosfato dall'ATP a residui di tirosina di proteine specifiche. Alcuni cambiamenti dovuti a mutazioni geniche possono portare a una loro aumentata attività, causando proliferazione cellulare incontrollata e resistenza agli stimoli apoptotici ⁽²²⁾.

La proteina ABL1 è un enzima tirosin chinasi non recettoriale che può spostarsi dal nucleo, dove si lega al DNA, al citoplasma, dove lega l'actina del citoscheletro. La fosforilazione da parte di ABL1 è strettamente controllata dai suoi domini N-terminali. La perdita di questa regione (come avviene in seguito alla formazione di BCR-ABL1) risulta in un'elevata attività chinasi, un fattore chiave per l'oncogenicità.

In maniera simile, la proteina BCR risiede sia nel nucleo che nel citoplasma. Ha due importanti funzioni: la fosforilazione ed il legame della guanosina trifosfato (GTP). Il primo esone del gene ha attività serin-treonin chinasi ed è essenziale per l'oncogenesi; infatti, è l'unico esone di BCR incluso in tutte le proteine di fusione BCR-ABL1. BCR può indurre sia autofosforilazione che fosforilazione di altri substrati e quindi diffondere i segnali cellulari.

La proteina BCR-ABL1 è una TK costitutivamente attiva localizzata principalmente nel citoplasma, dove esercita il proprio ruolo trasformante tramite l'attivazione delle vie del segnale di RAS, PI3K/AKT ed ERK; inoltre, BCR-ABL1 induce un aumento della sopravvivenza, probabilmente tramite l'*up*-regolazione di BCL2, che svolge azione inibitoria dell'apoptosi, e la *down*-modulazione di BAD, che promuove la morte cellulare programmata. Infatti, linee cellulari positive per BCR-ABL1 sono resistenti alla morte cellulare programmata indotta dal danno al DNA. Inoltre, BCR-ABL1 agisce su specifici substrati intracellulari causando un'alterazione della struttura del citoscheletro, con conseguente alterazione delle molecole di adesione interne ed esterne alla cellula ⁽²³⁾.

Gli inibitori di BCR-ABL1

Prima dell'avvento dei TKI, la presenza del cromosoma Ph+ era inevitabilmente associata ad un'alta percentuale di fallimenti terapeutici e di recidive in tutte le fasce d'età, con una OS a 5 anni inferiore al 5% nell'età adulta, ove non fosse possibile effettuare un trapianto allogenico di cellule staminali (allo-TMO).

L'introduzione dei TKI, somministrati con o senza chemioterapia sistemica durante le fasi di induzione della terapia, ha nettamente migliorato la gestione e la prognosi di questi pazienti: infatti, attualmente più del 90% dei casi raggiunge una remissione ematologica completa e la DFS si aggira intorno al 40-50% a 4-5 anni ⁽²⁴⁾.

Esistono due distinti meccanismi di inibizione delle TK: gli inibitori

di tipo I competono direttamente con l'ATP nel suo sito di legame e si legano alla conformazione attiva della proteina, costituita dai residui Asp-Phe-Gly (anche detta inibizione DFG-in); gli inibitori di tipo II si legano invece ad un sito di legame adiacente a quello dell'ATP e legano la conformazione inattiva (anche detta inibizione DFG-out) (Figura 2A) ⁽²⁵⁾.

Imatinib (Gleevec) è stato il primo farmaco capace di inibire direttamente l'attività catalitica di BCR-ABL1, inserendosi nella tasca di legame dell'ATP e bloccando la proteina in una conformazione inattiva; tale interazione impedisce la fosforilazione delle proteine responsabili della trasduzione del segnale intracellulare, con conseguente inibizione della proliferazione ed apoptosi delle cellule leucemiche (Figura 2B) ⁽²²⁾. Un limite dell'imatinib consiste nella sua ridotta capacità di penetrare la barriera ematoencefalica, non risultando quindi efficace nella profilassi e/o nel trattamento del SNC, quando coinvolto ⁽²⁶⁾. Dal punto di vista clinico, le reazioni avverse più comuni sono rappresentate da ritenzione idrica, edema, rash cutaneo, nausea, diarrea ed alterazioni del QTc ^(19,27).

Sono stati descritti diversi meccanismi di resistenza all'imatinib che possono essere suddivisi in:

- meccanismi dipendenti da BCR-ABL1, i.e. amplificazione o sovraespressione di BCR-ABL1, o mutazioni puntiformi nel dominio chinasi di ABL1, che interferiscono con il legame dell'imatinib;
- meccanismi indipendenti da BCR-ABL1, che includono ad esempio l'aumento dell'efflusso del farmaco e l'attivazione di altre vie di segnale a valle o parallele che promuovono la proliferazione e la sopravvivenza ⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Al fine di superare queste difficoltà, nell'ultima decade sono stati sviluppati inibitori di seconda e terza generazione attivi anche contro le forme mutanti e verso altre chinasi e testati a livello pre-clinico e clinico.

Il dasatinib (Sprycel) è un inibitore *multi-target* delle TK di seconda generazione in quanto è attivo contro le chinasi BCR-ABL1, SFKs, PDGFR e KIT. Anch'esso compete per il sito di legame dell'ATP, come l'imatinib, ma a differenza di quest'ultimo riesce a legarsi sia alla conformazione attiva che a quella inattiva di BCR-ABL1.

In vitro, il dasatinib è 325 volte più potente dell'imatinib nel legare la forma *wild-type* di BCR-ABL1 e riesce ad inibire la proliferazione e l'attività chinasi di molte mutazioni, eccetto la mutazione T315I. Il dasatinib inoltre è in grado di diminuire i livelli di STAT5 fosforilato. Questo gene è cruciale per la vitalità e la proliferazione delle cellule leucemiche. L'inibizione di STAT5 porta al blocco del ciclo cellulare tra la fase G0/G1 e l'apoptosi delle cellule leucemiche. Inoltre, sono stati osservati ridotti livelli di espressione di alcuni target di STAT5 - come BCL2L1, MCL1 e CCDN1 - che sono correlati alla progressione del cancro ⁽²²⁾. In uno studio del 2010, Ravandi et al. hanno dimostrato che il trattamento con dasatinib in combina-

zione con *hyper*-CVAD consente di ottenere una risposta completa nel 94% dei pazienti ⁽³¹⁾. Foà et al. nel 2011 hanno dimostrato che pazienti adulti affetti da LAL Ph+ trattati con dasatinib in combinazione con steroidi (e senza chemioterapia sistemica) ottengono una risposta completa nel 100% dei casi ⁽³²⁾. Più recentemente, Chiarotti et al., hanno dimostrato che il dasatinib, in combinazione con steroidi, è in grado di indurre remissioni molecolari complete in circa il 20% dei pazienti ⁽³³⁾.

Questi risultati sottolineano l'efficacia del dasatinib, in combinazione con gli steroidi e/o la chemioterapia, come terapia di induzione nelle LAL Ph+ ⁽²²⁾; inoltre, a differenza dell'imatinib, il dasatinib è in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica. Questo inibitore è generalmente ben tollerato, ma eventi di mielosoppressione sono comuni, specialmente nelle fasi avanzate. Effetti collaterali non-ematologici includono diarrea, nausea, cefalea, versamento pleurico e/o pericardico, rash cutaneo e fatica ⁽³⁴⁾.

Il nilotinib (Tasigna) è un derivato dell'imatinib con un'aumentata e selettiva affinità di legame per la tasca dell'ATP di BCR-ABL1. Anch'esso lega la conformazione inattiva di BCR-ABL1, ma la sua attività inibitoria *in vitro* è 20-50 volte più elevata rispetto all'imatinib. È attivo nei confronti della maggior parte delle mutazioni, con

l'eccezione della T315I e delle mutazioni del P-loop ^(22,25,35). Dati di laboratorio hanno dimostrato che l'inibizione con nilotinib è associata all'induzione dell'apoptosi. Questo farmaco inibisce selettivamente le chinasi BCR-ABL1, KIT e PDGFR ⁽²²⁾.

Il nilotinib è efficace e ben tollerato nei pazienti resistenti all'imatinib, soprattutto nei casi con LMC ⁽²⁵⁾. Eventi avversi correlati all'uso del nilotinib comprendono principalmente trombocitopenia, neutropenia, dolori addominali, reazioni cutanee, allergia e mialgia ⁽³⁶⁾. Un altro inibitore di seconda generazione, il bosutinib (SKI606), è efficace nei pazienti LAL Ph+ resistenti o intolleranti all'imatinib. È attivo verso le mutazioni Y253F, E255K e D276G, ma non verso la T315I. A differenza del dasatinib non inibisce significativamente KIT o PDGFR. In aggiunta alla sua attività inibitrice verso le chinasi BCR-ABL1 e SRC, il bosutinib agisce anche verso le chinasi della famiglia TEC che hanno un ruolo importante nella regolazione delle funzioni immunitarie, ed in particolar modo BTK ⁽²²⁾. Il principale effetto collaterale è la diarrea, mentre la mielosoppressione avviene solitamente nelle fasi avanzate ⁽³⁷⁾.

Infine, nel 2012 la Food and Drug Administration ha approvato l'uso nella pratica clinica dell'inibitore di terza generazione ponatinib (Iclusig) per il trattamento dei pazienti affetti da LMC e LAL Ph+ resi-

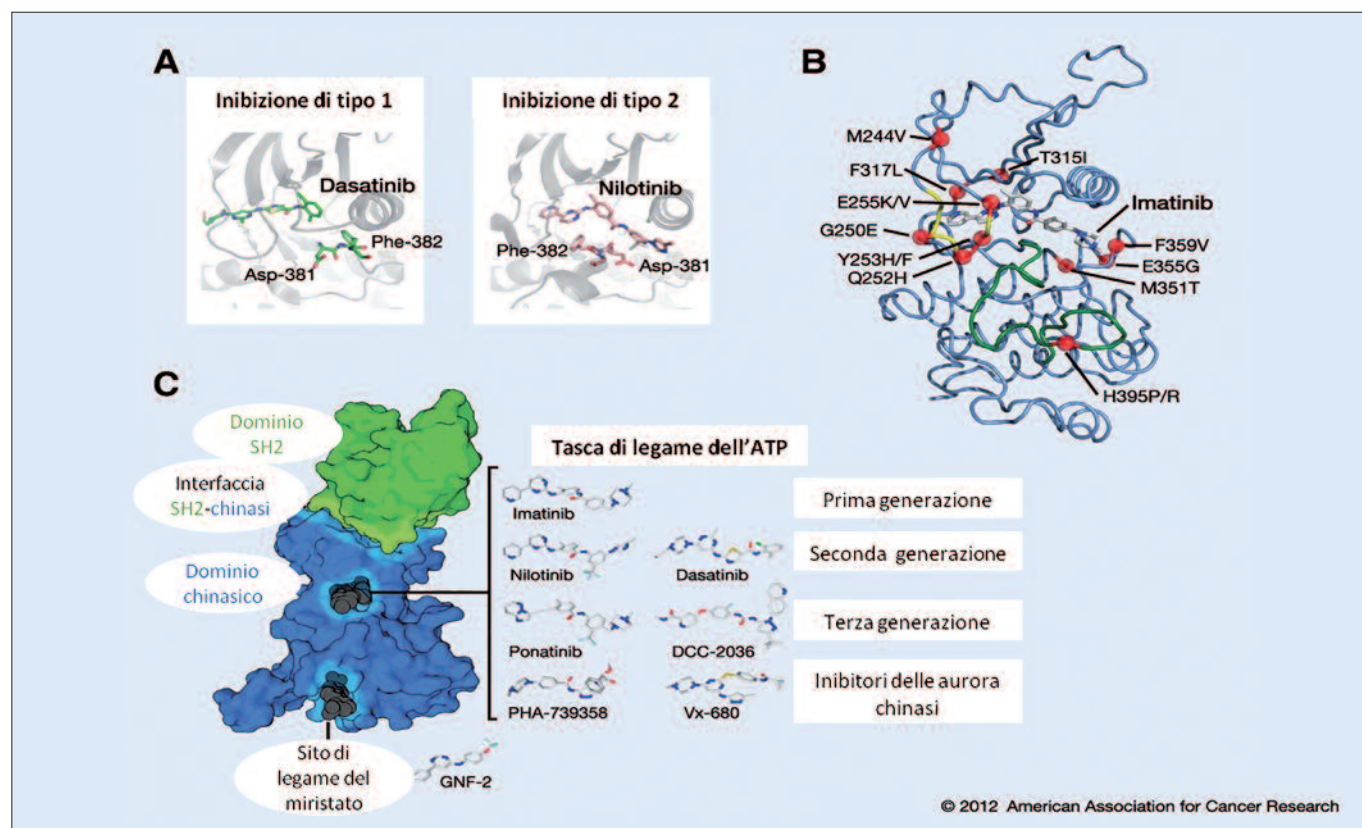


Figura 2 – Mutazioni, inibitori e siti target di BCR-ABL1. **A)** Complesso di tipo 1 vs complesso di tipo 2 degli inibitori delle chinasi. I residui di Asp-381 e Phe-382 del motivo DFG sono mostrati secondo il modello a bastoncini. Da notare la differente posizione delle catene laterali dell'Asp e della Phe, ruotate di 180° tra il complesso di tipo 1 e il complesso di tipo 2. **B)** Struttura del dominio chinasi di Abl legato all'Imatinib [Protein Data Base (PDB) entry 1OPJ]. Il loop di attivazione è mostrato in verde, il loop ricco in Gly è mostrato in giallo e la posizione delle mutazioni che causano resistenza è mostrata in rosso. **C)** Rappresentazione del dominio chinasi e del dominio SH2 di BCR-ABL. Il dominio chinasi è rappresentato in blu ed il dominio SH2 è rappresentato in verde (PDB entry 1OPL chain B). Sono mostrati inoltre i principali siti di legame dei farmaci: la tasca di legame dell'ATP, il sito di legame del mirastato e l'interfaccia SH2-chinasi ⁽²⁹⁾.

FARMACO	IMATINIB	DASATINIB	NILOTINIB	BOSUTINIB	PONATINIB
Tipo di inibitore	TKI	TKI	TKI	TKI	TKI
Conformazione di BCR-ABL1 a cui si lega	Inattiva	Attiva-Inattiva	Inattiva	Intermedia	Inattiva
Specificità chinasica	Abl, PDGFR, KIT	Abl, Src chinasi (SRC, YES, FYN, LYN), KIT, PDGFR, BMX, EPH chinasi, VEGFR, TIE2	Abl, PDGFR, KIT	ABL, SRC, TEC	Abl, FLT3, FGFR, VEGFR, KIT, PDGFR, RET, EPH, Src chinasi
Dose standard in 1ª linea	600 mg/die	140 mg/die	300 mg/die	Non nota	Non nota
Dose in IIª linea	300-400 mg/die BID	70 mg BID o 140 mg/die	400 mg BID	500 mg/die	45 mg/die
IC50	260-679	0,8-1,8	10-25	42	0,5
Reazioni avverse/tossicità	Ritenzione di liquidi, edema, rash cutaneo, allungamento QTc	Trombocitopenia, versamenti pleurici	Rash cutaneo, aumento dei livelli di glucosio, bilirubina e lipasi	Diarrea, nausea, aumento AST e ALT	Aumento dei livelli pressori, trombocitopenia, rash cutaneo, possibili fenomeni trombotici, aumento dei livelli di lipasi
Abbreviazioni: TKI, Inibitore di tirosin chinasi.					

Tabella 1 – Farmaci approvati per il trattamento della LAL. Vengono riportati specificità chinasica, effetti avversi e tossicità ⁽³⁸⁾.

stenti o intolleranti agli inibitori di prima e seconda generazione ⁽³⁸⁾. Il ponatinib è un pan-TKI in quanto è attivo sia verso le forme *wild-type* che mutanti di BCR-ABL1 (inclusa la mutazione T315I), sia verso altre chinasi come FLT3, FGF, VEGF, PDGF e KIT ⁽²²⁾. Uno studio recente su 37 pazienti di nuova diagnosi, condotto dal gruppo dell'MD Anderson Cancer Center ha prodotto risultati preliminari estremamente promettenti, sebbene vada sottolineato che sono stati registrati 6 decessi in remissione ⁽³⁹⁾.

La Tabella 1 riassume le principali caratteristiche dei farmaci approvati per il trattamento della LAL Ph+.

Mutazioni di BCR-ABL1

Come accennato nel paragrafo precedente, la riattivazione della funzione chinasica di BCR-ABL1 è spesso associata all'insorgenza di mutazioni puntiformi nel dominio chinasico di ABL1 che indeboliscono il legame con i TKI e pertanto causano resistenza ai farmaci; tali mutazioni alterano i residui amminioacidici nel sito di legame dell'inibitore o prevengono il raggiungimento della conformazione necessaria per il legame con il farmaco. Sono state descritte più di 50 mutazioni; in particolare, la T315I conferisce resistenza completa a tutti i TKI tranne il ponatinib ed è considerata un indicatore di prognosi sfavorevole ^(22,25,40-42). Generalmente, queste mutazioni si verificano all'interno di una delle 4 regioni del dominio chinasico: il sito di contatto (T315I, F317L), il sito di legame SH2 (M315T), l'ATP binding loop o P-loop (Y253 e E255) e l'A-loop (H396P).

Nel 75% dei casi resistenti all'imatinib, le mutazioni più frequenti sono la T315I, E255K e Y253H. Al dosaggio del farmaco (600 mg/die e in alcuni casi 800 mg/die) è stata imputata l'insorgenza delle mutazioni, ma il fatto che possano essere rilevate molte mutazioni diverse dimostra che un'elevata instabilità genomica potrebbe essere alla base della loro insorgenza. È stato altresì dimostrato che alcune mutazioni sono presenti già alla diagnosi. Le mutazioni che più frequentemente causano resistenza agli inibitori di seconda generazione nilotinib, dasatinib e bosutinib sono invece un numero molto più limitato; le principali sono la T315I, E255K e la V299L. Sia gli inibitori di prima che quelli di seconda generazione sono incapaci di agire nei confronti della forma mutante T315I di BCR-ABL1 per due ragioni. Questa mutazione, pur non disturbando la struttura complessiva della proteina BCR-ABL1, influenza la topologia della regione di legame dell'ATP; manca, infatti, di un residuo di treonina che fornisce un gruppo idrossile critico per il legame idrogeno con gli inibitori di prima e seconda generazione. Questo legame idrogeno, importante sia per la potenza che per la specificità degli inibitori, scompare, dunque, quando la treonina è rimpiazzata da un residuo di isoleucina (Ile). Inoltre, il residuo 315 è localizzato direttamente di fronte alla tasca idrofobica ed è pertanto definito residuo *gatekeeper*. Quando mutato in Ile, la catena laterale più ingombrante protrude nel sito attivo dell'enzima bloccando l'ingresso ai TKI, ma permettendo l'accesso all'ATP.

La sensibilità di una mutazione ai TKI può essere valutata usando

dati clinici (tasso di risposta) o dati *in vitro* (il valore di IC50). L'IC50 è la concentrazione di TKI che riduce del 50% sia la crescita di una linea cellulare trasfettata con BCR-ABL1 o i suoi mutanti (saggi cellulari), sia l'attività chinasi di BCR-ABL1 o dei suoi mutanti (saggi biochimici). La combinazione di questi dati permette di valutare la sensibilità delle mutazioni⁽⁴³⁾.

Lo studio dello stato mutazionale di BCR-ABL1 è di notevole rilevanza per stabilire una corretta gestione clinica in caso di resistenza ai TKI, ed è raccomandato in tutti i casi di fallimento terapeutico. Le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione hanno permesso di aumentare la possibilità di identificare le mutazioni, ricostruire l'architettura clonale della popolazione mutante quando sono presenti più mutazioni, discriminare tra mutazioni *compound* e mutazioni policlonali, quantificare ogni mutazione e seguire la sua dinamica nel corso del tempo. L'uso del sequenziamento di nuova generazione (NGS) nei pazienti resistenti ai TKI ha mostrato che le mutazioni rilevate dai metodi di sequenziamento convenzionali (i.e. Sanger), a volte, rappresentano solo la punta dell'iceberg. In alcuni casi, infatti, le mutazioni sono presenti in percentuali molto basse, dall'1% al 15-20%, al di sotto del limite di sensibilità del sequen-

ziamento di tipo Sanger. Dal punto di vista clinico, l'identificazione di una mutazione, seppure in piccola percentuale, è molto importante per la scelta dell'inibitore più adatto. Inoltre, un altro fattore importante è la capacità del *deep sequencing* di identificare anche le mutazioni *compound*; esse originano quando due mutazioni sono acquisite dalla stessa molecola di BCR-ABL1, suggerendo la presenza di un solo clone. L'identificazione delle mutazioni *compound* ha un importante risvolto clinico: infatti, l'IC50 dei TKI in questi casi è più alto rispetto ai casi che presentano una sola mutazione e queste mutazioni rappresentano quindi un fattore prognostico altamente sfavorevole⁽⁴⁴⁾. La Figura 3 riassume i dati riguardanti le mutazioni di BCR-ABL1.

LAL-B BCR-ABL1-like

Attualmente, il BCR-ABL1 è l'unico dei trascritti indagati nella pratica diagnostica per il quale è disponibile ed indispensabile un approccio mirato alla proteina di fusione e la sua identificazione rappresenta, pertanto, un passaggio necessario per una corretta condotta terapeutica.

Tuttavia, anche nell'ambito dei casi di LAL BCR-ABL1-negativi -

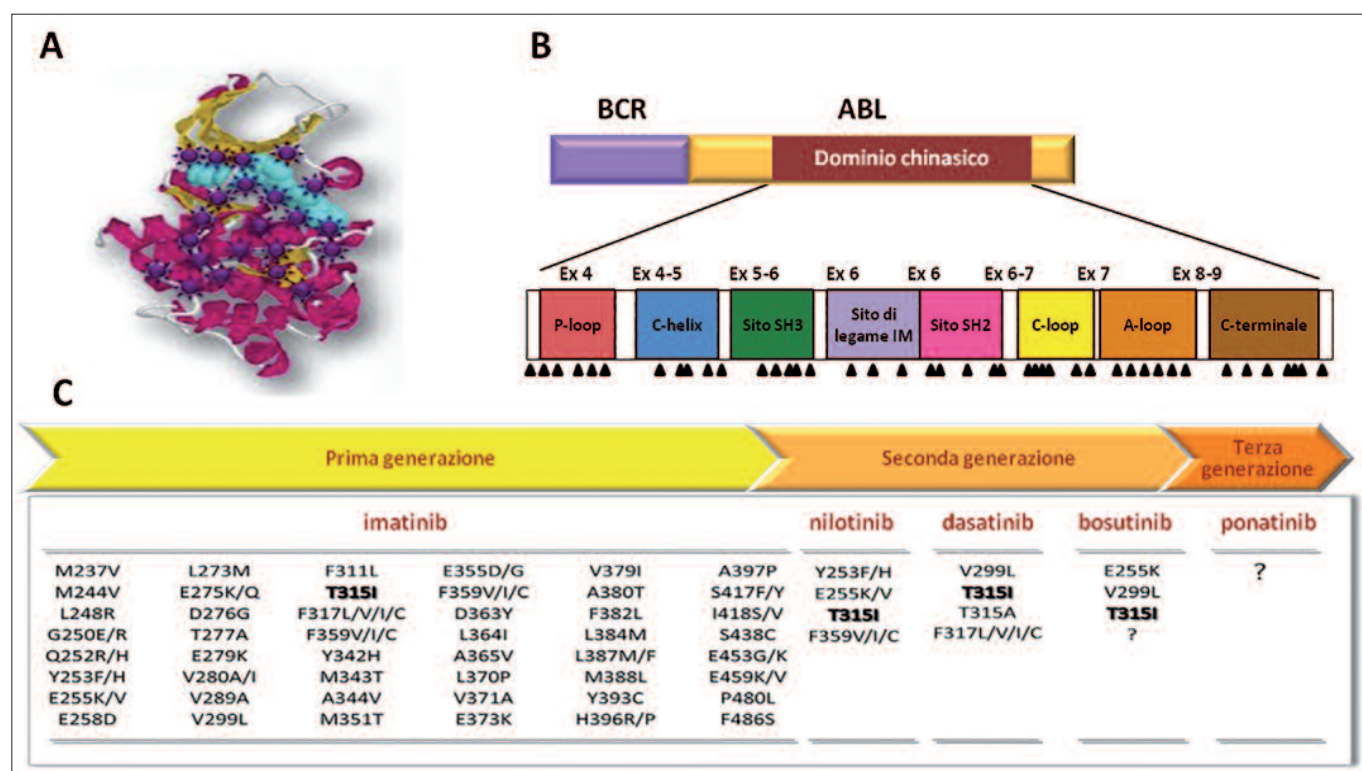


Figura 3 – Rappresentazione grafica dell'imatinib, del dominio chinasi di BCR-ABL e delle mutazioni resistenti agli inibitori dei TKI. **A)** Rappresentazione dell'imatinib (modello a calotta, azzurro) legato a ABL (modello a cartoon). È mostrata la distribuzione tridimensionale di tutte le mutazioni riportate in letteratura (viola). **B)** Ingrandimento del dominio chinasi di BCR-ABL che mostra i principali sottodomini. Le mutazioni resistenti all'imatinib sono rappresentate dai triangoli neri. **C)** Riepilogo delle mutazioni che causano resistenza all'imatinib, dasatinib, nilotinib e bosutinib. Il punto interrogativo nella colonna del bosutinib indica che sono disponibili pochi dati riguardo le mutazioni resistenti a questo farmaco e non si possono escludere mutazioni aggiuntive a quelle mostrate. Il punto interrogativo nella colonna del ponatinib indica che non sono state, ad oggi, riportate mutazioni che causano resistenza al ponatinib: essendo l'esperienza clinica ancora limitata non è possibile escludere che vi siano delle mutazioni resistenti, che potrebbero comparire più tardivamente. La mutazione T315I, che causa resistenza agli inibitori di prima e seconda generazione, è indicata in grassetto⁽⁴²⁾.

che rappresentano più del 50% dei casi di LAL-B nei pazienti pediatrici e adolescenti/giovani adulti - è possibile identificare dei sottogruppi che potrebbero giovare dell'introduzione di farmaci bersaglio. Tra questi, la ricerca negli ultimi anni si è focalizzata sui casi BCR-ABL1-like. L'identificazione di questo sottogruppo si deve agli studi di *microarray* che hanno mostrato la presenza di casi che, pur essendo negativi per il trascritto di fusione BCR-ABL1, presentavano un profilo di espressione genica (GEP) simile a quello dei casi BCR-ABL1-positivi^(45,46) con i quali condividono anche l'elevata incidenza di delezioni del gene IKZF1 (vedi sotto) e la prognosi infau- sta, se trattati con schemi terapeutici tradizionali. L'incidenza di questo sottogruppo è pari a circa 10-15% in ambito pediatrico, raggiunge il 27% nelle casistiche adolescenti e rappresenta il 20% delle LAL dell'adulto⁽⁴⁷⁾.

Sebbene fosse nota da tempo la presenza di LAL BCR-ABL1-nega- tive caratterizzate da iperespressione di chinasi^(48,49), soltanto grazie alle metodiche di NGS ne sono state svelate le basi molecolari. Il particolare profilo genetico dei casi BCR-ABL1-like si deve, infatti, a mutazioni e riarrangiamenti che coinvolgono TK e recettori di ci- tochine⁽⁵⁰⁾. È possibile identificare alterazioni che provocano l'atti-

vazione di chinasi nel 90% dei casi BCR-ABL1-like.

Le alterazioni più comuni sono i riarrangiamenti dei geni ABL1, CRLF2, CSF1R, EPOR, JAK2, NTRK3 e PDGFRB (i.e. IGH-CRLF2, P2RY8-CRLF2, BCR-JAK2, STRN3-JAK2, EBF1-PDGFRB, NUP214-ABL1, RANBP2-ABL1). I riarrangiamenti di CRLF2 (r-CRLF2) si riscontrano nel 47% dei casi e provocano l'iperespressione di CRLF2, unitamente all'attivazione della via di segnale JAK/STAT; infine, le fusioni delle chinasi della famiglia ABL si rilevano nel 12% di casi, di EPOR nel 3% e di JAK2 nel 7%⁽⁵¹⁾ (Figura 4).

Il coinvolgimento delle chinasi ha indotto a testare i TKI anche in questo contesto e molteplici studi hanno dimostrato che potrebbero avere un ruolo anche nel trattamento dei casi BCR-ABL1-like.

Infatti, geni di fusione o mutazioni puntiformi a carico di protein chinasi conferiscono a linee cellulari pre-B una capacità di crescita indipendente da citochine, che è invece abolita dal trattamento con imatinib e dasatinib⁽⁵¹⁾. Analogamente, cellule leucemiche BCR-ABL1-like sono sensibili a TKI *in vitro* e in modelli di xenograft. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che i casi BCR-ABL1-like con fusioni dei geni ABL, scarsamente rispondenti alla chemiotera-

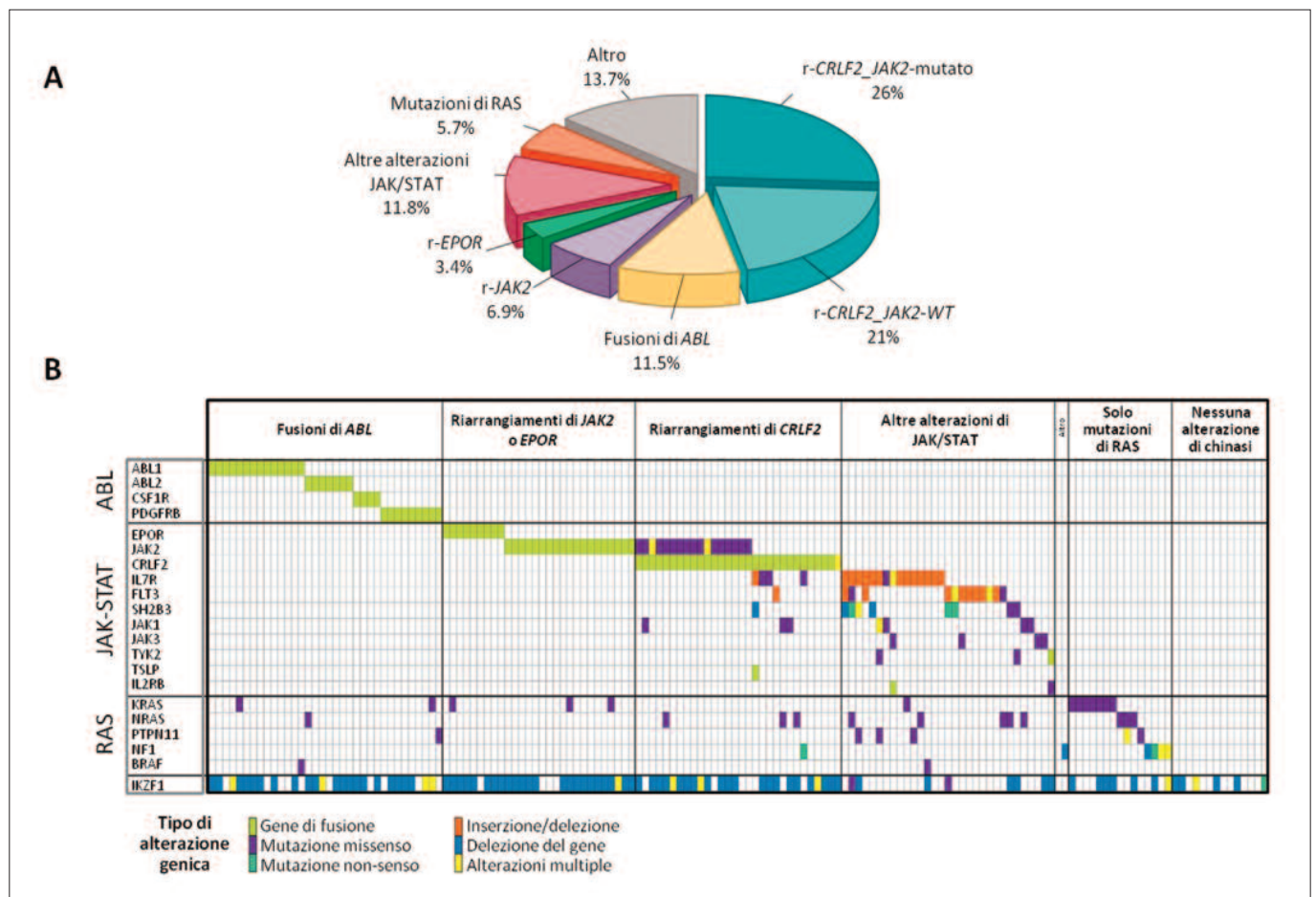


Figura 4 – Alterazioni genetiche che caratterizzano il sottogruppo BCR-ABL1-like. **A)** Incidenza delle principali alterazioni documentate nei pazienti pediatrici, adolescenti e giovani adulti affetti da LAL BCR-ABL1-like. **B)** Distribuzione delle lesioni geniche più frequenti^(51,62).

pia, sono invece sensibili ai TKI ⁽⁵¹⁾; i TKI sono risultati efficaci anche in casi con riarrangiamenti del gene PDGFRB ⁽⁵²⁾.

Anche le vie di trasduzione del segnale JAK/STAT (12%) e RAS (6%) sono frequentemente alterate nelle LAL BCR-ABL1-*like* ^(50,51). Tali mutazioni suggeriscono che, oltre ai TKI, altri inibitori che interferiscono con questi meccanismi di segnalazione potrebbero trovare applicazione nei casi BCR-ABL1-*like* così come in altri casi BCR-ABL1-negativi, come sarà discusso nei paragrafi seguenti.

Il miglioramento della prognosi dei casi BCR-ABL1-*like* potrebbe, quindi, derivare sia dall'introduzione di terapie mirate che dall'adeguamento dei trattamenti ai livelli di MMR come dimostrato da Roberts et al ⁽⁵³⁾.

Alla luce delle implicazioni prognostiche e, forse, terapeutiche, il riconoscimento dei casi di LAL BCR-ABL1-*like* è di fondamentale importanza. Tuttavia, ad oggi il loro riconoscimento non è univoco e richiede ancora lo studio del GEP e/o l'identificazione dei trascritti sopra menzionati che è fattibile solo con sofisticate tecniche di biologia molecolare. Tutto ciò non è ovviamente applicabile alla normale routine diagnostica e rende la ricerca di un comune metodo di identificazione dei casi BCR-ABL1-*like* una delle principali sfide odierne ^(54,55).

Sottotipi di LAL-B BCR-ABL1-negative

Mentre nel caso delle LAL BCR-ABL1-*like* il richiamo al tipo di terapia bersaglio potenzialmente efficace è diretto, dato il successo dei TKI nelle LAL BCR-ABL1-positiva, meno immediato è il potenziale risolto terapeutico nei rimanenti sottogruppi di LAL BCR-ABL1-negative.

Basi molecolari

Come rivelato inizialmente da studi di microarray e successivamente dalle tecniche di NGS, il panorama genetico dei casi BCR-ABL1-negativi è altamente eterogeneo ^(56,57). Infatti, oltre ai sottotipi caratterizzati dai più comuni riarrangiamenti cromosomici (BCR-ABL1, ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, r-MLL) o da un cariotipo ipo o iperdiploide (Tabella 2A e B) ⁽⁵⁷⁾, sono stati identificati casi con riarrangiamenti di CRLF2, deregolazione di ERG, amplificazioni intracromosomiche del cromosoma 21 (iAMP21), riarrangiamenti di PAX5, deregolazione di IKZF1, nonché i casi BCR-ABL1-*like* sopra descritti (Tabella 3). L'incidenza di questi sottotipi varia notevolmente con l'età (Figura 5) ⁽⁵⁶⁾.

Alle macroalterazioni si aggiungono mutazioni puntiformi e alterazioni del numero di copie (CNA), come delezioni e amplificazioni. La frequenza delle mutazioni somatiche nella LAL è bassa (≤ 20 mutazioni non-silenti per caso) - ad eccezione delle recidive con fenotipo ipermutato ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾ - e con un'incidenza simile si rilevano le CNA, frequentemente rappresentate da delezioni di regioni che includono uno o pochi geni. Globalmente, le alterazioni più frequenti colpiscono i geni coinvolti nel differenziamento del linfocita B (IKZF1, PAX5, EBF1, VPBEB1, BTG1): tra queste, le più comuni sono le delezioni e le mutazioni di IKZF1 e PAX5, che determinano perdita di funzione o espressione di un allele dominante negativo che, interferendo con il differenziamento linfoide, contribuiscono alla leucemogenesi ⁽⁶¹⁾. Altri geni frequentemente interessati da delezioni e mutazioni sono quelli coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare (CDKN2A/2B, RB1, TP53), della trascrizione (ETV6, TBL1XR1,

SOTTOTIPO CITOGENETICO	RILEVANZA CLINICA	ABERRAZIONI AGGIUNTIVE	PREVALENZA
Iperdiploidia (>50 cromosomi)	Prognosi eccellente, soprattutto nei casi pediatrici	Mutazioni in FLT3, NRAS, KRAS, o PTPN11. Microdelezioni di CDKN2A, ETV6, IKZF1, PAX5, RB1 e TCF3. Mutazioni/delezioni di CREBBP, nei casi di recidiva	25%-30% dei casi pediatrici e $\leq 9\%$ dei casi adulti
Ipodiploidia (<44 cromosomi)	Prognosi progressivamente sfavorevole, che decresce al diminuire del numero di cromosomi	—	5%-8%
Quasi aploide (24-31 cromosomi)	—	Mutazioni attivanti tirosin-chinasi (RTK)/RAS pathway (NF1, NRAS, KRAS, MAPK1, FLT3, PTPN11) e mutazioni/delezioni di IKZF3	0,7%-2,4%
Bassa Ipodiploidia (32-39 cromosomi)	—	Mutazioni di TP53, RB1, CDKN2A/2B e IKZF2	—
Ipodiploidia (40-43 cromosomi) Quasi diploide (44-45 cromosomi)	—	—	—

Tabella 2A – Principali aneuploidie nelle LAL-B.

TRASLOCAZIONE	GENI IMPLICATI	RILEVANZA CLINICA	ABERRAZIONI AGGIUNTIVE	PREVALENZA
t(12;21)(p13;q22)	ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)	Prognosi eccellente	Delezioni di PAX5, EBF1, ETV6, CDKN2A, RAG1, RAG2, BTLA, CD200, TOX, TBL1XR1, NR3C1, BTG1	25% dei casi pediatrici e 1%–4,4% dei casi adulti
t(1;19)(q23;p13)	TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)	Prognosi da intermedia a favorevole	Delezioni del cromosoma 9p (CDKN2A e PAX5), cromosoma 6q o cromosoma 13q (RB1), e formazione di isocromosoma 9q	≤6% dei casi pediatrici e ≤3% dei casi adulti
t(17;19)(q22;p13)	TCF3-HLF (E2A-HLF)	Prognosi sfavorevole	–	<1%
t(9;22)(q34;q11.2)	BCR-ABL1	Prognosi notevolmente migliorata in seguito all'aggiunta di TKIs alla chemioterapia intensiva	Mutazioni o delezioni di IKZF1	3%–5% dei casi pediatrici e 25%–30% dei casi adulti
t(v;11q23) t(4;11)(q21;q23) t(9;11)(p21;q23) t(10;11)(p12;q23) t(11;19)(q23;p13.3)	MLL MLL-AFF1 (AF4) MLL-MLLT3 (AF9) MLL-MLLT10 (AF10) MLL-ENL	Prognosi sfavorevole, soprattutto nei neonati	Mutazioni attivanti in tirosin chinasi-fosfoinositide-3-chinasi-RAS pathway, con mutazioni ricorrenti in KRAS e NRAS e mutazioni non ricorrenti in FLT3, NF1, PTPN11 e PIK3R1	66% dei neonati, 1%–2% dei bambini, e 4%–9% degli adulti

Tabella 2B – Traslocazioni ricorrenti nelle LAL-B⁽⁵⁷⁾.

TRASLOCAZIONE	GENI IMPLICATI	RILEVANZA CLINICA	ABERRAZIONI AGGIUNTIVE	PREVALENZA
<i>BCR-ABL1-like</i> ALL	–	Prognosi sfavorevole	Delezioni a carico di IKZF1, TCF3, EBF1, PAX5, e VPREB1 dic(9;20) e iAMP21. Delezioni di IKZF1, espressione deregolata di CRLF2 con mutazioni nella famiglia di JAK. Riarrangiamenti a carico di ABL1, JAK2, CRLF2, PDGFRB, EBF1, EPOR; mutazioni attivanti di IL7R e FLT3; delezioni di SH2B3	10%–15% dei casi pediatrici e 27% degli adolescenti e giovani adulti, 20% negli adulti
<i>iAMP21</i>	–	Prognosi sfavorevole	Delezioni di IKZF1, CDKN2A, PAX5, ETV6, e RB1; guadagno di un cromosoma X e presenza di riarrangiamento P2RY8-CRLF2	~2%
t(v;14q32)	IGH con molti partner di fusione: CRLF2, ID4, CEBP, BCL2, EPOR, LHX4, e IL-3	Prognosi sfavorevole	–	<5%, più frequente negli adolescenti
Translocazioni/delezioni/mutazioni in Xp22.3/Yp11.3	CRLF2-IGH, P2RY8-CRLF2	Prognosi sfavorevole	Associate con mutazioni di JAK1/2 nel ≤50% dei casi; nelle LAL-B ad alto rischio, associate sia con delezioni e/o mutazioni di IKZF1 che mutazioni di JAK1/2.	≤7% dei casi LAL-B, >50% dei casi di LAL con Sindrome di Down, 50% dei casi LAL BCR-ABL1-like
Delezioni di 21q22	ERG	Prognosi favorevole	–	3% o 7% dei casi pediatrici
Delezioni/traslocazioni in 9p13	PAX5 con molteplici partner, tra cui ETV6, ELN, POM121, PML, FOXP1, MLLT3, JAK2, C20orf112, AUTS2, CHFR, SOX5, POM121C	Importanti nel processo di leucemogenesi ma non associate a risultati avversi	–	Delezioni di PAX5: 30%; mutazioni di PAX5: 5%–7%; riarrangiamenti di PAX5: 2%–3%
Delezioni focali/mutazioni 7p12,2	IKZF1	Prognosi sfavorevole	–	15% dei casi pediatrici
Dic(9;20)	–	Prognosi sfavorevole	Delezioni di CDKN2A, iAMP21, amplificazione del cromosoma X	2%–3% dei casi pediatrici e ~0,5% dei casi adulti

Tabella 3 – Principali sottotipi di LAL-B con le lesioni genetiche associate e impatto prognostico⁽⁵⁷⁾.

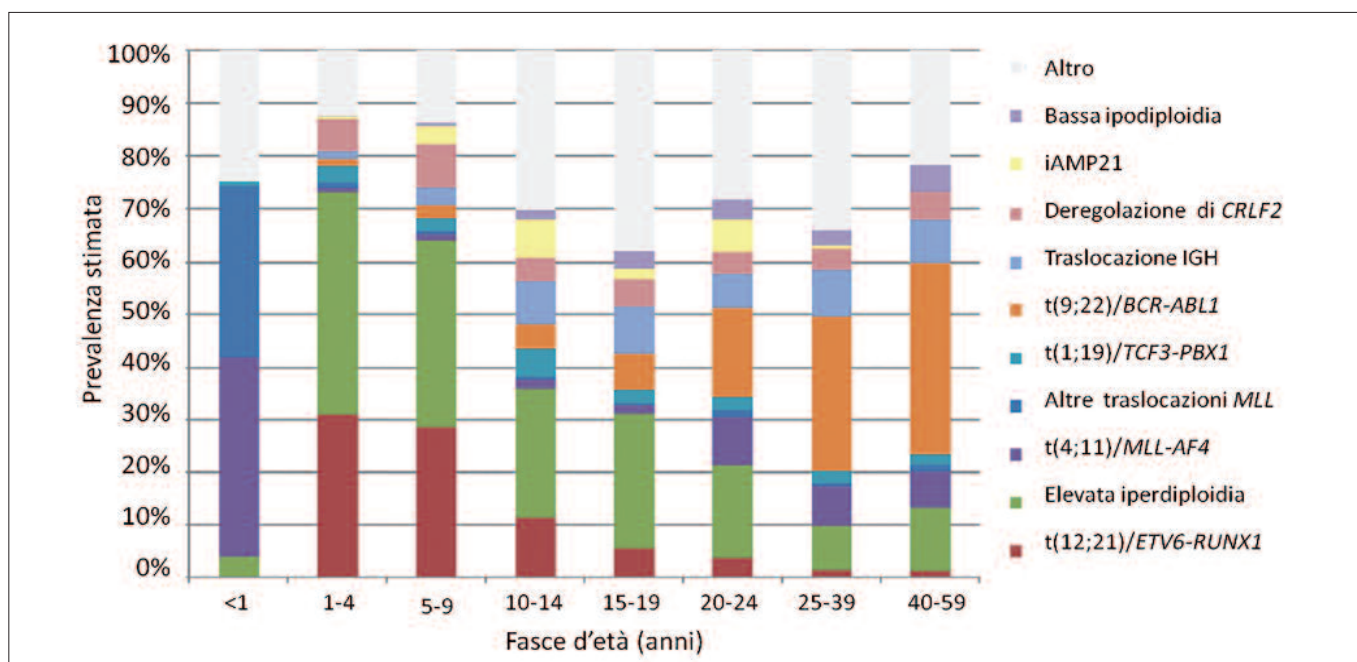


Figura 5 – Prevalenza delle principali alterazioni genetiche nelle diverse fasce d'età ⁽⁵⁶⁾.

ERG), della segnalazione linfoide (BTLA, CD200, TOX), nella cascata di trasduzione di RAS (NF1, KRAS, NRAS, PTPN11) e nelle modificazioni epigenetiche (EZH2, CREBBP, SETD2, MLL2, NSD2); a questi si aggiungono le lesioni di recettori di citochine e numerose TK (ABL1, ABL2, CRLF2, CSF1R, EPOR, FLT3, IL2RB, IL7R, JAK1/2, NTRK3, PDGFRB) ^(9,62).

Il tipo e la frequenza delle aberrazioni genetiche (riarrangiamenti cromosomici, mutazioni, delezioni/amplificazioni) varia nei diversi sottotipi di LAL (Tabelle 2 e 3): per esempio, le mutazioni dei geni della via del segnale di RAS prevalgono nei casi r-MLL e nei casi iperdiploidi ⁽⁶³⁾, i riarrangiamenti che coinvolgono recettori di citochine e TK sono caratteristici delle LAL BCR-ABL1-like, come riportato di seguito ⁽⁵⁰⁾, e le alterazioni nei geni che partecipano alla regolazione epigenetica sono frequenti alla recidiva di malattia e negli adolescenti con LAL r-MLL ⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾.

Nonostante l'identificazione di numerose nuove lesioni genetiche, soltanto alcune rappresentano dei potenziali bersagli terapeutici e quindi le terapie mirate - volte a interferire direttamente con la proteina mutata e/o con i meccanismi di segnalazione attivati in modo aberrante in seguito all'alterazione genetica - potrebbero rappresentare delle valide alternative ai trattamenti convenzionali o potrebbero essere impiegate in combinazione con essi ⁽⁶⁸⁾.

Altri potenziali farmaci bersaglio

Sulla base della disponibilità di farmaci bersaglio, si possono raggruppare le LAL in classi nelle quali potrebbero essere efficaci gli inibitori di:

- chinasi;
- della via del segnale JAK/STAT;

- della via del segnale di RAS;
- dei meccanismi epigenetici, come discusso nella sezione sottostante.

Inibitori di chinasi

Oltre alle LAL BCR-ABL1-positive e BCR-ABL1-like, i TKI potrebbero essere efficaci anche in altri sottogruppi caratterizzati da un'espressione alterata delle TK ^(48,49). Tra le chinasi con livelli di espressione aberranti è doveroso ricordare FLT3, il cui trascritto è iperespresso nei casi r-MLL e anche in una elevata percentuale di LAL-B negative ai trascritti ricorrenti ^(48,49). Tali pazienti potrebbero quindi beneficiare degli inibitori di FLT3 di prima generazione, come dimostrato dall'efficacia del lestaurinib (CEP701) in cellule primarie di neonati e bambini affetti da LAL-B r-MLL o iperdiploide ⁽⁶⁹⁾. I TKI potrebbero essere efficaci anche in pazienti con LAL-B TCF3-PBX1+, ove vi fosse una scarsa risposta alla terapia convenzionale. Questi casi, infatti, presentano al profilo di espressione genica un'elevata espressione di numerose chinasi - tra le quali MERTK, ICK, TNK2 - e le cellule primarie sono sensibili *in vitro* a imatinib e dasatinib ^(49,70).

Inibitori della cascata JAK/STAT

La via del segnale JAK/STAT rappresenta un sistema di trasduzione sul quale convergono una serie di citochine e recettori transmembrana associati (Figura 6). L'attivazione costitutiva contraddistingue molte neoplasie ematologiche, ma le lesioni genetiche responsabili della suddetta alterazione sono eterogenee ⁽⁷¹⁾. Nell'ambito delle LAL-B sono da annoverare i già menzionati riarrangiamenti di CRLF2, le mutazioni attivanti di JAK1, JAK2, IL7R, IL2RB, e le delezioni/mutazioni di SH2B3. In particolare, le alterazioni più frequenti a carico di CRLF2 - appartenente al complesso recettoriale della linfopoietina stromale (TSLP) insieme alla catena alfa (IL7R) - sono la dele-

zione a monte di CRLF2 che porta al trascritto di fusione CRLF2-P2RY8 e la traslocazione IGH-CRLF2; entrambe inducono l'iperepressione di CRLF2. La mutazione F232C nel dominio transmembrana di CRLF2 è invece più rara e determina dimerizzazione e attivazione del segnale ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾.

Le mutazioni dei membri della famiglia JAK si verificano nei domini chinasi o pseudochinasi altamente conservati e ne determinano un'attivazione costitutiva. Le mutazioni di IL7R, documentate sia nelle LAL-B che LAL-T (vedi sotto), sono rappresentate principalmente da inserzioni/delezioni (indel) nel dominio iustamembrana-transmembrana o sostituzioni che introducono nella gran parte dei casi cisteine spaiate determinando la formazione di ponti disolfuro, omodimerizzazione e quindi crescita indipendente da citochine nei progenitori linfoidi ^(75,76).

Complessivamente, queste lesioni determinano un'attivazione costitutiva della via del segnale JAK/STAT che potrebbe essere bloccata dagli inibitori di JAK. Tra questi, il ruxolitinib - largamente testato nell'ambito nelle malattie mieloproliferative - si è dimostrato efficace nel ridurre la massa leucemica di xenograft provenienti da campioni aventi mutazioni di JAK e/o r-CRLF2 ⁽⁷⁷⁾. Analogamente, una notevole riduzione della massa leucemica è stata osservata nei casi con BCR-JAK2. Attualmente, uno studio di fase II sta valutando l'efficacia del dasatinib o ruxolitinib in combinazione con la chemioterapia per il trattamento delle LAL BCR-ABL1-like con alterazioni specifiche (CT.gov:NCT02420717).

Oltre a JAK/STAT, in questi casi è alterata anche la via mTOR/PI3K; a conferma di ciò, la rapamicina si è dimostrata efficace sia in

casi r-CRLF2 che in un caso con mutazioni attivanti di IL7R ⁽⁷⁷⁾. Infine, uno studio recente condotto nell'ambito delle LAL-T ha dimostrato che è possibile bloccare l'omodimerizzazione oncogenica dell'IL7R usando l'agente riducente N-acetilcisteina (NAC) che quindi rappresenta una possibile strategia terapeutica ⁽⁷⁸⁾.

Sebbene tali alterazioni prevalgano nei casi BCR-ABL1-like, non sono esclusive di questo sottogruppo, pertanto gli approcci terapeutici menzionati potrebbero trovare applicazione anche nei casi mutati indipendentemente dal profilo BCR-ABL1-like ⁽⁷⁹⁾.

Inibitori della via di RAS

L'attivazione aberrante di questa cascata di trasduzione del segnale può essere dovuta a mutazioni a carico di recettori di membrana, come nel caso di FLT3, o di elementi cardine della cascata del segnale come le proteine K/NRAS (Figura 7). Numerosi studi hanno dimostrato che le mutazioni dei geni della via del segnale di RAS prevalgono nei casi r-MLL (18-50%) e nei casi iperdiploidi (17-58%) ⁽⁶³⁾. Inoltre, recentemente è emerso che il 70% dei casi quasi-aploidi, aventi 24-31 cromosomi, presenta mutazioni di RAS, che risultano invece meno frequenti nei casi quasi-diploidi (31%) ⁽⁶⁰⁾. Per quel che riguarda lo stadio della malattia, le mutazioni di RAS sono frequenti nei casi pediatrici alla recidiva di malattia (40%) ⁽⁸⁰⁾ così come in quelli ad alto rischio (70%) ⁽⁸¹⁾.

Mutazioni attivanti FLT3 - che svolge un ruolo cruciale nello sviluppo delle cellule staminali emopoietiche e dei progenitori dei linfociti B - sono state riportate per la prima volta nella leucemia mieloide acuta (LMA) e pertanto la gran parte delle conoscenze si riferisce a questa patologia. Le più comuni mutazioni di FLT3 sono le cosiddette du-

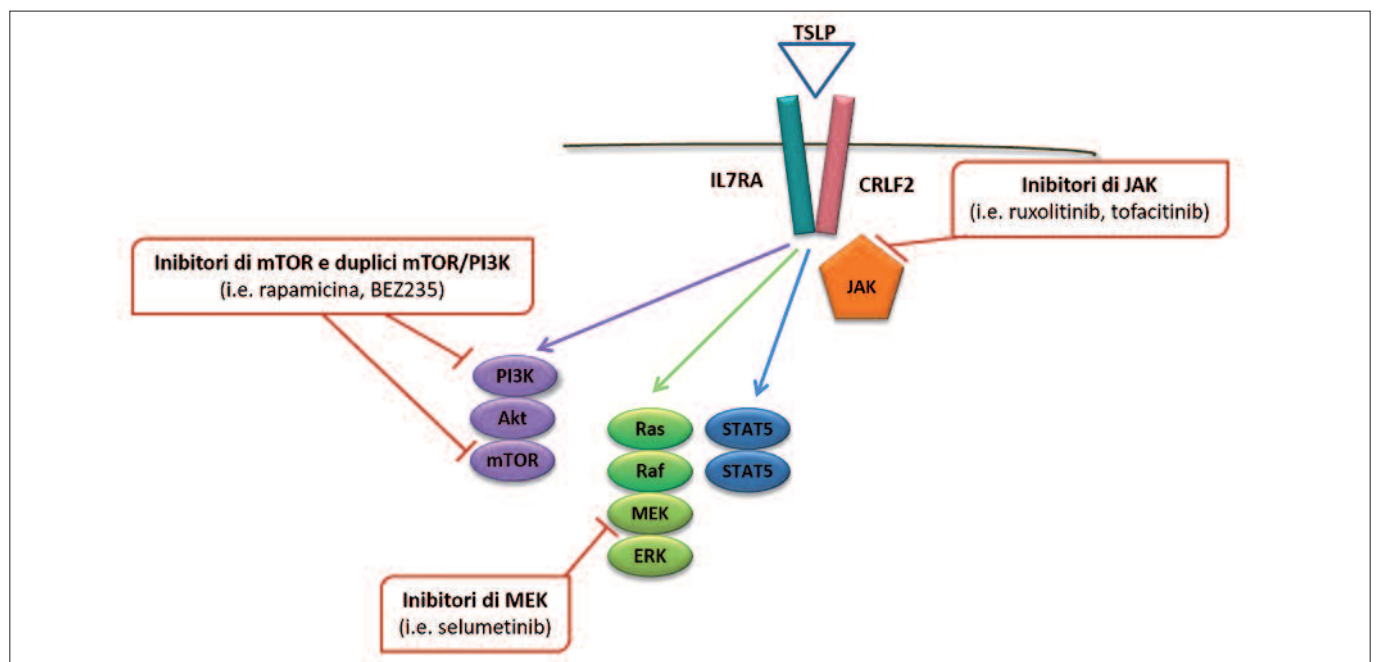


Figura 6 – Schematizzazione della via di segnalazione JAK/STAT e relativi farmaci inibitori. Mutazioni o riarrangiamenti dei componenti della via JAK/STAT (i.e. CRLF2 o JAK) determinano fosforilazione di STAT5 e attivazione aberrante di PI3K/AKT/mTOR e RAS/MEK/ERK. I potenziali bersagli terapeutici e i rispettivi farmaci inibitori sono indicati nei riquadri ⁽⁶⁸⁾.

plicazioni in tandem (ITD) di lunghezza variabile nel dominio juxta-membrana - che provocano dimerizzazione indipendente dal ligando, fosforilazione e attivazione dell'attività chinasi - e le mutazioni puntiformi nel dominio chinasi (TKD) che sembrano determinare anch'esse attivazione costitutiva del recettore ⁽⁸²⁾.

Analogamente ai TKI, gli inibitori di FLT3 agiscono come competitori dell'ATP e se ne conoscono diverse generazioni: mentre i primi (lestaurtinib, midostaurin) erano attivi nei confronti di più chinasi, l'ultima generazione (quizartinib, crenolanib) presenta un'azione più specifica. Oltre alle più note sperimentazioni sulle LMA, il lestaurtinib (CEP701) e il midostaurin (PKC412) sono stati anche testati nei neonati affetti da LAL in uno studio di fase I-II (CT.gov:NCT00866281) ed in uno di fase III (CT.gov:NCT00557193), rispettivamente, ma i risultati non sono ancora noti ⁽⁸²⁾. Tra gli inibitori di nuova generazione, il quizartinib (AC220) rappresenta l'inibitore più potente *in vitro* e dotato, inoltre, di un'elevata selettività. A tale proposito, è stato completato uno studio di fase I in pazienti pedia-

trici affetti da LAL o LMA refrattaria o ricaduta di malattia volto a valutare l'efficacia del quizartinib in combinazione con la chemioterapia (CT.gov:NCT01411267). L'altro farmaco che merita una particolare attenzione è il crenolanib (CP-868-596) perché, al contrario dei farmaci menzionati finora, è attivo sia nei confronti di FLT3-ITD che delle mutazioni del dominio TKD, consentendo quindi anche di superare le resistenze dovute alla comparsa di mutazioni TKD ^(83,84). Gli incoraggianti dati *in vitro* hanno stimolato numerose sperimentazioni (CT.gov:NCT01522469 e NCT01657682) finora solo nell'ambito della LMA refrattaria o con ricaduta di malattia ⁽⁸⁵⁾; tuttavia, è presumibile che nel prossimo futuro il crenolanib sarà impiegato anche nelle LAL FLT3-mutate. Gli inibitori di FLT3 potrebbero trovare applicazione anche nel trattamento delle LAL-B senza trascritti molecolari, nelle quali le mutazioni di FLT3 si riscontrano nell'8% dei pazienti e la loro incidenza aumenta con l'età ⁽⁷⁹⁾. Infatti, crenolanib e quizartinib sono risultati efficaci nel ridurre la proliferazione di cellule primarie di pazienti affetti da LAL-B FLT3-

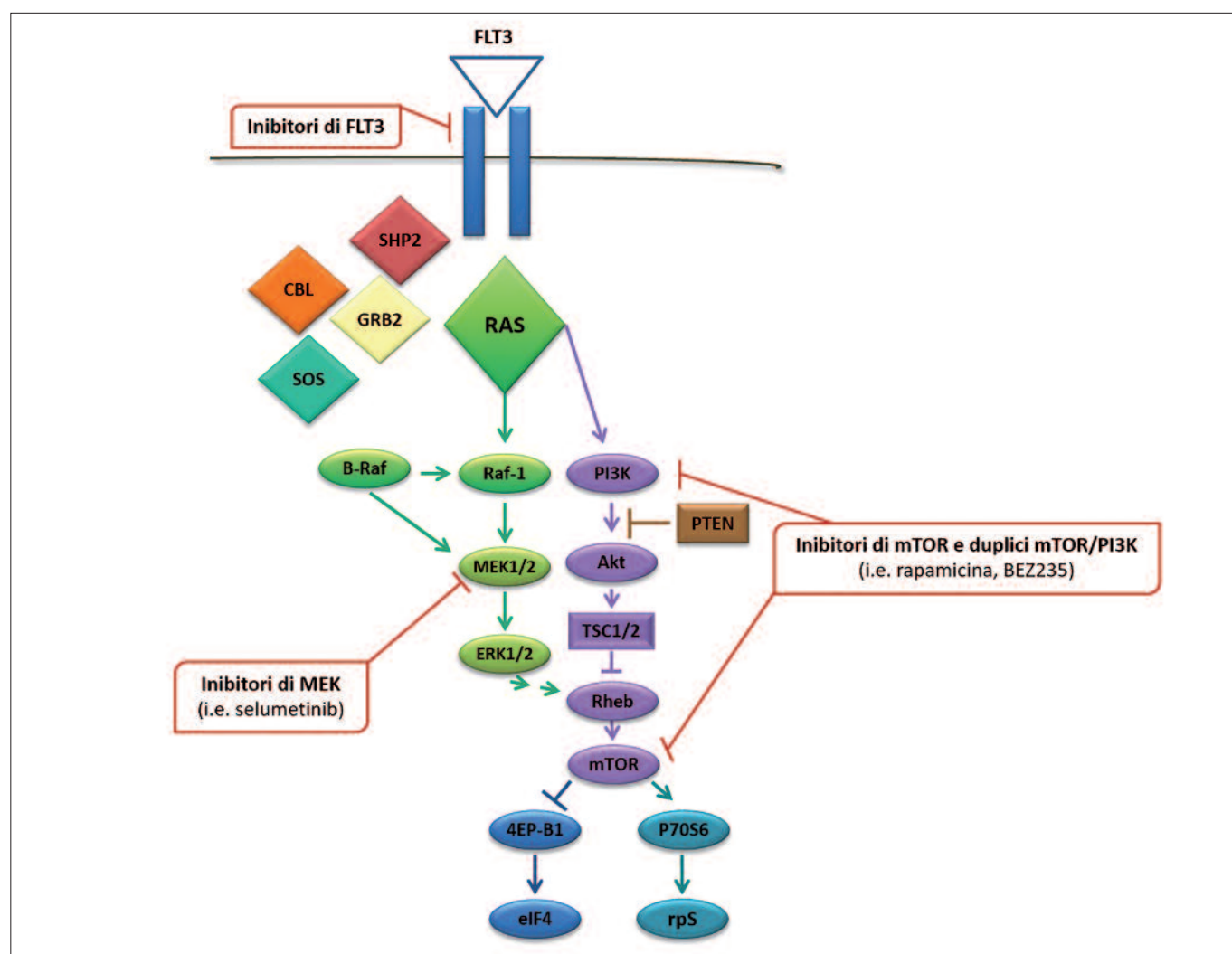


Figura 7 – Schematizzazione della via di segnalazione RAS e relativi farmaci inibitori. Mutazioni di K/NRAS o di tirosin chinasi recettoriali a monte (i.e. FLT3) determinano l'attivazione aberrante della via RAF/MEK/ERK. In aggiunta, RAS segnala anche attraverso altre cascate, tra le quali PI3K/AKT/mTOR. I potenziali bersagli terapeutici e i rispettivi farmaci inibitori sono indicati nei riquadri ⁽⁶³⁾.

mutata. Diverso è il caso di mutazioni di K/NRAS verso cui non sono disponibili degli inibitori specifici. Pertanto, le strategie terapeutiche mirano a interferire con le vie del segnale attivate in modo aberrante (Figura 7). Infatti, le proteine RAS trasmettono il segnale attraverso la via di MEK e la via della PI3K/mTOR, per le quali sono disponibili molteplici inibitori. A supporto di quanto illustrato, il BEZ235, un inibitore sia di PI3K che di mTOR, è stato testato con successo in modelli xenograft di casi ipodiploidi, risultando altamente efficace nell'inibire la proliferazione della massa leucemica. Attualmente è in corso una sperimentazione di fase I in pazienti adulti con LAL recidiva o refrattaria (CT.gov:NCT01756118).

Nell'ambito di uno studio di casi pediatrici di LAL-B con recidiva di malattia è stata invece valutata la sensibilità al selumetinib (AZD6244) di blasti aventi mutazioni di K/NRAS, inibitore allosterico di MEK1/2, già sperimentato nei tumori solidi. In modelli murini con primagraft derivanti da pazienti, il selumetinib ha ridotto il numero di cellule leucemiche⁽⁸⁰⁾. Analogamente, BEZ235 e selumetinib - sebbene quest'ultimo in misura minore - sono risultati efficaci nel ridurre la proliferazione di cellule primarie di LAL-B prive dei comuni trascritti di fusione e aventi mutazioni di K/NRAS⁽⁷⁹⁾.

Inibitori di geni coinvolti nella regolazione epigenetica

Alcuni sottotipi di LAL-B BCR-ABL1-negative presentano alterazioni di geni coinvolti nelle modificazioni epigenetiche, che rappresentano dei promettenti bersagli terapeutici. Tra questi, è stato dimostrato che l'istone metiltransferasi DOT1L è necessario per lo sviluppo della leucemia nei casi r-MLL. L'inibitore di DOT1L di prima generazione, EPZ004777, è stato superato per potenza, selettività e farmacocinetica dall'EPZ-5676, in grado di ridurre la massa tumorale in modelli xenograft di LAL r-MLL. Attualmente, è in corso una sperimentazione di fase I sia nei pazienti pediatrici (CT.gov:NCT02141828) che adulti (CT.gov:NCT01684150) affetti

da LAL r-MLL⁽⁸⁶⁾.

Le mutazioni/delezioni dell'acetiltransferasi CREBBP sono frequenti nelle LAL-B pediatriche alla recidiva di malattia con un'incidenza del 18% nei casi non-iperdiploidi che incrementa fino al 60% negli iperdiploidi^(64,65). Inoltre, è stato riportato che le recidive post-trapianto di pazienti adulti affetti da LAL-B BCR-ABL1-negativa sono particolarmente arricchite in mutazioni dei regolatori dei meccanismi epigenetici SETD2, CREBBP, KDM6A e NR3C1⁽⁶⁶⁾.

Infine, a conferma del ruolo di questa categoria di geni nella LAL r-MLL, un recente studio di NGS ha riportato che il 45% dei pazienti pediatrici più grandi presentano mutazioni nei regolatori dell'epigenetica⁽⁶⁷⁾. Pertanto, il gruppo di pazienti che potrebbe giovare di un trattamento con inibitori delle istone deacetilasi (iHDAC) sembra destinato ad ampliarsi. Recentemente, si sono concluse due sperimentazioni di fase I che includono l'uso di iHDAC, il vorinostat (Zolinza) e il panobinostat (Farydak), in pazienti pediatrici con malattia refrattaria o recidivata (CT.gov:NCT01483690, NCT01321346): i risultati non sono ad oggi ancora pubblicati. Un ulteriore aspetto da considerare è il fatto che le mutazioni di CREBBP sono spesso presenti simultaneamente a quelle di KRAS, come emerso recentemente in un'ampia coorte di casi iperdiploidi alla recidiva di malattia; pertanto, gli inibitori di MEK e della PI3K potrebbero avere un ruolo anche nella gestione terapeutica di questo sottogruppo⁽⁸⁷⁾. I dati riportati sono riassunti nella Tabella 4. In aggiunta alle singole terapie mirate, la presenza di più alterazioni potrebbe motivare l'uso di terapie combinate volte a interferire con le vie di segnalazione alterate, come ad esempio l'impiego di inibitori di JAK e di PI3K nei casi con r-CRLF2 o con mutazioni di JAK. Tali combinazioni potrebbero minimizzare il rischio di resistenza associata a trattamenti con agenti singoli. Un ulteriore miglioramento potrebbe derivare dall'identificazione al momento della diagnosi di mutazioni associate

CATEGORIA	GENI IMPLICATI	FARMACI	SOTTOGRUPPI
Alterazioni a carico di chinasi	BCR-ABL1 PDGFRB, MERTK ICK, TNK2	TKI	BCR-ABL1- <i>like</i> TCF3-PBX1+
Deregolazione della via di segnalazione JAK/STAT	JAK1/2 CRLF2 IL7R	Inibitori di JAK Inibitori mTOR (i.e. rapamicina)	BCR-ABL1
Deregolazione della via di segnalazione di RAS	FLT3 KRAS/NRAS	Inibitori di FLT3 Inibitori mTOR (i.e. rapamicina) Inibitori dupli PI3K/mTOR, (i.e. BEZ235) Inibitore allosterico di MEK1/2, (i.e. selumetinib)	LAL r-MLL LAL-B iperdiploidi e ipodiploidi
Alterazioni della regolazione epigenetica	CREBBP SETD2 DOT1L	Inibitori di DOT1L Inibitori delle istone deacetilasi (i.e. iHDAC)	Recidive di LAL r-MLL

Abbreviazioni: TKI, Inibitore di tirosin chinasi.

Tabella 4 – Sottogruppi di LAL-B e relativi farmaci bersaglio.

a ricaduta di malattia o a resistenza al trattamento che potrebbero quindi guidare e condizionare le strategie terapeutiche.

LAL-T

Le LAL-T rappresentano il 10-15% dei casi di LAL dell'infanzia ed il 25% dei casi adulti ⁽²⁰⁾. Sebbene l'introduzione di schemi terapeutici intensificati abbia migliorato il decorso clinico dei pazienti, la LAL-T è ancora considerata una malattia ad alto rischio di recidiva ^(2,8). Inoltre, la possibilità di cura per i pazienti refrattari o recidivati, specie se precocemente, è scarsa ⁽⁴⁾. Per tale motivo, negli ultimi anni si sono ampliate le ricerche intese a comprendere meglio i meccanismi patogenetici e a identificare lesioni che consentano una migliore stratificazione prognostica e lo sviluppo di terapie mirate.

A differenza delle LAL-B in cui prevalgono i trascritti di fusione, nelle LAL-T i riarrangiamenti interessano più frequentemente le regioni cromosomiche 7q34 e 14q11, dove risiedono i geni per il recettore delle cellule T (TCR). Questi riarrangiamenti si riscontrano nel 35% dei casi e generalmente giustappongono gli *enhancer* o promotori del TCR a fattori di trascrizione coinvolti nel differenziamento cellulare, determinandone una espressione aberrante nei

progenitori T linfocitari ed una deregolazione dell'emopoiesi ⁽⁸⁸⁾.

La bassa incidenza di trascritti di fusione con produzione di una proteina chimerica ha reso difficile lo sviluppo e l'applicazione di terapie mirate come avvenuto nell'ambito delle LAL-B. Infatti, i riarrangiamenti di ABL1 interessano solo l'8% dei pazienti mentre i riarrangiamenti di MLL e MLLT10 sono stati descritti in circa il 5 e 10% dei casi rispettivamente ^(89,90).

Negli ultimi anni il miglioramento delle tecniche di citogenetica e l'integrazione con studi di espressione genica e NGS hanno portato all'identificazione di diverse lesioni genetiche con ruolo patogenetico ed alla definizione di sottogruppi distinti dal punto di vista immunofenotipico e molecolare ⁽⁹¹⁾. Accanto ai trascritti di fusione sono state descritte varie mutazioni, amplificazioni (i.e. MYB) e delezioni cromosomiche (i.e. CDKN2A). L'associazione e la cooperazione di queste lesioni nelle diverse fasi di sviluppo del timocita giustificano la grande eterogeneità che caratterizza questa malattia dal punto di vista biologico e clinico. I vari sottogruppi molecolari emersi dall'analisi in GEP e l'associazione tra le diverse lesioni sono riportati nella Tabella 5. Tra le varie lesioni identificate, le mutazioni a carico del recettore transmembrana NOTCH1, riscontrate in circa il 60%

SOTTOTIPO	RIARRANGIAMENTO	GENI IMPLICATI	ABERRAZIONI AGGIUNTIVE	PREVALENZA
TAL/LMO	del(1)(p32) t(1;14)(p32;q11) t(1;7)(p32;q34) t(7;9)(q34;q32) t(11;14)(p15;q1) t(11;14)(p13;q1) t(7;11)(q35;p13)	STIL/TAL1 TCR con TAL1, TAL2, LMO1, LMO2	Mutazioni e delezioni di PTEN Riarrangiamenti di MYC	30-40%
HOXA	inv(7)(p15q34)/ t(7;7)(p15;q34) t(10;11)(p13;q14) t(v;11q23) del(9)(q34)	TCR con HOXA MLLT10 con vari geni MLL con vari geni SET con NUP214	Mutazioni di IL7R, JAK1/3	~20-25%
TLX3	Riarrangiamenti 5q35 t(5;14)(q35;q32)	TLX3 con BCL11B	Mutazioni di IL7R, JAK1/3, PHF6; NUP214-ABL1, EML1-ABL1	20-24% bambini, 10% adulti
TLX1	Riarrangiamenti 10q24: t(7;10)(q34;q24) t(10;14)(q24;q11)	TCR con TLX1	Delezioni o mutazioni di PTPN2, mutazioni di PHF6; NUP214-ABL1, EML1-ABL1	3-8% bambini, 20-30% adulti
NKX2-1/NKX2-2	inv(14)(q11.2q13) t(7;14)(q34;q13) inv(14)(q13q32.33) t(14;20)(q11;p11)	TCR/IGH con NKX2-1, NKX2-2	Non note	6%
LYL/MEF2C e cluster immaturo	t(7;19)(q34;p13) del(5)(q14)	TCR con LYL1 Riarrangiamenti MEF2C	Mutazioni di JAK1/3, IL7R, N-RAS, FLT3, modulatori epigenetici (i.e. IDH1/2, DNMT3A, EZH2, EED, SUZ12, SETD2 e EP300), fattori di trascrizione (i.e. RUNX1, ETV6, GATA3 e IKZF1); RUNX1-AFF3, ETV6-NCOA2, BCL11B-NKX2.5, BCL11B-PU.1	3%-17%

Tabella 5 – Principali sottotipi molecolari di LAL-T con le lesioni genetiche più frequentemente associate.

dei casi, e le delezioni a carico della regione 9p che contiene il gene oncosoppressore CDKN2A, descritte in circa il 70% dei casi, rappresentano le lesioni più frequenti ^(92,93). Rivestono inoltre particolare interesse le mutazioni e/o delezioni a carico di geni coinvolti nelle vie del segnale di JAK/STAT (IL7R, JAK1, JAK3, STAT5B, PTPN2, PTPRC), RAS/PI3K/PTEN/AKT/mTOR (PTEN, K/NRAS, NF1, FLT3) e nella regolazione epigenetica (PHF6, SUZ12, EZH2, TET2, H3FA e KDM6A) poiché possono rappresentare dei possibili bersagli terapeutici ^(76, 94-103). Nel paragrafo seguente descriveremo la LAL-ETP (*early T-cell precursors*) che rappresenta un sottogruppo con un profilo immunofenotipico e di espressione genica caratteristico. Verranno anche discussi i potenziali farmaci che hanno come bersaglio NOTCH1, le vie di attivazione PI3K/PTEN/AKT/ mTOR e JAK/STAT, e gli inibitori di ABL1.

LAL-ETP

Uno specifico sottogruppo nell'ambito delle LAL-T è rappresentato dalla LAL-ETP, descritta in circa il 15% delle LAL-T sia nei bambini che negli adulti ⁽¹⁰⁴⁾. Le cellule ETP derivano da un progenitore emopoietico immaturo che mantiene la capacità di differenziare in cellule della linea T o mieloide ⁽¹⁰⁵⁾.

Da queste cellule hanno origine appunto le LAL-ETP, caratterizzate da un profilo trascrizionale simile alla cellula staminale e da un immunofenotipo caratterizzato dall'assenza del CD1a e CD8, dalla debole espressione del CD5 e dall'espressione di almeno un marcatore della linea mieloide o della cellula staminale quali: CD117, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b, CD65.

Analogamente, il nostro gruppo ha identificato un gruppo di casi caratterizzati dall'iperespressione di fattori di trascrizione mieloidi, tra cui CEBPA, CEBPB e CEBPD, e del miRNA-223, un microRNA coinvolto nella differenziazione mieloide ⁽¹⁰⁶⁾.

Zhang et al. hanno inoltre riportato che questa forma di leucemia è

caratterizzata dalla presenza di diversi riarrangiamenti intracromosomici, delezioni ed inserzioni ⁽⁵⁹⁾.

Dal punto di vista clinico i pazienti con LAL-ETP presentano una prognosi infausta con i comuni schemi di trattamento chemioterapici ⁽¹⁰⁴⁾. Sebbene l'utilizzo di trattamenti intensivi abbia migliorato la prognosi di questi pazienti, la tossicità ad essi correlati incoraggia lo sviluppo di terapie mirate ⁽¹⁰⁷⁾.

Questo sottogruppo è infatti caratterizzato da un ampio spettro di mutazioni a carico di geni comunemente alterati nelle LMA come IDH1, IDH2, DNMT3A e FLT3, fattori di trascrizione come RUNX1, ETV6, GATA3 e IKZF1, modulatori epigenetici come EZH2, EED, SUZ12, SETD2 e EP300, geni delle vie del segnale JAK/STAT e RAS ⁽⁵⁹⁾. Mutazioni di NOTCH1 e delezioni a carico di CDKN2A/2B si riscontrano, invece, meno frequentemente.

Recentemente, Maude et al. hanno dimostrato che le cellule di pazienti con LAL-ETP presentano una attivazione aberrante della via del segnale di JAK/STAT che è indipendente dalla presenza di mutazioni ⁽¹⁰⁸⁾. Hanno, inoltre, documentato l'efficacia del ruxolitinib nel ridurre la massa leucemica di xenograft provenienti da campioni di LAL-ETP. Alla luce di questi risultati, gli inibitori della via del segnale di JAK/STAT e RAS potrebbero rappresentare delle interessanti opzioni terapeutiche, oltre che per le LAL-B BCR-ABL1-negative già discusse, anche per specifici sottogruppi di LAL-T.

Potenziali farmaci bersaglio

L'identificazione delle lesioni genetiche e l'alterazione di specifiche vie del segnale hanno portato allo sviluppo di terapie mirate.

Tra i farmaci entrati in studi clinici o in uso in altre patologie ricordiamo quelli che hanno come bersaglio NOTCH1, le vie di attivazione PI3K/PTEN/AKT/mTOR e JAK/STAT, e gli inibitori di ABL1 (Tabella 6).

CATEGORIA	GENI IMPLICATI	FARMACI
Mutazioni a carico di NOTCH1	NOTCH1	Inibitori delle γ -secretasi
Deregolazione della via di segnalazione JAK/STAT	JAK1/2/3 IL7R PTPRC PTPN2	Inibitori di JAK Inibitori mTOR (i.e. rapamicina)
Deregolazione della via di segnalazione di PI3K/PTEN/AKT/mTOR	PTEN N/K-RAS AKT PI3K	Inibitori mTOR (i.e. rapamicina) Inibitori duplici PI3K/mTOR, (i.e. BEZ235) Inibitore allosterico di MEK1/2 (i.e. selumetinib)
Alterazioni a carico di chinasi	NUP214-ABL1 EML1-ABL1 BCR-ABL1	TKI
Abbreviazioni: TKI, Inibitore di tirosin chinasi.		

Tabella 6 – Potenziali farmaci bersaglio nelle LAL-T.

Inibitori di NOTCH1

L'elevata frequenza delle mutazioni a carico di NOTCH1 ed il loro ruolo nella patogenesi delle LAL-T ha portato allo sviluppo di numerosi farmaci diretti contro questa proteina. Gli inibitori delle γ -secretasi (GSI), già in uso nei pazienti affetti da Alzheimer, assumibili per via orale ed in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, sono stati i primi farmaci sperimentati. Sono state sviluppate diverse molecole in grado di bloccare il clivaggio del recettore ed il conseguente rilascio della porzione intracellulare con attività trascrizionale (ICN1). Nonostante i dati promettenti in linee di LAL-T con mutazioni di NOTCH1, il primo studio clinico ha mostrato limitata efficacia dovuta, presumibilmente, alla complessità della via di NOTCH1^(109,110). Infatti, poiché NOTCH1 interagisce con altri mediatori intracellulari tra cui MYC e PTEN, l'efficacia dei GSI può essere ridotta qualora siano presenti lesioni di questi geni^(92,111). Inoltre, la somministrazione dei GSI è gravata da un'importante tossicità gastrointestinale - sostenuta dall'inibizione di NOTCH1 e NOTCH2 a livello intestinale^(111,112) - che rende infattibile la somministrazione continua del farmaco. Studi pre-clinici su linee cellulari e in modelli murini hanno dimostrato che l'aggiunta del desametasone può attenuare la tossicità a livello gastrointestinale e potenziare l'attività dei GSI⁽¹¹³⁾. Sono stati, inoltre, sintetizzati anticorpi diretti contro il ligando o contro specifiche porzioni della proteina. L'anticorpo anti-DLL4 lega il ligando Notch-Delta-Like 4 (Ab-anti DLL4) prevenendo il legame con NOTCH1. Sebbene induca una regressione del tumore, studi pre-clinici hanno dimostrato anche in questo caso una tossicità epatica inaccettabile e lo sviluppo di tumori endoteliali nei topi esposti a somministrazioni prolungate^(114,115). Gli anticorpi diretti contro la regione regolatoria negativa (NRR) prevengono invece l'attivazione del recettore, sono in grado di ridurre la crescita cellulare in linee di LAL-T e nel modello murino^(116,117). Inoltre, l'inibizione selettiva di NOTCH1 o NOTCH2 ad opera di anticorpi isoforma-specifici (anti-NRR1 ed anti-NRR2) non è gravata dalla tossicità descritta dei GSI. Sono disponibili anche anticorpi in grado di legare le proteine del complesso delle secretasi come la nicastrina. L'A5226A è un anticorpo che lega la porzione extracellulare della nicastrina ed inibisce il complesso enzimatico competendo nel legame con il substrato. Nella linea cellulare DND41, A5226A ha provocato solo un lieve decremento di ICN1, ma nel topo è stata osservata un'importante riduzione della massa tumorale⁽¹¹⁸⁾. Infine, sono in via di sperimentazione molecole in grado di inibire la maturazione ed il trasporto del recettore dal reticolo endoplasmatico e dal sistema del Golgi alla membrana⁽¹¹⁹⁾. Studi *in vitro* hanno evidenziato che la somministrazione di thapsigargin, un inibitore della Ca-ATPasi del sarcoplasma e reticolo endoplasmatico (SERCA), comporta una riduzione dell'espressione di geni regolati da NOTCH1 ed un accumulo del recettore immaturo nel reticolo endoplasmatico⁽¹¹⁹⁾. La via di NOTCH1 e i relativi farmaci bersaglio sono schematizzati nella Figura 8.

Inibitori della via PI3K/PTEN/AKT/mTOR

L'interesse nel testare farmaci specifici per questa via nasce dall'impatto prognostico sfavorevole delle lesioni a carico di PTEN, in particolare modo nell'adulto^(96,120-122). Un approccio terapeutico è rappresentato dagli inibitori di mTOR. È stato dimostrato che la rapamicina, inibitore di TORC1, sensibilizza le cellule al desametasone e induce sensibilità ai glucocorticoidi nelle cellule resistenti⁽¹²³⁾. Studi in topi privati del gene PTEN hanno mostrato un effetto sinergico tra i GSI e la rapamicina nel sopprimere la crescita cellulare⁽¹²⁴⁾. Alla luce di questi risultati, sono stati sintetizzati diversi derivati della rapamicina, con migliore biodisponibilità ed efficacia. Tuttavia, l'inibizione prolungata di TORC1 provoca un effetto citostatico e l'attivazione di vie alternative, limitando l'utilizzo di questi farmaci come agenti singoli⁽¹²⁵⁾. È stato, altresì, descritto un effetto sinergico tra la rapamicina ed i suoi derivati e vari chemioterapici come idarubicina, doxorubicina e desametasone⁽¹²⁶⁾; pertanto, diversi studi clinici stanno valutando l'efficacia dell'associazione dei derivati della rapamicina alla chemioterapia. In particolare, everolimus (RAD001) è stato associato a chemioterapia di re-induzione in bambini con LAL in recidiva in uno studio di fase I (CT.gov: NCT 01523977). Inoltre, si è recentemente concluso un secondo studio di fase I, volto a valutare l'efficacia del temsirolimus (CCI-779) in bambini affetti da LAL in recidiva; i risultati non sono ancora noti (CT.gov:NCT01403415). Poiché l'attivazione costitutiva di PI3K è frequente nella LAL-T, gli inibitori della via potrebbero rappresentare un'altra valida opzione terapeutica. Come già accennato, sono in corso due studi clinici volti a valutare l'efficacia del BEZ235 e NVP-BKM120 (inibitore universale di PI3K) in pazienti con LAL o LMA refrattaria o recidivata (CT.gov:NCT01756118 e CT.gov: NCT01396499, rispettivamente).

Inibitori della via JAK/STAT

Come già descritto, il ruxolitinib ha mostrato efficacia nel ridurre la proliferazione di cellule aventi mutazioni di JAK1 e IL7R. Studi *in vitro* hanno inoltre documentato l'efficacia del ruxolitinib nei confronti di cellule con delezioni o mutazioni a carico di PTPRC, un gene che codifica per il CD45, una fosfatasi che regola l'attivazione di JAK1^(102,127). Al contrario, le mutazioni di JAK3 presentano una diversa sensibilità agli inibitori della famiglia JAK. Infatti, il ruxolitinib induce inibizione della proliferazione cellulare in presenza di mutazioni del dominio pseudochinasico, ma è inefficace in presenza di mutazioni del dominio chinasico⁽¹²⁸⁾. Il tofacitinib inibisce specificamente JAK3 ed è già in uso per il trattamento di malattie autoimmuni; gli studi di Degryse e Losdyck su modelli murini hanno mostrato che è in grado di inibire la proliferazione di cellule JAK3 mutate e di indurre una regressione della massa tumorale^(128,129). È tuttavia opportuno tener presente che gli inibitori della famiglia JAK sono inefficaci in presenza di mutazioni a carico di STAT5B, che si trova a valle della cascata del segnale: in questo contesto, il navitoclax (ABT-263), un farmaco anti-BCL2, è in grado di inibirne

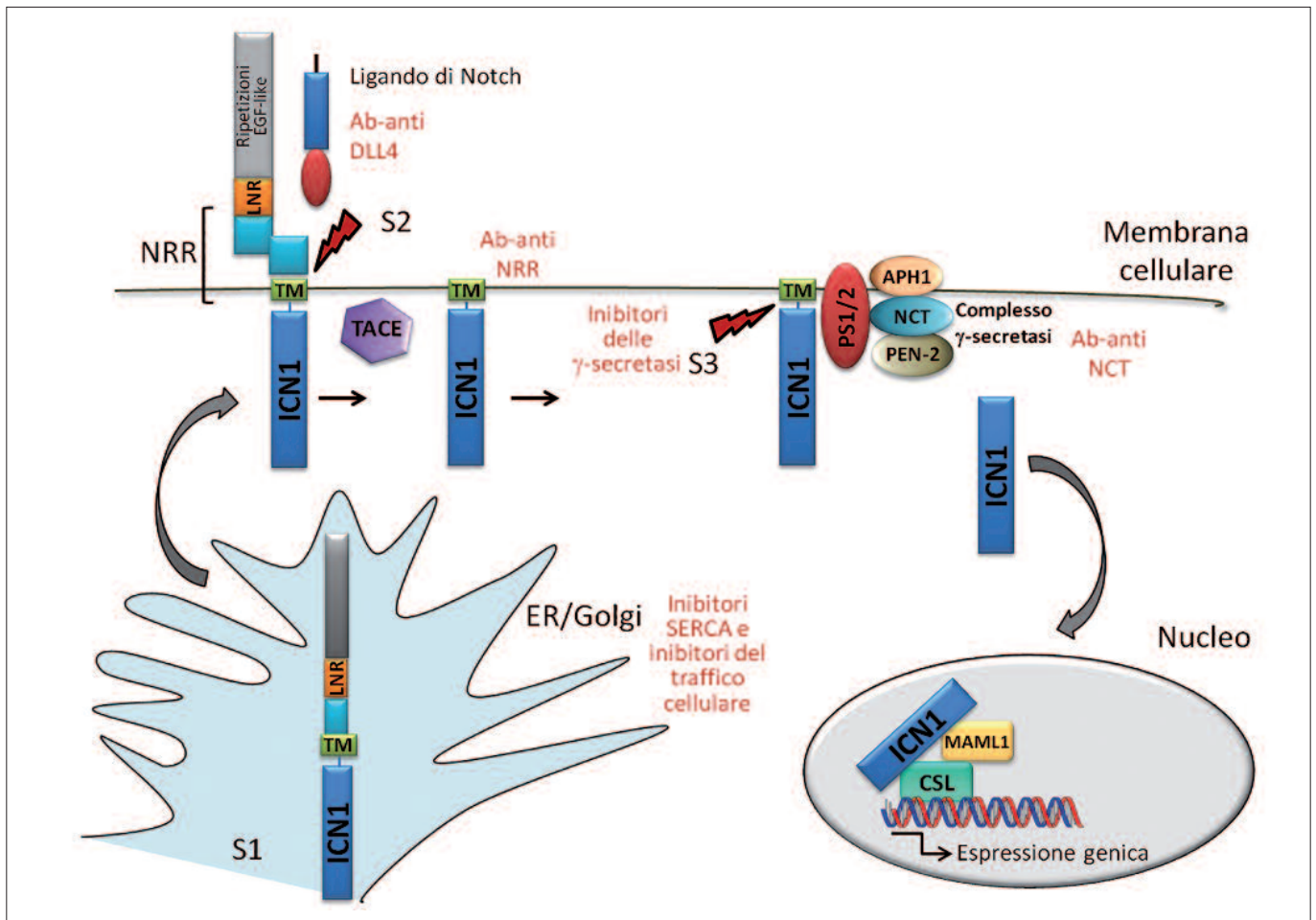


Figura 8 – Schematizzazione della via di segnalazione di NOTCH1 e farmaci inibitori. NOTCH1 è clivato da una furina (clivaggio S1) nel Golgi, quindi viene espresso sulla membrana cellulare. In condizioni fisiologiche, in seguito al legame con il ligando, NOTCH1 va incontro a due clivaggi proteolitici. L'enzima TACE, una proteasi della famiglia ADAM, è responsabile del primo clivaggio (S2) che avviene nella porzione extracellulare di NOTCH1, vicino al dominio transmembrana. Il secondo clivaggio (S3) avviene invece nel dominio transmembrana ed è mediato dal complesso delle γ-secretasi composto da 4 proteine: presenilina (PS1/2), nicastrina (NCT), APH-1, e PEN-2. Il dominio intracellulare (ICN1) libero migra nel nucleo dove lega MAML1 e CSL convertendolo da repressore ad attivatore della trascrizione. In rosso sono indicati i diversi approcci terapeutici per inibire NOTCH1 ⁽¹¹⁹⁾.

la proliferazione cellulare. Attualmente, sono in corso due studi di fase I volti a valutare l'efficacia di due diversi farmaci anti-BCL2 - rispettivamente obatoclast (GX15-070, CT.gov:NCT00933985) e oblimersen (Genasense, CT.gov:NCT00060112) - in pazienti con varie malattie ematologiche tra cui la LAL in recidiva.

Infine, è stato descritto che nello stesso paziente possono essere presenti più lesioni nello stesso gene o in geni differenti della cascata di trasduzione, amplificandone il segnale ^(94,96,108). La presenza di più alterazioni nella via del segnale può provocare resistenza all'inibitore che può essere parzialmente superata attraverso un aumento della dose. La combinazione di più inibitori potrebbe rappresentare una valida alternativa terapeutica soprattutto in questi casi.

Inibitori di ABL1

Considerando l'efficacia dei TKI nei confronti dei pazienti Ph+, questi inibitori potrebbero rappresentare un'opzione terapeutica per i pazienti affetti da LAL-T con riarrangiamenti di ABL1. È stato dimostrato che il dasatinib è in grado di inibire la proliferazione di linee cellulari

NUP214-ABL1+ e di indurre una riduzione della massa tumorale nel modello murino. È stato, inoltre, riportato che l'imatinib inibisce la proliferazione di cellule EML1-ABL1+ ^(89,130).

Altri approcci terapeutici

Terapie con AcMo

Oltre ai farmaci bersaglio menzionati nelle precedenti sezioni, gli AcMo stanno trovando applicazione nel trattamento della LAL. Tra questi l'anticorpo bi-specifico blinatumomab, l'inotuzumab ozogamicina, il rituximab, e più recentemente, le CAR-T - basate su un concetto immunoterapico - stanno fornendo risultati promettenti.

Blinatumomab

Il blinatumomab (AMG 103) appartiene a una famiglia di anticorpi bi-specifici, chiamati BiTE® (*Bispecific T-cell Engager*); deriva dalla fusione di due regioni variabili presenti in due anticorpi monoclonali a singola catena, diretti contro il CD19 ed il CD3, e legati da una

catena a cinque amminoacidi non immunogenica. L'anticorpo si lega da una parte, tramite il CD3, alle cellule T, che vengono attivate, e dall'altra alle cellule B che esprimono il CD19, inducendo una citotossicità perforino-mediata. L'antigene CD19 è espresso sulle cellule neoplastiche (mature e immature) della linea linfoide B ed attiva numerose vie del segnale (SYK, PI3K, e PLCG2), stimolando la funzione e il differenziamento delle cellule B normali, promuovendo la leucemogenesi e la capacità di auto-rinnovamento delle cellule neoplastiche ⁽¹³¹⁻¹³³⁾.

I primi studi riguardanti l'utilizzo di blinatumomab nell'uomo sono stati eseguiti su pazienti con linfoma non-Hodgkin (LNH) refrattari o recidivati, in particolare linfoma indolente, mantellare e a grandi cellule B. In considerazione dei buoni risultati ottenuti nei LNH, il blinatumomab è stato anche testato nei pazienti con LAL-B. Topp et al. hanno riportato l'esperienza di uno studio di fase II in pazienti con MMR persistente o in incremento ^(134,135). Il blinatumomab in infusione endovena continua per 4 settimane alla dose di 15 µg/m²/d seguito da 2 settimane di pausa, ha indotto una negativizzazione della MMR nell'80% dei pazienti entro 4 cicli - la maggior parte dei quali dopo il primo ciclo - e una DFS a 33 mesi del 61%. Il gruppo tedesco ha valutato l'efficacia del blinatumomab con uno studio di fase II anche in pazienti con LAL-B refrattari o recidivati ottenendo il 43% di risposte (33% di risposte ematologiche complete e 10% di risposte ematologiche incomplete) ⁽¹³⁵⁾.

Infine, è stato da poco terminato l'arruolamento ad uno studio di fase III randomizzato, volto a paragonare l'efficacia del blinatumomab verso la chemioterapia in pazienti LAL-B refrattari o recidivati (CT.gov:NCT02013167). Lo stesso farmaco è stato testato in pazienti affetti da LAL-B Ph+ refrattari o recidivati (CT.gov:NCT02000427) ⁽¹³⁶⁾.

Gli effetti collaterali che si osservano durante l'infusione di blinatumomab possono essere diversi; tra questi la sindrome da rilascio di citochine (*cytokine release syndrome*, CRS), in genere caratterizzata da febbre, brividi, ipotensione e dispnea, è dovuta alla rapida eliminazione delle cellule B da parte delle cellule T citotossiche durante le fasi iniziali del trattamento (una premedicazione con steroidi può ridurre la sintomatologia). In gran parte dei pazienti è possibile notare una leucopenia ed una ipogammaglobulinemia, con conseguente aumento del rischio di infezioni, probabilmente causate dalla deplezione delle cellule B e la redistribuzione ed attivazione delle cellule T. Inoltre, nel 15-20% dei pazienti sono stati riportati effetti sul SNC, come encefalopatia, atassia, tremori, convulsioni, disorientamento, confusione e disturbi del linguaggio.

Tali sintomi possono essere anche gravi (grado 3 o 4), ma per lo più reversibili con la sospensione temporanea del farmaco. Alla luce dei risultati ottenuti nei vari studi sopra riportati, il blinatumomab sembra offrire una terapia assai efficace per tutti i pazienti affetti da LAL-B, anche Ph+ ⁽¹³⁶⁾, sia per i casi recidivati/refrattari, che per quelli con

MMR persistente, qualificandosi quindi come uno dei farmaci più promettenti per la cura delle LAL-B. Data la capacità del blinatumomab di determinare una rapida *clearance* tumorale e la non-cross reattività con la chemioterapia, questo agente può essere considerato un'ottima terapia ponte per tutti quei pazienti candidati ad un allo-TMO. Inoltre, vista la buona tollerabilità di questo farmaco, anche pazienti anziani o comunque non eleggibili a terapie intensive o allo-TMO potranno beneficiare del suo utilizzo. Data l'elevata efficacia di questo farmaco, nel prossimo futuro è probabile che il blinatumomab verrà incorporato nel trattamento di pazienti con LAL CD19+ in prima linea.

Inotuzumab ozogamicina

In oltre l'80% dei casi, i linfoblasti B esprimono l'antigene CD22; pertanto sono stati avviati nuovi studi con anticorpi diretti contro questo antigene. Recentemente l'anticorpo anti-CD22 inotuzumab ozogamicina (CMC-544) è stato utilizzato con buoni risultati nei pazienti con LAL B refrattaria/recidivata. Tale molecola è legata alla caliceamicina, che provoca una rottura del DNA causando l'apoptosi cellulare. L'inotuzumab ozogamicina viene legato ad alta affinità dalle cellule CD22+, rapidamente internalizzato, determinando il rilascio della caliceamicina all'interno di esse.

Il suo utilizzo in linfomi aggressivi e indolenti ha mostrato buoni risultati con tossicità epatica transitoria e trombocitopenia ^(137,138). Un recente studio di fase II ha dimostrato un tasso di risposta globale del 58% con una OS di 6,3 mesi ^(139,140). La maggior parte dei pazienti rispondenti ha ottenuto una risposta, anche in termini di eradicazione della MMR, entro i primi due cicli. Sebbene questi risultati siano estremamente promettenti, è opportuno sottolineare che la risposta ottenuta non sembra essere duratura, indicando quindi che tale farmaco dovrebbe essere utilizzato come ponte ad un successivo allo-TMO. Gli eventi avversi più comuni sono neutropenia, piastrinopenia, rialzo degli indici di funzionalità epatica, febbre e ipotensione, ma prevalentemente di grado 1-2 e reversibili. Molti dei pazienti trattati, probabilmente anche per la minor tossicità del farmaco rispetto ad una chemioterapia standard, sono risultati successivamente eleggibili per un allo-TMO.

Rituximab

L'antigene di superficie CD20 è riscontrabile nel 30-50% dei precursori B ⁽¹³²⁾. Il rituximab è un AcMo chimerico, che ha trovato il suo maggiore impiego nel trattamento dei LNH; come descritto precedentemente, la sua aggiunta nel trattamento delle LAL-B mature ha ulteriormente migliorato la prognosi di questo sottogruppo ^(16,17). Più in generale, il rituximab ha trovato impiego anche negli altri sottogruppi di LAL-B CD20-positivi.

Uno studio dell'MD Anderson Cancer Center ha dimostrato l'efficacia dell'aggiunta del rituximab: nei pazienti adolescenti e giovani adulti (età ≤60 anni) CD20-positivi con LAL-B *de novo* trattati con rituximab in associazione alla chemioterapia la sopravvivenza

globale (OS) a 3 anni è stata significativamente superiore rispetto ai pazienti che hanno ricevuto solo la chemioterapia (75% vs 47%, $p=0,003$). Inoltre, la percentuale di casi che hanno ottenuto la negativizzazione della MMR - valutata con la citometria a flusso - è risultata più elevata nell'ambito dei pazienti CD20-positivi trattati con la terapia di associazione rispetto ai casi che hanno ricevuto solo la chemioterapia (81% vs 58%, $p=0,02$)⁽¹⁴¹⁾. Tuttavia, nei pazienti anziani non si è registrato un miglioramento dell'OS a 3 anni, in parte a causa dei decessi in remissione completa dovuti soprattutto ad infezioni.

In maniera simile, il GRALL (CT.gov:NCT00327678)⁽¹⁴²⁾ ha recentemente dimostrato - nell'ambito di uno studio randomizzato che paragonava la combinazione immunochemioterapica vs la sola chemioterapia - che l'aggiunta del rituximab durante tutto l'iter terapeutico in pazienti con età compresa tra 18 e 59 anni è in grado di incrementare il tasso di casi che effettuano allo-TMO, migliorare la sopravvivenza libera da eventi (EFS) (65% vs 52%, $p=0,038$) e l'OS a 2 anni, quest'ultima solo censorizzando per allo-TMO (74% vs 63%, $p=0,018$).

Terapie basate su cellule CAR-T

Il recente utilizzo di linfociti T ingegnerizzati con recettori diretti contro antigeni tumorali rappresenta un approccio nuovo e particolarmente promettente per la capacità di generare rapidamente un elevato numero di linfociti tumore-specifici⁽¹⁴³⁾.

In alternativa al fisiologico TCR, il linfocita T può essere ingegnerizzato, mediante vettori oncoretrovirali o lentivirali, con recettori chimerici per l'antigene (CAR), costituiti da un dominio di riconoscimento antigenico fuso a domini di trasduzione del segnale derivati dal complesso TCR. Questo tipo di struttura combina la specificità del riconoscimento anticorpale MHC-indipendente con le potenzialità anti-tumorali dei linfociti T, permettendo così il possibile trasferimento al linfocita T sostanzialmente di qualsiasi specificità antigenica. Questi linfociti CAR, definiti di prima generazione, hanno presentato un'importante capacità di riconoscimento della neoplasia *in vitro*, associata però ad una limitata attività antitumorale *in vivo*. Lo sviluppo di linfociti CAR di seconda generazione, che ha previsto l'aggiunta alla porzione intracellulare di domini costimolatori, si è tradotto nella generazione di cellule che presentano una maggiore capacità di produzione di citochine e di espansione. Recentemente, la combinazione di domini multipli di segnale ha permesso lo sviluppo di CAR di terza generazione ad attività ulteriormente incrementata. L'utilizzo dei linfociti CAR in protocolli di immunoterapia presenta numerosi vantaggi:

- la possibilità di utilizzare linfociti autologhi derivati dal paziente, che grazie a questa tecnologia acquisiscono la capacità di riconoscere antigeni di superficie espressi dalle cellule neoplastiche del paziente stesso;

- la capacità di riconoscimento dell'antigene secondo una modalità HLA-indipendente;
- un'applicabilità estesa a larghe coorti di pazienti.

Nel contesto dei pazienti affetti da LAL, sono riportati in letteratura alcuni studi clinici che utilizzano linfociti modificati geneticamente con un recettore chimerico specifico per l'antigene CD19. Tali esperienze sono state maturate sia nel contesto autologo che dopo allo-TMO con l'infusione di linfociti ingegnerizzati di derivazione del donatore^(144,145).

I risultati finora ottenuti sono estremamente promettenti, tanto in casistiche pediatriche che in coorti comprendenti pazienti adulti. I tassi di RC, che variano dal 50% al 90% a seconda della popolazione e dello stato di malattia, documentano lo sviluppo di un'attività tumorale anche in gruppi di pazienti altamente resistenti ai trattamenti convenzionali o recidivati dopo allo-TMO. Inoltre si stanno sperimentando nuovi CAR-T contro altri antigeni, come ad esempio il CD22.

È doveroso sottolineare che tutti gli studi, indipendentemente dal contesto in cui sono stati condotti e dai dosaggi di linfociti CAR, riportano un'elevata incidenza di importanti effetti collaterali, caratterizzati dalla possibile comparsa della CRS, da linfocitopenie B prolungate e da sindromi da anafilassi, che richiedono la disponibilità di un'unità di terapia intensiva; il miglioramento delle conoscenze dei meccanismi sottostanti la CRS e l'impiego di farmaci come tocilizumab, un AcMo diretto verso l'IL6R, potrà permettere un maggiore impiego dei CAR-T.

Conclusioni e prospettive future

In conclusione, la gestione delle LAL nel corso delle ultime due decadi è nettamente migliorata, portando a tassi di guarigione in oltre l'80% nelle casistiche pediatriche.

Sebbene negli adulti i risultati siano assai più insoddisfacenti, il riconoscimento di sottogruppi specifici sta portando ad una gestione più accurata e mirata dei pazienti. Nelle LAL Ph+, l'introduzione dei TKI ha completamente rivoluzionato la terapia e la prognosi di questi pazienti. È auspicabile che in un futuro assai prossimo, la combinazione dei TKI con approcci immunoterapici possa abrogare - almeno in una frazione di casi - la necessità del trapianto allogenico, che a tutt'oggi rappresenta l'unico approccio curativo ma che è spesso gravato da tassi variabili di morbidità e mortalità. In maniera simile, i TKI potrebbero trovare largo impiego anche nei pazienti BCR-ABL1-like.

Infine, il progressivo riconoscimento di lesioni specifiche e targetabili in altri sottogruppi di LAL B e T, e lo sviluppo di farmaci intelligenti, così come l'impiego degli AcMo - molti dei quali già utilizzati in sperimentazioni cliniche - rappresentano il requisito indispensabile per migliorare ulteriormente la prognosi di questi pazienti e rendere questa patologia più curabile.

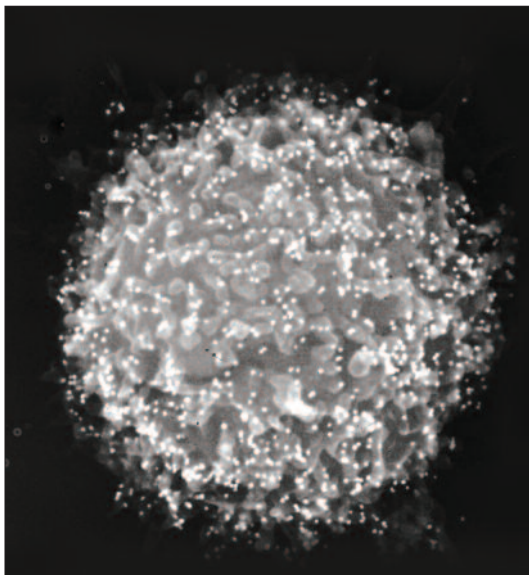
Bibliografia

- Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
- Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004;104(9):2690-96.
- Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):532-43.
- Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood*. 2007;109(3):944-50.
- Van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-317.
- Nagafuji K, Miyamoto T, Eto T, Kamimura T, Taniguchi S, Okamura T, et al. Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study). *J Hematol Oncol*. 2013;6:14.
- Vora A, Goulden N, Wade R, Mitchell C, Hancock J, Hough R, et al. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(3):199-209.
- 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;113(18):4153-62.
- Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:389-96.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
- Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 2004;104(10):3009-20.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-92.
- Magrath I. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res*. 1990;55:133-270.
- Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature*. 2012;490(7418):116-20.
- McMaster M, Greer J, Greco A, Johnson D, Wolff S, Hainsworth J. Effective treatment of small-noncleaved-cell lymphoma with high-intensity, brief-duration chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1991;9(6):941-46.
- Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Garcia-Manero G, et al. Chemotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2006;106(7):1569-80.
- Hoelzer D, Walewski J, Dohner H, Viardot A, Hiddemann W, Spiekermann K, et al. Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood*. 2014;124(26):3870-79.
- Dunleavy K, Pitaluga S, M Shovlin, Steinberg SM, Cole D, Grant C, et al. Low-Intensity Therapy in Adults with Burkitt's Lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369(20):1915-25.
- Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*. 2003;138(10):819-30.
- Chiaretti S, Vitale A, Cazzaniga G, Orlando SM, Silvestri D, Fazi P, et al. Clinical and biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. *Haematologica*. 2013;98(11):1702-10.
- Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer*. 2010;116(5):1165-76.
- Kosior K, Lewandowska-Grygiel M, Giannopoulos K. Tyrosine kinase inhibitors in hematological malignancies. *Postepy Hig Med Dosw*. 2011;65:819-28.
- Cilloni D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):930-7.
- Chiaretti S, Foà R. Management of adult Ph-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015(1):406-13.
- Weisberg E, Nonami A, Griffin JD. Combination therapy with nilotinib for drug-sensitive and drug-resistant BCR-ABL-positive leukemia and other malignancies. *Arch Toxicol*. 2014;88(12):2233-42.
- Ravandi F. Managing Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: role of tyrosine kinase inhibitors. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(2):198-203.
- Ghatalia P, Je Y, Kaymakcalan MD, Sonpavde G, Choueiri TK. QTc interval prolongation with vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer*. 2015;112(2):296-305.
- Corbin AS, La Rosée P, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood*. 2003;101(11):4611-4.
- Hantschel O, Grebien F, Superti-Furga G. The growing arsenal of ATP-competitive and allosteric inhibitors of BCR-ABL. *Cancer Res*. 2012;72(19):4890-5.
- Ohanian M, Cortes J, Kantarjian H, Jabbour E. Tyrosine kinase inhibitors in acute and chronic leukemias. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13(7):927-38.
- Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Faderl S, Jones D, Garriss 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;116(12):2070-7.
- Foà R, Vitale A, Vignetti M, Meloni G, Guarini A, De Propriis MS, et al. Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118(25):6521-8.
- Chiaretti S, Vitale A, Elia L, Fedullo AL, Albino S, Piciocchi A, et al. Multicenter total therapy GIMEMA LAL 1509 protocol for de novo adult Ph+ Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) patients. Updated results and refined genetic-based prognostic stratification. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):81.
- Khoury HJ, Guilhot F, Hughes TP, Kim DW, Cortes JE. Dasatinib treatment for Philadelphia chromosome-positive leukemias: practical considerations. *Cancer*. 2009;115(7):1381-94.
- O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Sherbenou DW, Heinrich MC, Deininger MW, et al. Combined Abl inhibitor therapy for minimizing drug resistance in chronic myeloid leukemia: Src/Abl inhibitors are compatible with imatinib. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6987-93.
- Shimoni A, Volchek Y, Koren-Michowitz M, Varda-Bloom N, Somech R, Shem-Tov N, et al. Phase 1/2 study of nilotinib prophylaxis after allogeneic stem cell transplantation in patients with advanced chronic myeloid leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2015;121(6):863-71.
- Martinelli G, Iacobucci I, Papayannidis C, Soverini S. New targets for Ph+ leukaemia therapy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22(3):445-54.
- Miller GD, Bruno BJ, Lim CS. Resistant mutations in CML and Ph(+)/ALL - role of ponatinib. *Biologics*. 2014;8:243-54.
- Jabbour E, Kantarjian H, Ravandi F, Thomas D, Huang X, Faderl S, et al. Combination of hyper-CVAD with ponatinib as first-line therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: a single-centre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2015;16(15):1547-55.
- Sanford DS, Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, Cortes J, Ravandi F. The role of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015;15(4):365-73.

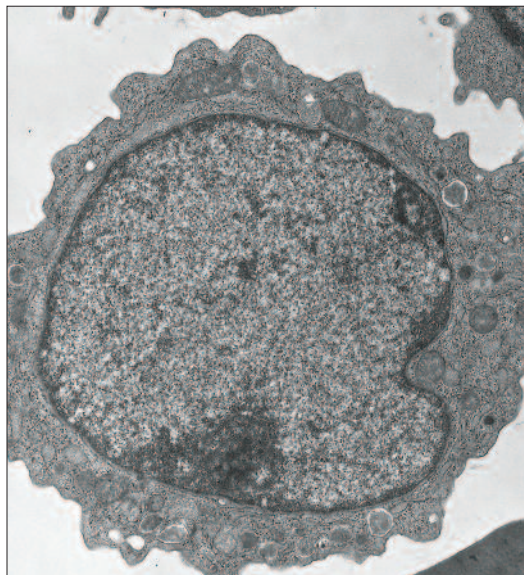
41. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293(5531):876-80.
42. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;15;12(24):7374-9.
43. Baccarani M, Soverini S, De Benedittis C. Molecular monitoring and mutations in chronic myeloid leukemia: how to get the most out of your tyrosine kinase inhibitor. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2014:167-75.
44. Soverini S, de Benedittis C, Mancini M, Martinelli G. Mutations in the BCR-ABL1 kinase domain and elsewhere in chronic myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15 Suppl:S120-8.
45. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):125-34.
46. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, Davidson GS, Bedrick EJ, et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2010;116(23):4874-84.
47. Herold T, Baldus CD, Gökbuget N. Ph-like acute lymphoblastic leukemia in older adults. *N Engl J Med*. 2014;371(23):2235.
48. Chiaretti S, Li X, Gentleman R, Vitale A, Wang KS, Mandelli F, et al. Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation. *Clin Cancer Res*. 2005;11(20):7209-19.
49. Messina M, Chiaretti S, Tavoraro S, Peragine N, Vitale A, Elia L, et al. Protein kinase gene expression profiling and in vitro functional experiments identify novel potential therapeutic targets in adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2010;116(14):3426-37.
50. 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;22(2):153-66.
51. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang YL, Pei D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1005-15.
52. Weston BW, Hayden MA, Roberts KG, Bowyer S, Hsu J, Fedoriv G, et al. Tyrosine kinase inhibitor therapy induces remission in a patient with refractory EBF1-PDGFRB-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31(25):e413-6.
53. Roberts KG, Pei D, Campana D, Payne-Turner D, Li Y, Cheng C, et al. Outcomes of children with BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3012-20.
54. Boer JM, Marchante JR, Evans WE, Horstmann MA, Escherich G, Pieters R, et al. BCR-ABL1-like cases in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between DCOG/Erasmus MC and COG/St. Jude signatures. *Haematologica*. 2015;100(9):e354-7.
55. Chiaretti S, Grammatico S, Piciocchi A, Messina M, Fedullo AL, Gianfelici V, et al. Rapid Identification of BCR/ABL1 -like Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Cases By Quantitative Real Time-PCR (Q-RT-PCR). Generation and Validation of a Predictive Statistical Model. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015 126(23):1410.
56. Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev*. 2012;26(3):123-35.
57. Ghazavi F, Lammens T, Van Roy N, Poppe B, Speleman F, Benoit Y, et al. Molecular basis and clinical significance of genetic aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol*. 2015;43(8):640-53.
58. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2015;6:6604.
59. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012;481(7380):157-63.
60. 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;45(3):242-52.
61. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881):1943-55.
62. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-52.
63. Knight T, Irving JA. Ras/Raf/MEK/ERK pathway activation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic targeting. *Front Oncol*. 2014;4:160.
64. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2011;471(7337):235-9.
65. Inthal A, Zeithofer P, Zeginigg M, Morak M, Grausenburger R, Fronkova E, et al. CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(8):1797-803.
66. Xiao H, Wang LM, Luo Y, Lai X, Li C, Shi J, et al. Mutations in epigenetic regulators are involved in acute lymphoblastic leukemia relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Oncotarget*. 2016;7(3):2696-708.
67. Andersson AK, Ma J, Wang J, Chen X, Gedman AL, Dang J, et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet*. 2015;47(4):330-7.
68. Harrison CJ. Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:118-25.
69. Brown P, Levis M, Shurtleff S, Campana D, Downing J, Small D. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood*. 2005;105(2):812-20.
70. Linger RM, Lee-Sherick AB, DeRyckere D, Cohen RA, Jacobsen KM, McGranahan A, et al. Mer receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013;122(9):1599-609.
71. Springuel L, Renaud JC, Knoops L. JAK kinase targeting in hematologic malignancies: a sinuous pathway from identification of genetic alterations towards clinical indications. *Haematologica*. 2015;100(10):1240-53.
72. Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA, Calasanz MJ, et al. De-regulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;114(13):2688-98.
73. Yoda A, Yoda Y, Chiaretti S, Bar-Natan M, Mani K, Rodig SJ, et al. Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(1):252-7.
74. Chiaretti S, Brugnolletti F, Messina M, Paoloni F, Fedullo AL, Piciocchi A, et al. CRLF2 overexpression identifies an unfavourable subgroup of adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia lacking recurrent genetic abnormalities. *Leuk Res*. 2016;41:36-42.
75. Shochat C, Tal N, Gryshkova V, Birger Y, Bandapalli OR, Cazzaniga G, et al. Novel activating mutations lacking cysteine in type I cytokine receptors in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;124(1):106-10.
76. Zenatti PP, Ribeiro D, Li W, Zuurbier L, Silva MC, Paganin M, et al. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(10):932-9.
77. Maude SL, Tasian SK, Vincent T, Hall JW, Sheen C, Roberts KG, et al. Targeting JAK1/2 and mTOR in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012;120(17):3510-8.
78. Mansour MR, Reed C, Eisenberg AR, Tseng JC, Twizere JC, Daakour S, et al. Targeting oncogenic interleukin-7 receptor signalling with N-acetylcysteine in T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2015;168(2):230-8.

79. Messina M, Chiaretti S, Wang J, Fedullo AL, Peragine N, Gianfelici V, et al. Prognostic and therapeutic role of targetable lesions in B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia without recurrent fusion genes. *Oncotarget*. 2016;7(12):13886-901.
80. Irving J, Matheson E, Minto L, Blair H, Case M, Halsey C, et al. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood*. 2014;124(23):3420-30.
81. Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, Wu G, Chen X, Edmonson M, et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2011;118(11):3080-7.
82. Annesley CE, Brown P. The Biology and Targeting of FLT3 in Pediatric Leukemia. *Front Oncol*. 2014;4:263.
83. Cooper TM, Malvar J, Cassar J, Eckroth E, Spoto R, Gaynon P, et al. A phase I study of AC220 (Quizartinib) in combination with cytarabine and etoposide in relapsed/refractory childhood ALL and AML: a therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma (TACL) study. *Blood*. 2013;122(21):624.
84. Smith CC, Lasater EA, Lin KC, Wang Q, McCreery MQ, Stewart WK, et al. Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(14):5319-24.
85. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Novel drugs for older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):760-9.
86. Chen CW, Armstrong SA. Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond. *Exp Hematol*. 2015;43(8):673-84.
87. Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schönegger A, Eckert C, Cazzaniga G, Stanulla M, et al. KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(8):1656-67.
88. Le Noir S, Ben Abdelali R, Lelorch M, Bergeron J, Sungalee S, Payet-Bornet D, et al. Extensive molecular mapping of TCR α / δ - and TCR β -involved chromosomal translocations reveals distinct mechanisms of oncogene activation in T-ALL. *Blood*. 2012;120(16):3298-309.
89. De Keersmaecker K, Graux C, Otero MD, Mentens N, Somers R, Maertens J, et al. Fusion of EML1 to ABL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia with cryptic t(9;14)(q34;q32). *Blood*. 2005;105(12):4849-52.
90. Asnafi V, Radford-Weiss I, Dastugue N, Bayle C, Leboeuf D, Charrin C et al. CALM-AF10 is a common fusion transcript in T-ALL and is specific to the TCR γ madelta lineage. *Blood*. 2003;102(3):1000-6.
91. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1(1):75-87.
92. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-71.
93. Hebert J, Cayuela JM, Berkeley J, Sigaux F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 1994;84(12):4038-44.
94. Vicente C, Schwab C, Broux M, Geerdens E, Degryse S, Demeyer S, et al. Targeted sequencing identifies association between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(10):1301-10.
95. Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y, et al. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;114(3):647-50.
96. Gianfelici V, Chiaretti S, Peragine N, Di Giacomo F, Messina M, Paoloni F, et al. Integrated analysis of JAK/STAT, RAS/AKT and NOTCH1 pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia: prognostic and therapeutic implications. *EHA Annual Meeting Abstracts*. 2015;100667.
97. Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, et al. Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*. 2008;205(4):751-8.
98. Jeong EG, Kim MS, Nam HK, Min CK, Lee S, Chung YJ, et al. Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. *Clin Cancer Res*. 2008;14(12):3716-21.
99. Asnafi V, Le Noir S, Lhermitte L, Gardin C, Legrand F, Vallantin X, et al. JAK1 mutations are not frequent events in adult T-ALL: a GRAALL study. *Br J Haematol*. 2010;148(1):178-9.
100. Kontro M, Kuusanmäki H, Eldfors S, Burmeister T, Andersson EI, Bruserud O, et al. Novel activating STAT5B mutations as putative drivers of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2014;28(8):1738-42.
101. Bandapalli OR, Schuessele S, Kunz JB, Rausch T, Strütz AM, Tal N, et al. The activating STAT5B N642H mutation is a common abnormality in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia and confers a higher risk of relapse. *Haematologica*. 2014;99(10):e188-92.
102. Porcu M, Kleppe M, Gianfelici V, Geerdens E, De Keersmaecker K, Tartaglia M, et al. Mutation of the receptor tyrosine phosphatase PTPRC (CD45) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012;119(19):4476-9.
103. Kleppe M, Lahortiga I, El Chaar T, De Keersmaecker K, Mentens N, Graux C, et al. Deletion of the protein tyrosine phosphatase gene PTPN2 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2010;42(6):530-5.
104. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):147-56.
105. Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature*. 2008;452(7188):764-7.
106. Chiaretti S, Messina M, Tavolaro S, Zardo G, Elia L, Vitale A, et al. Gene expression profiling identifies a subset of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia with myeloid-like gene features and over-expression of miR-223. *Haematologica*. 2010;95(7):1114-21.
107. Patrick K, Wade R, Goulden N, Moorman AV, Rowntree C, Jenkinson S, et al. Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol*. 2014;166(3):421-4.
108. Maude SL, Dolai S, Delgado-Martin C, Vincent T, Robbins A, Selvanathan A, et al. Efficacy of JAK/STAT pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(11):1759-67.
109. De Keersmaecker K, Lahortiga I, Mentens N, Folens C, Van Neste L, Bekaert S, et al. In vitro validation of gamma-secretase inhibitors alone or in combination with other anti-cancer drugs for the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2008;93(4):533-42.
110. Papayannidis C, DeAngelo DJ, Stock W, Huang B, Shaik MN, Cesari R, et al. A Phase 1 study of the novel gamma-secretase inhibitor PF-03084014 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. *Blood Cancer J*. 2015;5:e350.
111. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med*. 2007;13(10):1203-10.
112. Milano J, Mc Kay J, Dagenais C, Foster-Brown L, Pognan F, Gadiant R, et al. Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci*. 2004;82(1):341-58.
113. Real PJ, Tosello V, Palomero T, Castillo M, Hernandez E, de Stanchina E, et al. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 2009;15(1):50-8.
114. Hoey T, Yen WC, Axelrod F, Basi J, Donigian L, Dylla S, et al. DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency. *Cell Stem Cell*. 2009;5(2):168-77.
115. Liu Z, Turkoz A, Jackson EN, Corbo JC, Engelbach JA, Garbow JR, et al. Notch1 loss of heterozygosity causes vascular tumors and lethal hemorrhage in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(2):800-8.
116. Aste-Amezaga M, Zhang N, Lineberger JE, Arnold BA, Toner TJ, Gu M, et al. Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors. *PLoSOne*. 2010;5(2):e9094.
117. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, deLeon GP, Chen Y, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*. 2010;464(7291):1052-7.
118. Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Miyake Y, Takagi J, Sakata-Yanagimoto M, et al.

- Neutralization of the gamma-secretase activity by monoclonal anti-body against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene*. 2012;31(6):787-98.
119. Roti G, Carlton A, Ross KN, Markstein M, Pajcini K, Su AH, et al. Complementary genomic screens identify SERCA as a therapeutic target in NOTCH1 mutated cancer. *Cancer Cell*. 2013;23(3):390-405.
 120. Jenkinson S, Kirkwood AA, Goulden N, Vora A, Linch DC, Gale RE. Impact of PTEN abnormalities on outcome in pediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on the MRC UKALL2003 trial. *Leukemia*. 2016;30(1):39-47.
 121. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, Lambert J, Beldjord K, Lengline K, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-Based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *J Clin Oncol*. 2013;31(34):4333-42.
 122. Bandapalli OR, Zimmermann M, Kox C, Stanulla M, Schrappe M, Ludwig WD, et al. NOTCH1 activation clinically antagonizes the unfavorable effect of PTEN inactivation in BFM-treated children with precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(6):928-36.
 123. Gu L, Zhou C, Liu H, Gao J, Li Q, Mu D, et al. Rapamycin sensitizes T-ALL cells to dexamethasone-induced apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:150.
 124. Cullion K, Draheim KM, Hermance N, Tammam J, Sharma VM, Ware C, et al. Targeting the Notch1 and mTOR pathways in a mouse T-ALL model. *Blood*. 2009;113(24):6172-81.
 125. Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, Verstovsek S, Ravandi F, Ferrajoli A, et al. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2006;12(17):5165-73.
 126. Avellino R, Romano S, Parasole R, Bisogni R, Lamberti A, Poggi V, et al. Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*. 2005;106(4):1400-6.
 127. Raponi S, Gianfelici V, Chiaretti S, Peragine N, Brugnoletti F, De Propriis MS, et al. CD45 antigen negativity in T-lineage ALL correlates with PTPRC mutation and sensitivity to a selective JAK inhibitor. *Br J Haematol*. 2015;171(5):884-7.
 128. Degryse S, de Bock CE, Cox L, Demeyer S, Gielen O, Mentens N, et al. JAK3 mutants transform hematopoietic cells through JAK1 activation causing T-cell acute lymphoblastic leukemia in a bone marrow transplant mouse model. *Blood*. 2014;124(20):3092-100.
 129. Losdyck E, Hornakova T, Springuel L, Degryse S, Gielen O, Cools J, et al. Distinct acute lymphoblastic leukemia (ALL)-associated Janus Kinase 3 (JAK3) mutants exhibit different cytokine-receptor requirements and JAK inhibitor specificities. *J Biol Chem*. 2015;290(48):29022-34.
 130. Quintás-Cardama A, Tong W, Manshour T, Vega F, Lennon PA, Cools J, et al. Activity of tyrosine kinase inhibitors against human NUP214-ABL1-positive T cell malignancies. *Leukemia*. 2008;22(6):1117-24.
 131. Baracho GV, Miletic AV, Omori SA, Cato MH, Rickert RC. Emergence of the PI3-kinase pathway as a central modulator of normal and aberrant B cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(2):178-83.
 132. Raponi S, De Propriis MS, Intoppa S, Milani ML, 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;52(6):1098-107.
 133. 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;22(6):1207-13.
 134. Topp MS, Gökbuget N, Zugmaier G, Degenhard E, Goebeler ME, 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;120(26):5185-7.
 135. 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;16(1):57-66.
 136. Martinelli G, Dombret H, Chevallier P, Ottmann OG, Gökbuget N, Topp MS, et al. Complete molecular and hematologic response in adult patients with relapsed/refractory (R/R) Philadelphia chromosome-positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL) following treatment with blinatumomab: results from a phase 2 single-arm, multicenter study (ALCANTARA). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):679.
 137. Advani A, Coiffier B, Czuczman MS. Safety, pharmacokinetics, and preliminary clinical activity of inotuzumab ozogamicin, a novel immunoconjugate for the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase I study. *J Clin Oncol*. 2010;28(12):2085-93.
 138. DiJoseph JF, Armellino DC, Boghaert ER, Khandke K, Dougher MM, Sridharan L, et al. Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. *Blood*. 2004;103(5):1807-14.
 139. Kantarjian H, Thomas D, Jorgensen J, Jabbour E, Kebriaei P, Rytting M, et al. Inotuzumab ozogamicin, an anti-CD22-calicheamicin conjugate, for refractory and relapsed acute lymphocytic leukaemia: a phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2012;13(4):403-11.
 140. Sasaki K, Kantarjian HM, O'Brien S, Thomas DA, Ravandi F, Garcia-Manero G, et al. Salvage chemotherapy with inotuzumab ozogamicin (INO) combined with mini-hyper-CVD for adult patients with relapsed/refractory (R/R) acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2015;126(23):3721.
 141. Thomas DA, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Wierda W, et al. Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo Philadelphia chromosome-negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3880-9.
 142. Maury S, Chevret S, Thomas X, Heim D, Leguay T, Huguet F, et al. Addition of rituximab improves the outcome of adult patients with CD20-positive, Ph-negative, B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL): results of the randomized GRALL-R 2005 Study. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):1.
 143. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(26):4017-23.
 144. Lee III DW, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Fry TJ, Shah NN, Delbrook C, et al. Safety and response of incorporating CD19 chimeric antigen receptor T cell therapy in typical salvage regimens for children and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;126(23):684.
 145. Grupp SA, Maude SL, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Callahan C, et al. Durable remissions in children with relapsed/refractory ALL treated with T cells engineered with a CD19-targeted chimeric antigen receptor (CTL019). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):681.



*LAL-T: blasto linfoide al ME a scansione (anti-CD3+oro colloidale)
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).*



*LAL-B: blasto linfoide al ME a trasmissione
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).*

Parole Chiave

Leucemia acuta linfoide, principali alterazioni genetiche, bersagli terapeutici, terapie mirate

Ringraziamenti

Si ringrazia l'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) 5 x 1000 (MCO-10007), Milano, Italia; Fondo per gli investimenti della ricerca di base (FIRB, RBAP11TF7Z_003), Progetto Giovani Ricercatori 2010, Policlinico di Modena (GR-2010-2313609); Ricerca Scientifica - Anno 2015. Finanziamento Medi Progetti Universitari (a Sabina Chiaretti); Ricerca Scientifica - Anno 2015. Progetti avvio alla Ricerca Finanziamento Medi Progetti Universitari (a Monica Messina).

Indirizzi per la corrispondenza

Monica Messina

Ematologia, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia,
"Sapienza" Università di Roma
Via Benevento 6 00161, Roma
Tel: +39 06 441639824
Fax: +39 06 85795792
E-mail: messina@bce.uniroma1.it

Hairy cell leukemia

Brunangelo Falini, Enrico Tiacci



Dipartimento di Medicina, Sezione di Ematologia e Immunologia Clinica, Università degli Studi di Perugia

Introduzione

La *hairy cell leukemia* (HCL, leucemia a cellule capellute) è un raro disordine linfoproliferativo cronico a derivazione dai linfociti B maturi che colpisce per lo più soggetti di sesso maschile (rapporto M/F=4:1), di età adulta/avanzata (età mediana: 50-55 anni) e che, nella classificazione WHO dei tumori linfo-emopoietici, viene considerata come una entità clinico-patologica ben distinta ⁽¹⁾.

Dal punto di vista laboratoristico, il paziente con HCL si presenta di solito con un quadro di pancitopenia associata a marcata monocitopenia e alla presenza in circolo di una bassa percentuale di cellule leucemiche a morfologia capelluta ^(1,2).

Anche dal punto di vista clinico, l'HCL è molto peculiare dal momento che in circa l'85% dei casi il quadro anatomico-clinico è dominato dai segni e sintomi di una marcata epato-splenomegalia in assenza di significative linfadenomegalie ^(1,2). Tale quadro di presentazione clinico-laboratoristico riflette la particolare predilezione delle cellule leucemiche a infiltrare la milza, il fegato e il midollo osseo, risparmiando solitamente i linfonodi. La diagnosi di HCL si basa sul riscontro nel sangue periferico e/o midollare di cellule leucemiche con la tipica morfologia capelluta e nella biopsia osteomidollare del caratteristico quadro di infiltrazione ad uovo fritto (*fried-egg*) ⁽³⁾.

La diagnosi è poi confermata dal riscontro al citofluorimetro e/o nella biopsia osteomidollare della co-espressione degli antigeni B linfoidi (CD20 and CD22) con le molecole CD11c, CD25, CD103 e annessina A1 ⁽¹⁾. L'HCL risponde in maniera ottimale al trattamento con analoghi purinici (cladribina o pentostatina) che inducono remissioni ematologiche complete, anche di lunga durata, in circa l'85% dei pazienti ⁽²⁾.

Sebbene, a partire dalla sua prima descrizione nel 1958 ⁽⁴⁾, siano stati fatti degli incredibili passi in avanti sia nella definizione delle caratteristiche biologiche e cliniche dell'HCL che del suo trattamento, l'alterazione genetica causale di questa malattia è rimasta un enigma per oltre mezzo secolo. Molteplici sono le ragioni che, nel corso degli anni, hanno ostacolato la caratterizzazione del genoma dell'HCL ⁽⁵⁾. Innanzitutto per la scarsità del materiale disponibile per le analisi

molecolari, legata al fatto che il paziente di solito si presenta con una pancitopenia e una bassa percentuale di cellule leucemiche circolanti, e poi anche perché il tentativo di aspirare il midollo spesso si traduce in una *punctio sicca*. Infine, la milza è raramente utilizzabile come fonte di cellule per studi funzionali e molecolari dal momento che, nell'era della terapia con analoghi delle purine, l'intervento di splenectomia è effettuato solo in particolari circostanze. Altri fattori che hanno ostacolato lo studio del genoma dell'HCL sono stati il basso indice proliferativo delle cellule leucemiche, la loro incapacità a crescere in modelli di topi immunodeficienti e l'assenza di autentiche linee cellulari di HCL ⁽⁶⁾.

Gli studi di FISH/citogenetica sono stati tradizionalmente difficili da effettuare nell'HCL a causa dell'incapacità a ottenere un numero appropriato di cellule in metafase da analizzare. Questo problema può essere risolto inducendo la proliferazione delle cellule leucemiche capellute con anticorpi monoclonali anti-CD40. Questa strategia ha permesso di ottenere una mappa citogenetica in 42/43 pazienti con HCL e di dimostrare la presenza di anomalie clonali nel 19% dei casi (principalmente alterazioni numeriche e strutturali dei cromosomi 5, 7 e 14) ⁽⁷⁾.

D'altro canto, gli studi di *high-density DNA profiling* hanno dimostrato che il genoma dell'HCL è molto più stabile di quello di altri disordini linfoproliferativi cronici come la leucemia linfatica cronica-B (B-LLC) ^(8,9). Gli studi dei profili globali di espressione genica ^(5,10) e di microRNA ⁽¹¹⁾ hanno fornito importanti informazioni sull'origine dell'HCL (probabile derivazione da un linfocita B della memoria) e su alcune proprietà funzionali delle cellule leucemiche capellute ⁽¹²⁾, quali la predilezione a coinvolgere determinati siti anatomici, la presenza di estroflessioni villose sulla superficie cellulare e la fibrosi midollare ⁽¹³⁾. Tuttavia, la svolta nella caratterizzazione molecolare dell'HCL è venuta dagli studi di sequenziamento globale del genoma. Utilizzando questa tecnologia, il nostro Gruppo è riuscito nel 2011 ad identificare la mutazione BRAF V600E come l'evento genetico causale dell'HCL ⁽¹⁴⁾.

Mutazione BRAF V600E

Mutazioni puntiformi dell'oncogene BRAF furono per la prima volta identificate nel 2002 in vari tumori umani ⁽¹⁵⁾, con maggiore frequenza nel melanoma e nel carcinoma papillifero della tiroide (40-50% dei casi), e dimostrate indurre una attivazione costitutiva della via del segnale RAS-RAF-MAPK ⁽¹⁶⁾.

In generale, la mutazione più comune è denominata BRAF V600E dal momento che la sostituzione di una timina con una adenina in posizione 1799 dell'esone 15 di BRAF determina nella proteina corrispondente il cambiamento dell'aminoacido in posizione 600 da valina ad acido glutammico. A differenza di quanto si osserva in altri tumori umani che possono presentare mutazioni diverse da BRAF V600E (per esempio V600K and V600R nel melanoma), tale evenienza è estremamente rara nell' HCL.

Di fatto, tra le centinaia di casi di HCL finora sequenziali da molti gruppi nel mondo, se ne contano soltanto due con mutazioni coinvolgenti l'esone 11 (F468C and D449E) ⁽¹⁷⁾ e l'altissima frequenza della mutazione BRAF-V600E (>97% dei casi) è stata sempre confermata. Un solo gruppo ⁽¹⁸⁾ ha riportato una frequenza più bassa (79%) nella propria casistica di 53 pazienti affetti da bona fide HCL, ma 5 degli 11 casi negativi sono risultati esprimere un particolare riarrangiamento immunoglobulinico (IGHV4-34) in genere assente nella HCL.

È degno di nota il fatto che, nell' ambito delle neoplasie a derivazione B linfoide, l'HCL rappresenta l'unica condizione patologica che riconosce, come evento genetico causale, la mutazione puntiforme di una chinasi (la proteina BRAF) ⁽¹⁴⁾. Il ruolo chiave giocato da BRAF V600E nella patogenesi dell'HCL è sostenuto da varie osservazioni. In primo luogo, la mutazione è riscontrabile nella quasi totalità dei casi di HCL, indipendentemente dal quadro clinico di presentazione (presenza o meno di splenomegalia, casi con pancitopenia o leucocitosi, etc.) ⁽¹⁴⁾.

Questo elevatissimo tasso di ricorrenza della mutazione richiama quello che si osserva in altre emopatie maligne a etiopatogenesi monogenica come la leucemia acuta promielocitica e la leucemia mieloide cronica. In secondo luogo, la mutazione BRAF V600E si è rivelata estremamente stabile nel tempo, essendo sempre evidenziabile alla recidiva di malattia, anche dopo decenni dalla diagnosi iniziale e dopo molte linee di trattamento.

Inoltre, la mutazione è presente nella totalità delle cellule neoplastiche, come chiaramente documentato dall'analisi dei dati di sequenziamento (frequenza delle varianti alleliche) e di immunohistochimica con l'anticorpo monoclonale anti-BRAF V600E ⁽¹⁹⁾.

Infine, nell'ambito delle neoplasie linfoidi, la mutazione BRAF V600E è molto specifica per l'HCL ^(20, 21).

Gli studi molecolari hanno contribuito anche a meglio definire l'origine dell'HCL. Era da tempo risaputo che l'HCL deriva dalla trasformazione di un linfocita B della memoria ⁽¹⁰⁾. Più recentemente, è stato

tuttavia dimostrato che in pazienti con HCL la mutazione BRAF V600E è riscontrabile anche in cellule emopoietiche staminali o progenitrici B-linfoidi, senza però che in esse si sviluppino appieno il fenotipo tricoleucemico ⁽²²⁾.

Non è chiaro se quest'ultimo richieda un contesto epigenetico permissivo presente solo in un particolare stadio di differenziazione cellulare e/o l'accumulo di ulteriori lesioni a carico di altri geni, per esempio sono state recentemente descritte nella HCL mutazioni inattivanti di CDKN1B/p27 in circa il 16% dei casi ⁽²³⁾.

Patogenesi molecolare

La proteina chinasi BRAF è codificata dal proto-oncogene BRAF che è localizzato nel cromosoma 7 a livello della banda 7q24. BRAF è un componente fondamentale della via del segnale RAS-RAF-MEK-ERK che, in condizioni fisiologiche, si attiva a seguito del legame di una varietà di recettori tirosino-chinasici con il proprio ligando ⁽²⁴⁾ (Figura 1). Questa interazione determina l'attivazione di RAS che, a sua volta, causa il sequestro della proteina BRAF a livello della porzione interna della membrana cellulare e la sua fosforilazione a livello della treonina in posizione 599 e della serina in posizione 602 ⁽²⁴⁾. Attraverso un meccanismo a cascata, BRAF fosforilato porta all'attivazione (fosforilazione) delle chinasi MEK1 e MEK2 ⁽²⁴⁾ che, a loro volta, causano l'attivazione (fosforilazione) delle chinasi ERK1 e ERK2 (Figura 1). L'attivazione di ERK determina la sua migrazione dal citoplasma al nucleo dove esso causa la fosforilazione di altre molecole, tra cui AP-1 e NFAT, che a loro volta inducono la trascrizione di numerosi geni bersaglio che promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare ^(25, 26) (Figura 1).

Le mutazioni di BRAF (specialmente BRAF V600E) determinano una attivazione costitutiva della via del segnale RAS-RAF-MEK-ERK. Questo continuo stimolo alla proliferazione determina un vantaggio di sopravvivenza che alla fine conduce alla trasformazione neoplastica ⁽¹⁴⁾. L'attivazione della via del segnale RAS-RAF-MEK, ERK che è operativo in vari tumori solidi con mutazioni di BRAF (per esempio il melanoma), sembra svolgere un ruolo chiave anche nella patogenesi molecolare dell'HCL, come dimostrato dalle seguenti evidenze:

- le cellule leucemiche capellute mostrano, sia alle indagini di Western blotting ⁽¹⁴⁾ che di immunohistochimica ⁽²⁷⁾, una intensa fosforilazione delle chinasi MEK ed ERK;
- l'esposizione *in vitro* e *in vivo* delle cellule leucemiche capellute ad inibitori specifici di BRAF (vemurafenib, dabrafenib) (Figura 1) causa una defosforilazione di MEK ed ERK ^(14, 27, 28);
- l'attivazione costitutiva della via del segnale RAS-RAF-MEK-ERK è compatibile con l'espressione da parte delle cellule leucemiche capellute delle molecole CD11c ⁽²⁹⁾ e ciclina D1 ^(30, 31) e con la loro negatività per il regolatore del ciclo cellulare p27 ⁽³²⁻³⁴⁾.

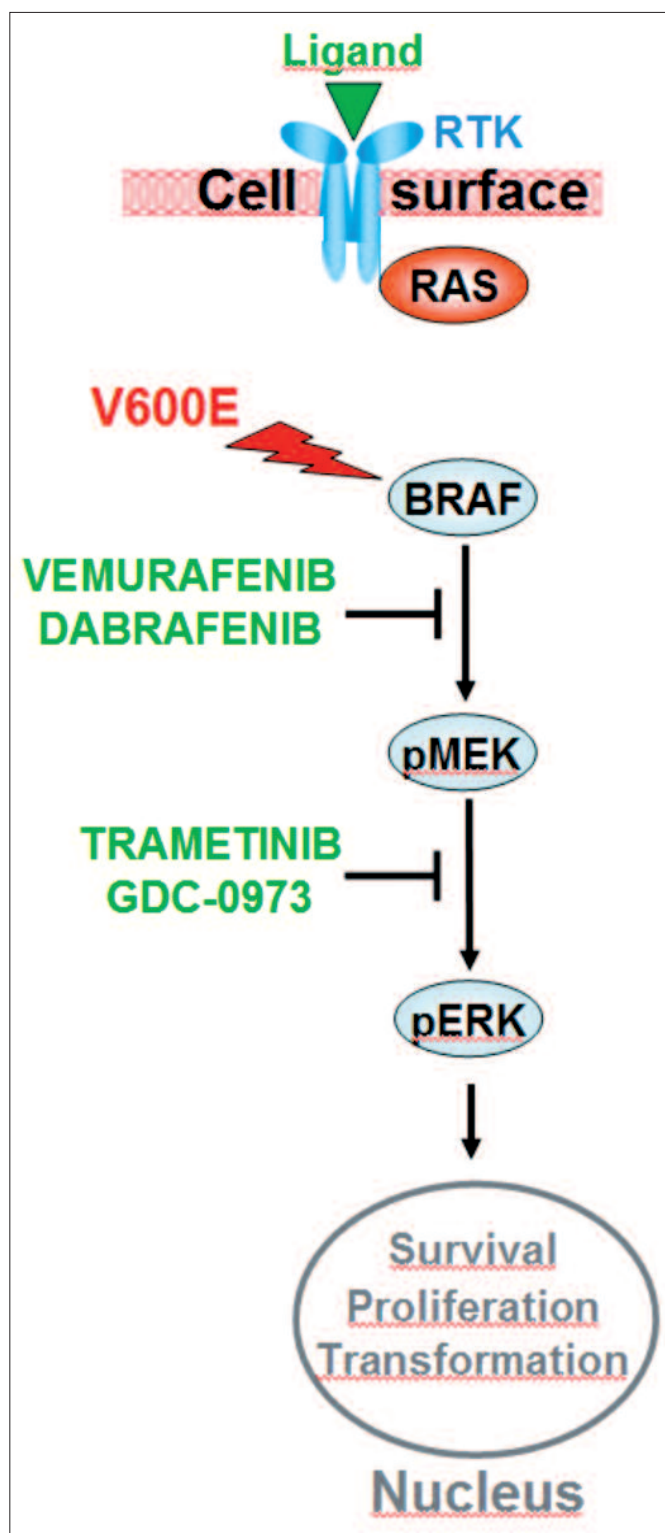


Figura 5 – The RTK-RAS-RAF-MEK-ERK pathway: La mutazione puntiforme V600E, colpendo la chinasi BRAF, ne causa l'attivazione costitutiva, svincolandola dalla fisiologica regolazione a monte esercitata, attraverso l'attivazione di RAS, dai recettori tirosino-chinasici (RTK) di membrana una volta ingaggiati dai rispettivi ligandi. La conseguente deregolata fosforilazione di MEK1/2 (fosfo-MEK) da parte di BRAF-V600E e di ERK1/2 (fosfo-ERK) da parte di fosfo-MEK trasduce nel nucleo continui segnali di sopravvivenza e proliferazione che esitano nella trasformazione neoplastica. Tale fosforilazione può essere bloccata da inibitori farmacologici clinicamente disponibili di BRAF (vemurafenib e dabrafenib) e MEK (trametinib e cobimetinib).

Diagnosi immunofenotipica e molecolare

Marcatori immunologici

Solitamente, il sospetto diagnostico di HCL viene confermato mediante studi citofluorimetrici che dimostrano il tipico immunofenotipo, caratterizzato dalla positività per antigeni B linfoidi (per es., CD20 e CD22) e dalla co-espressione delle molecole CD11c, CD25 e CD103. Grazie alla disponibilità di nuovi anticorpi monoclonali diretti contro antigeni resistenti ai fissativi degli antigeni CD11c, CD25 e CD103⁽³⁵⁾, è oggi possibile dimostrare il tipico quadro immunofenotipico dell'HCL anche su sezioni istologiche di biopsie osteomidollari fissate/decalcificate ed incluse in paraffina.

Un altro marcatore importante applicabile allo studio delle biopsie osteomidollari è l'annessina A1⁽³⁶⁾. Nell'ambito dei linfomi a cellule B, questo marcatore è specifico per la leucemia a cellule capellute ed è pertanto particolarmente utile nella diagnostica differenziale tra HCL e linfomi che morfologicamente possono simulare l'HCL (cosiddetti *HCL-like disorders*).

Va comunque ricordato che l'annessina A1 non è un buon marcatore per il monitoraggio della malattia minima residua dal momento che questa molecola è espressa anche da cellule mieloidi, da macrofagi e da una sottopopolazione di cellule linfoidi T⁽³⁶⁻³⁹⁾. In queste circostanze, è molto più affidabile l'impiego di tecniche molecolari.

Marcatori molecolari

La ricerca della mutazione BRAF V600E rappresenta un test molto specifico e sensibile per la diagnosi di HCL. La mutazione può essere dimostrata con facilità sia su campioni di sangue periferico che midollare, utilizzando la metodica di sequenziamento Sanger o tecniche di PCR più sensibili^(20, 21, 40, 41). Recentemente, è stato generato un anticorpo monoclonale (VE1) diretto contro il mutante BRAF V600E che permette la dimostrazione della mutazione direttamente su sezioni paraffinate di biopsie osteomidollari mediante tecniche immunoistochimiche⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

Diagnosi differenziale

La diagnosi di HCL si basa sulla integrazione di una serie di parametri che comprendono il quadro clinico-laboratoristico (presenza di splenomegalia in assenza di linfadenopatia, pancitopenia e monocitopenia)⁽¹⁾ in associazione alle tipiche alterazioni citologiche/istologiche^(1, 3), immunofenotipiche⁽¹⁾ e molecolari⁽²⁰⁾.

Raramente, alcuni pazienti si presentano con una minima infiltrazione midollare da HCL associata ad iperplasia midollare eritroide con note di displasia reattiva o addirittura ad un midollo osseo marcatamente ipocellulare. Tali casi possono essere erroneamente diagnosticati come sindrome mielodisplastica o aplasia midollare⁽⁴⁵⁾. In queste circostanze, una semplice colorazione immunoistochimica con l'anticorpo monoclonale anti-CD20 su sezioni paraffinate della

biopsia osteomidollare è sufficiente a indirizzare verso una diagnosi corretta. Va anche ricordato che la mastocitosi sistemica mostra nella biopsia osteomidollare un quadro morfologico simile all'HCL solitamente associato a reazione fibrotica. Il quadro clinico e le colorazioni immunoistochimiche per la molecola CD20 e per la triptasi ⁽⁴⁶⁾ sono particolarmente utili nel distinguere queste due condizioni patologiche. Inoltre la mastocitosi sistemica è costantemente BRAF V600E negativa ⁽⁴⁷⁾.

Tuttavia il problema diagnostico più comune è rappresentato dalla diagnosi differenziale tra HCL e disordini linfoproliferativi che simulano l'HCL ⁽⁴⁸⁾, come il linfoma della zona marginale splenica, la variante della leucemia a cellule capellute (HCLv) ⁽⁴⁹⁾, e il linfoma a piccoli linfociti B della polpa rossa splenica ⁽⁴⁹⁾. La corretta diagnosi di HCL è di fondamentale importanza dal momento che questa condizione patologica, ma non le altre, è sensibile al trattamento con interferone o analoghi delle purine e, più recentemente, anche con inibitori di BRAF.

Il linfoma della zona marginale splenica è chiaramente distinguibile dall'HCL sulla base dei seguenti criteri diagnostici:

- l'infiltrazione della polpa bianca splenica;
- la presenza in circolo di cellule leucemiche che mostrano estroflessioni di superficie solitamente più corte e polarizzate ⁽⁵⁰⁾ rispetto a quelle osservabili nelle cellule leucemiche capellute;
- l'infiltrazione della biopsia osteomidollare a carattere prevalentemente intrasinusoidale (ben rilevabile mediante colorazioni immunoistochimiche per la molecola CD20);
- la negatività o debole espressione per i tipici marcatori immunofenotipici dell'HCL (CD103, CD25, CD11c e Annexin A1);
- l'assenza della mutazione BRAF V600E ^(20,21) e la presenza nel 40-50% dei casi di mutazioni di geni che codificano per proteine coinvolte nelle funzioni della zona marginale splenica (per es., Notch2) ^(51,52).

Più difficile può essere distinguere la classica HCL dalla forma variante (HCLv). I criteri più importanti per la diagnosi di HCLv sono:

- la maggiore frequenza della leucocitosi (osservabile solo nel 15% dei casi di HCL);
- l'assenza di monocitopenia (spesso presente nell'HCL);
- la morfologia cellulare con caratteristiche intermedie tra quella di una cellula leucemica capelluta (morfologia villosa) e di un prolinfocita (presenza di un evidente nucleolo);
- la negatività per CD25 e l'annessina A1;
- la negatività per la mutazione BRAF V600E;
- la presenza di mutazioni che coinvolgono il gene MAP2K1 codificante per la chinasi MEK1 nel 30-50% dei casi ⁽⁵³⁾ e il riscontro della delezione 17p(TP53) in circa un terzo dei casi. Queste caratteristiche cliniche, immunofenotipiche e molecolari giustificano appieno la decisione della WHO di considerare l'HCL variante come

un'entità (provvisoria) chiaramente diversa dall'HCL classica.

Il linfoma a piccoli linfociti B della polpa rossa splenica ^(49,54) rappresenta una entità provvisoria della classificazione WHO che è solitamente ben distinguibile dalla HCL classica ma che mostra invece caratteristiche sovrapponibili a quelle dell'HCLv. La diagnosi di linfoma a piccoli linfociti B della polpa rossa splenica si basa sui seguenti criteri:

- l'infiltrazione della polpa rossa splenica da parte di una popolazione neoplastica costituita da elementi di piccola taglia, talora di aspetto plasmocitoide;
- la presenza in circolo di cellule leucemiche provviste di ampie estroflessioni della superficie di membrana con polarizzazione;
- l'infiltrazione a prevalente carattere intrasinusoidale nella biopsia osteomidollare;
- la negatività per le molecole CD25 e l'annessina A1 (come l'HCLv);
- la negatività per la mutazione BRAF V600E.

I criteri più importanti nella diagnostica differenziale tra HCL e altri disordini linfoproliferativi sono riassunti nella Tabella 1.

Terapia con inibitori di BRAF

Sebbene l'HCL sia una malattia rara, essa ha rappresentato un paradigma importante per lo sviluppo di nuove terapie, a partire dal momento del suo primo riconoscimento nel 1958 fino ad oggi. Per molto tempo, l'unica forma di terapia per l'HCL è stata l'intervento di splenectomia che consentiva solo un temporaneo miglioramento dei parametri ematologici in una modesta percentuale di pazienti.

La prognosi dell'HCL ha subito un radicale miglioramento nei primi anni 80, con l'introduzione dell'interferone ⁽⁵⁵⁾ che, somministrato per via sottocutanea per 3 volte alla settimana, era in grado di indurre una risposta parziale (raramente totale), talora duratura nel tempo, in percentuali variabili dal 40% all'80% dei pazienti a seconda degli studi ^(56,57).

Dagli anni '90, la terapia di elezione per l'HCL si basa sull'impiego (con varie modalità di somministrazione) dei cosiddetti analoghi delle purine (cladribina e pentostatina) ^(58,59) che, rispetto all'interferone (ancora impiegato nei casi in cui l'HCL interessa donne in gravidanza), inducono una remissione ematologica completa in circa l'80% dei pazienti affetti da HCL, spesso duratura negli anni. È verosimile che questi risultati possano essere ulteriormente migliorati, combinando uno degli analoghi delle purine (per esempio la cladribina) con un anticorpo monoclonale anti-CD20 (rituximab) ⁽⁶⁰⁾. Nonostante questi enormi progressi nella terapia dell'HCL, va sottolineato che circa la metà dei pazienti trattati con analoghi delle purine va incontro a successive ricadute che, nel corso del tempo, diventano sempre meno sensibili al ritrattamento con cladribina o pentostatina.

CARATTERISTICHE	HCL	SMZL	HCL-V	LBPRS
Morfologia				
Nucleo*	Ovalare, talora a chicco di caffè	Rotondeggiante	Rotondeggiante/ovalare	Rotondeggiante/ovalare, talora eccentrico
Nucleolo*	Assente	Piccolo o assente	Evidente nucleolo	Piccolo o assente
Citoplasma*	Abbondante, chiaro	Moderatamente abbondante, basofilo, talora con aspetti plasmocitoidi	Abbondante	Moderatamente abbondante, basofilo, talora con aspetti plasmocitoidi
Superficie cellulare	Estroflessioni distribuite in tutta la superficie	Estroflessioni a distribuzione polare	Estroflessioni	Estroflessioni corte a distribuzione polare
Quadro di infiltrazione midollare	Diffuso ed interstiziale	Nodulare e intrasinusoidale	Diffuso, interstiziale ed intrasinusoidale	Intrasinusoidale, interstiziale e nodulare
Infiltrazione splenica	Polpa rossa, con obliterazione della polpa bianca	Polpa bianca	Polpa rossa	Diffuso (polpa rossa e bianca)
Immunofenotipo e lesioni genetiche				
Marcatori immunologici	CD20br+, CD5-, CD10-, CD23-CD103+, CD25+, CD11c+, CD123+, Annessina A1+, BRAF V600E +**	CD20+, CD5-, CD10-, CD23-CD103+, CD25-/+, CD11c+/-, CD123-, Annessina A1-, BRAF V600E - **	CD20br+, CD5-, CD10-, CD23-CD103+, CD25-, CD11c+, CD123-, Annessina A1-, BRAF V600E-**	CD20br+, CD5-/+, CD10-, CD23-/+, CD103-/+, CD25-, CD11c+, CD123-, Annessina A1-, BRAF V600E-**
Lesioni genetiche	Mutazione BRAF V600E	Del(7q) in circa il 40% dei casi, mutazione NOTCH2 in circa il 25% dei casi	Mutazione di MAP2K1 nel 30-50% dei casi 17p(TP53) delezione in circa il 30% dei casi	Del(7q) o trisomia 8 in una percentuale di casi

*In strisci colorati secondo la tecnica di May-Grunwald-Giemsa; ** Evidenziato con anticorpo monoclonale anti-BRAF V600E in sezioni paraffinate.
HCL: leucemia a cellule capellute; SMZL: linfoma della zona marginale splenica; HCLv, leucemia a cellule capellute, variante; LBPRS: linfoma a piccoli linfociti B della polpa rossa splenica.

Tabella 1 – Diagnosi differenziale tra HCL e disordini linfoproliferativi cronici affini (SMZL, HCL-V, LBPRS).

Inoltre, specialmente nel paziente anziano, la somministrazione ripetuta di farmaci mielotossici tende a ridurre progressivamente la riserva midollare, con conseguente incremento nel rischio di complicanze infettive. Da qui, la necessità di mettere a punto nuove modalità terapeutiche.

Tale opportunità è oggi offerta dalla disponibilità di farmaci attivi contro la proteina BRAF mutata che originariamente erano stati messi a punto per la terapia del melanoma metastatico ⁽⁶¹⁾ e che, più recentemente, sono stati impiegati per il trattamento di pazienti con HCL refrattaria o recidivata.

Studi pre-clinici

In assenza di un modello murino ⁽⁵⁾ e di vere linee cellulari di HCL ⁽⁶⁾, gli effetti degli inibitori di BRAF (vemurafenib e dabrafenib) e di MEK (trametinib) (Figura 1) sono stati necessariamente valutati *in vitro* su cellule leucemiche capellute purificate da pazienti (compito non facile data la bassa percentuale di cellule leucemiche circolanti) ⁽²⁸⁾. Come atteso, gli inibitori di BRAF e di MEK erano in grado di determinare una marcata defosforilazione di MEK/ERK attivati sol-

tanto nelle cellule leucemiche capellute ma non in altri linfomi affini (linfoma della zona marginale splenica, HCLv) ⁽²⁸⁾. Cosa altrettanto interessante, questi inibitori erano in grado di indurre il silenziamento della via del segnale BRAF-MEK-ERK, di convertire il tipico profilo di espressione genica dell'HCL, di ridurre l'espressione del CD25 e della TRAP (due marcatori diagnostici di HCL), di provocare un cambiamento nella superficie di membrana (che passa da capelluta a liscia) e di indurre l'apoptosi delle cellule leucemiche ⁽²⁸⁾. Questi risultati hanno fornito la base razionale per l'impiego di inibitori di BRAF in clinica.

Studi clinici

L'attività clinica degli inibitori di BRAF è stata inizialmente riportata in casi singoli aneddotici ⁽⁶²⁻⁶⁹⁾. Più recentemente, sono stati pubblicati i risultati di due studi clinici di fase II, uno condotto in Italia e l'altro negli Stati Uniti; che hanno arruolato complessivamente 54 pazienti affetti da HCL refrattaria o recidivata (spesso resistenti a molteplici linee di terapia) ⁽⁷⁰⁾. In entrambi gli studi, il vemurafenib veniva assunto per via orale al dosaggio standard di 960 mg x 2/die.

Nei 49 pazienti valutabili si è osservata una risposta al farmaco che è stata del 96% nella coorte di pazienti italiani e del 100% in quella dei pazienti americani, con una percentuale di remissione completa nelle due coorti rispettivamente del 35% e 42% ⁽⁷⁰⁾. Solitamente i pazienti rispondevano al farmaco nel giro di 2-4 mesi. Nella coorte di pazienti italiani, che hanno un follow up più lungo, la sopravvivenza mediana libera da recidiva di malattia è stata di 19 mesi nei casi che erano andati in remissione completa e di 6 mesi in quelli che avevano ottenuto una remissione parziale ⁽⁷⁰⁾.

Il profilo di tossicità del vemurafenib nell'HCL è stato molto simile a quello riportato in precedenti studi clinici in pazienti con melanoma metastatico ⁽⁷¹⁻⁷³⁾.

In particolare, gli eventi avversi sono stati osservati principalmente a livello cutaneo ed articolare (altralgie e artriti) ed hanno richiesto una temporanea interruzione o riduzione di dosaggio del farmaco nel 50-58% dei pazienti arruolati nei due studi ⁽⁷⁰⁾. Solitamente, le artralgie rispondono bene alla somministrazione di steroidi, anche a basse dosi. Gli eventi avversi cutanei consistevano principalmente in rash, fotosensibilità, papillomi cutanei, ipercheratosi palmare o plantare. Tumori cutanei secondari erano osservati in 7/50 pazienti (14%) ed erano tutti trattati con semplice escissione chirurgica ⁽⁷⁰⁾. Il meccanismo d'azione che sta alla base dell'insorgenza di questi tumori cutanei (specialmente cheratoacantoma e carcinoma a cellule squamose) è riferibile ad una stimolazione paradossa di BRAF normale all'interno dei cheratinociti quando questi siano portatori di una mutazione di RAS (specialmente HRAS) ⁽⁷⁴⁾.

Il grande vantaggio del vemurafenib rispetto agli agenti chemioterapici standard (analoghi delle purine) è rappresentato dall'assenza di tossicità midollare. Pertanto, oltre che nei pazienti resistenti ai trattamenti standard, il loro impiego appare particolarmente utile in pazienti con scarse riserve midollari (per danno alla cellula staminale normale da precedenti chemioterapie) e in pazienti che, al momento della diagnosi iniziale, hanno una infezione opportunistica grave ⁽⁷⁵⁾.

Meccanismi di resistenza agli inibitori di BRAF

A fronte delle straordinarie risposte ottenibili con il vemurafenib nell'HCL refrattaria/recidivata, va tuttavia sottolineato che anche nei pazienti in remissione ematologica completa persiste una piccola quota di cellule leucemiche capellute resistenti all'inibitore di BRAF che, alle indagini immunoistochimiche, mostra spesso una persistente fosforilazione di ERK. Questa osservazione suggerisce fortemente che, in almeno una percentuale di pazienti, le cellule leucemiche capellute sono ancora dipendenti per la loro sopravvivenza dalla via del segnale RAS-RAF-MEK-ERK riattivata attraverso meccanismi che riescono ad aggirare l'inibizione di BRAF.

A differenza di quello che si osserva nella leucemia mieloide cronica in cui la resistenza ai vari inibitori delle tirosino-chinasi è prevalentemente legata a mutazioni della proteina Abl, mutazioni secondarie

di BRAF non sembrano essere implicate come fattore di resistenza agli inibitori di BRAF. Almeno nel melanoma, sono stati identificati vari meccanismi che, mutando o inducendo l'espressione e/o l'attivazione di molecole poste a diversi livelli della via del segnale RAS-RAF-MEK-ERK sono in grado di ripristinarla determinando così l'insorgenza di una resistenza agli inibitori di BRAF ⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾. I meccanismi finora identificati in linee tumorali *in vitro* sono molteplici e quelli confermati nei pazienti includono:

- l'attivazione di recettori tirosino-chinasici, per esempio MET ⁽⁷⁹⁾ mediata da fattori del microambiente, per esempio HGF, che può portare alla riattivazione della via del segnale RAS-RAF-MEK-ERK attraverso CRAF, nonché all'attivazione di una via alternativa di segnale pure pro-oncogenica (PI3K-AKT);
- le mutazioni di NRAS ⁽⁸⁰⁾ che promuovono la riattivazione della via del segnale RAS-RAF-MEK-ERK preferenzialmente attraverso CRAF ⁽⁸¹⁾;
- le mutazioni attivanti di molecole poste a valle di BRAF (mutazioni di MEK) ⁽⁸²⁾;
- la sovraespressione di COT (il prodotto del gene *MAP3K8*) ⁽⁸³⁾, una proteina chinasi che può evadere l'azione degli inibitori di BRAF perché è in grado di attivare ERK attraverso un meccanismo MEK-dipendente che però non richiede il segnale di RAF;
- l'amplificazione del numero di copie del mutante di BRAF ⁽⁸⁴⁾;
- lo *splicing* alternativo del mutante BRAF che porta alla formazione di una proteina più piccola in grado di formare dei dimeri che sfuggono all'azione degli inibitori di BRAF ⁽⁸⁵⁾.

Tuttavia, rimane ancora da chiarire se i meccanismi di resistenza operanti nel melanoma sono gli stessi responsabili della mancata eradicazione totale del clone leucemico da parte del vemurafenib nei pazienti con HCL. In almeno un caso di HCL nello studio clinico di fase 2, la resistenza al vemurafenib era verosimilmente imputabile all'acquisizione di mutazioni di KRAS ⁽⁷⁰⁾. Studi funzionali *in vitro* e di sequenziamento globale del genoma di cellule primarie di pazienti affetti da HCL prima e dopo l'esposizione ad inibitori di BRAF contribuiranno in futuro a chiarire i meccanismi di resistenza operanti nell' HCL.

Prospettive future

Dal punto di vista biologico, sforzi sono in atto per generare un modello murino di HCL, finora mancante, che potrebbe essere di aiuto sia per studi funzionali che per la messa a punto di nuove forme di terapia. Strategie terapeutiche future nell'HCL prevedono l'impiego in combinazione di un inibitore di BRAF e di un inibitore di MEK, in maniera da bersagliare la via del segnale RAS-RAF-MAPK a due livelli. Almeno nel melanoma, questo approccio ha contribuito a migliorare la percentuale delle risposte, a ritardare i meccanismi di resistenza prolungando così la durata della remissione e a ridurre la percentuale di tumori cutanei secondari ⁽⁸⁶⁾.

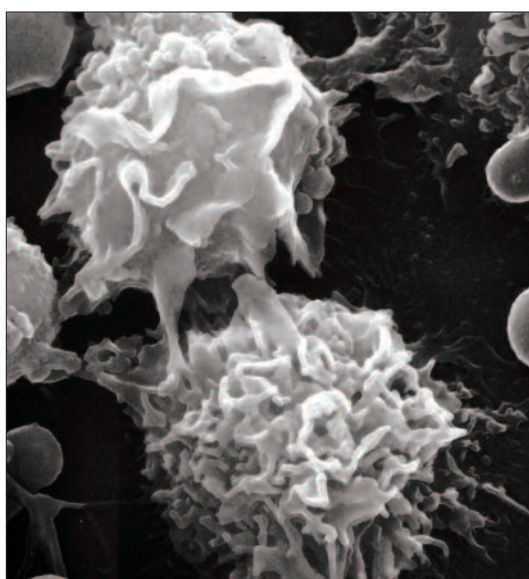
Un'altra strategia promettente, attualmente in studio presso la nostra Istituzione, è l'impiego del vemurafenib in combinazione con l'anticorpo monoclonale anti-CD20 al fine di eradicare con l'immunoterapia la frazione di cellule resistenti al vemurafenib. Infine, per il futuro si prospetta anche la possibilità di una terapia a tre farmaci e cioè: inibitore di BRAF + inibitore di MEK + immunoterapia. Tutte queste combinazioni hanno il vantaggio di non essere mielotossiche.

Bibliografia

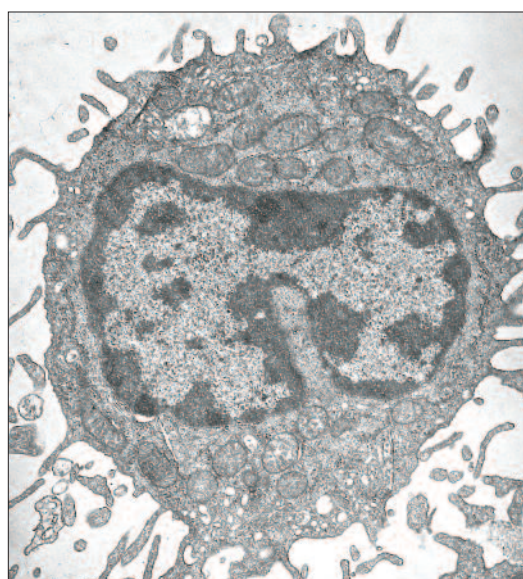
1. Foucar K., Falini B, Catovsky D, Stein H. Hairy cell leukaemia. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H et al. eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC). 2008:188-90.
2. Grever MR. How I treat hairy cell leukemia. *Blood*. 2010;115(1):21-8.
3. Burke JS, Rappaport H. The diagnosis and differential diagnosis of hairy cell leukemia in bone marrow and spleen. *Semin Oncol*. 1984;11(4):334-46.
4. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood*. 1958;13(7):609-30.
5. Tiacci E, Liso A, Piris M, Falini B. Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(6):437-48.
6. Tiacci E, Pucciarini A, Bigerna B, Pettrossi V, Strozzi F, Martelli MP, et al. Absence of BRAF-V600E in the human cell lines BONNA-12, ESKOL, HAIR-M, and HC-1 questions their origin from hairy cell leukemia. *Blood*. 2012;119(22): 5332-3.
7. Kluin-Nelemans HC, Beverstock GC, Mollevanger P, Wessels HW, Hoogendoorn E, Willemze R, et al. Proliferation and cytogenetic analysis of hairy cell leukemia upon stimulation via the CD40 antigen. *Blood*. 1994;84(9):3134-41.
8. Forconi F, Poretti G, Kwee I, Sozzi E, Rossi D, Rancoita PM, et al. High density genome-wide DNA profiling reveals a remarkably stable profile in hairy cell leukaemia. *Br J Haematol*. 2008;141(5):622-30.
9. Hockley SL, Morgan GJ, Leone PE, Walker BA, Morilla A, Else M, et al. High-resolution genomic profiling in hairy cell leukemia-variant compared with typical hairy cell leukemia. *Leukemia*. 2011;25(7):1189-92.
10. Basso K, Liso A, Tiacci E, Benedetti R, Pulsoni A, Foa R, et al. Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *J Exp Med*. 2004; 199(1):59-68.
11. Kitagawa Y, Brahmachary M, Tiacci E, Dalla-Favera R, Falini B, Basso K. A microRNA signature specific for hairy cell leukemia and associated with modulation of the MAPK-JNK pathways. *Leukemia*. 2012;26(12):2564-7.
12. Cawley JC, Hawkins SF. The biology of hairy-cell leukaemia. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(4):341-9.
13. Burthem J, Cawley JC. The bone marrow fibrosis of hairy-cell leukemia is caused by the synthesis and assembly of a fibronectin matrix by the hairy cells. *Blood*. 1994;83(2):497-504.
14. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011;364(24):2305-15.
15. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
16. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855-67.
17. Tschernitz S, Flossbach L, Bonengel M, Roth S, Rosenwald A, Geissinger E. Alternative BRAF mutations in BRAF V600E-negative hairy cell leukaemias. *Br J Haematol*. 2014;165(4):529-33.
18. Xi L, Arons E, Navarro W, Calvo KR, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, et al. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2012;119(14):3330-2.
19. Akarca AU, Shende VH, Ramsay AD, Diss T, Pane-Foix M, Rizvi H, et al. BRAF V600E mutation-specific antibody, a sensitive diagnostic marker revealing minimal residual disease in hairy cell leukaemia. *Br J Haematol*. 2013;162(6):848-51.
20. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, Ambrosetti A, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood*. 2012;119(1):192-5.
21. Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, Riboni R, Rattotti S, Varettoni M, et al. The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood*. 2012;119(1):188-91.
22. Chung SS, Kim E, Park JH, Chung YR, Lito P, Teruya-Feldstein J, et al. Hematopoietic stem cell origin of BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia. *Sci Transl Med*. 2014;6(238):238ra71.
23. Dietrich S, Hullein J, Lee SC, Hutter B, Gonzalez D, Jayne S, et al. Recurrent CDKN1B (p27) mutations in hairy cell leukemia. *Blood*. 2015;126(8):1005-8.
24. Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*. 2011;223(2):219-29.
25. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002;12(1):9-18.
26. Flockhart RJ, Armstrong JL, Reynolds NJ, Lovat PE. NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2009;101(8): 1448-55.
27. Tiacci E, Schiavoni G, Martelli MP, Boveri E, Pacini R, Tabarrini A, et al. Constant activation of the RAF-MEK-ERK pathway as a diagnostic and therapeutic target in hairy cell leukemia. *Haematologica*. 2013;98(4):635-9.
28. Pettrossi V, Santi A, Imperi E, Russo G, Pucciarini A, Bigerna B, et al. BRAF inhibitors reverse the unique molecular signature and phenotype of hairy cell leukemia and exert potent antileukemic activity. *Blood*. 2015;125(8):1207-16.
29. Nicolaou F, Teodoridis JM, Park H, Georgakis A, Farokhzad OC, Bottinger EP, et al. CD11c gene expression in hairy cell leukemia is dependent upon activation of the proto-oncogenes ras and junD. *Blood*. 2003;101(10):4033-41.
30. Miranda RN, Briggs RC, Kinney MC, Veno PA, Hammer RD, Cousar JB. Immunohistochemical detection of cyclin D1 using optimized conditions is highly specific for mantle cell lymphoma and hairy cell leukemia. *Mod Pathol*. 2000; 13(12):1308-14.
31. Roovers K, Davey G, Zhu X, Bottazzi ME, Assoian RK. Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell*. 1999;10(10):3197-204.
32. Chilosi M, Chiarle R, Lestani M, Menestrina F, Montagna L, Ambrosetti A, et al. Low expression of p27 and low proliferation index do not correlate in hairy cell leukaemia. *Br J Haematol*. 2000;111(1):263-71.
33. Bhatt KV, Spofford LS, Aram G, McMullen M, Pumiglia K, Aplin AE. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. *Oncogene*. 2005;24(21):3459-71.
34. Bhatt KV, Hu R, Spofford LS, Aplin AE. Mutant B-RAF signaling and cyclin D1 regulate Cks1/S-phase kinase-associated protein 2-mediated degradation of p27Kip1 in human melanoma cells. *Oncogene*. 2007;26(7):1056-66.
35. Morgan EA, Yu H, Pinkus JL, Pinkus GS. Immunohistochemical detection of hairy cell leukemia in paraffin sections using a highly effective CD103 rabbit monoclonal antibody. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(2):220-30.
36. Falini B, Tiacci E, Liso A, Basso K, Sabattini E, Pacini R, et al. Simple diagnostic

- assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet*. 2004;363(9424):1869-70.
37. Sadik W, Coupland S, Thachil J. Hairy cell leukaemia, negative for conventional cell markers, diagnosed using antibodies to annexin A1 and T-bet. *Br J Haematol*. 2010;151(3):207.
38. Wotherspoon A, Attygalle A, Sena Teixeira Mendes L. Bone marrow and splenic histology in hairy cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015;28(4):200-7.
39. Toth-Liptak J, Piukovics K, Borbenyi Z, Demeter J, Bagdi E, Krenacs L. A comprehensive immunophenotypic marker analysis of hairy cell leukemia in paraffin-embedded bone marrow trephine biopsies—a tissue microarray study. *Pathol Oncol Res*. 2015;21(1):203-11.
40. Schnittger S, Bacher U, Haferlach T, Wendland N, Ulke M, Dicker F, et al. Development and validation of a real-time quantification assay to detect and monitor BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia. *Blood*. 2012;119(13):3151-4.
41. Boyd EM, Bench AJ, van 't Veer MB, Wright P, Bloxham DM, Follows GA, et al. High resolution melting analysis for detection of BRAF exon 15 mutations in hairy cell leukaemia and other lymphoid malignancies. *Br J Haematol*. 2011;155(5):609-12.
42. Andrulis M, Penzel R, Weichert W, von Deimling A, Capper D. Application of a BRAF V600E mutation-specific antibody for the diagnosis of hairy cell leukemia. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(12):1796-800.
43. Uppal G, Ly V, Wang ZX, Bajaj R, Solomides CC, Banks PM, et al. The utility of BRAF V600E mutation-specific antibody VE1 for the diagnosis of hairy cell leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(1):120-5.
44. Brown NA, Betz BL, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson KS, Lim MS, Bailey NG. Evaluation of allele-specific PCR and immunohistochemistry for the detection of BRAF V600E mutations in hairy cell leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(1):89-99.
45. Lee WM, Beckstead JH. Hairy cell leukemia with bone marrow hypoplasia. *Cancer*. 1982;50(10):2207-10.
46. Li WV, Kapadia SB, Sonmez-Alpan E, Swerdlow SH. Immunohistochemical characterization of mast cell disease in paraffin sections using tryptase, CD68, myeloperoxidase, lysozyme, and CD20 antibodies. *Mod Pathol*. 1996;9(10):982-8.
47. Hagglund H, Sander B, Ahmadi A, Gulen T, Nilsson G. Analysis of V600E BRAF and D816V KIT mutations in systemic mastocytosis. *Med Oncol*. 2014;31(8):123.
48. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Meeus P, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma*. 1994;14 Suppl 1:57-61.
49. Piris M, Foucar K, Mollejo M, Campo E, Falini B. Splenic B-cell lymphoma/leukaemia, unclassifiable. In: Swerdlow SHea, editor. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edition ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.
50. Melo JV, Robinson DS, Gregory C, Catovsky D. Splenic B cell lymphoma with "villous" lymphocytes in the peripheral blood: a disorder distinct from hairy cell leukemia. *Leukemia*. 1987;1(4):294-8.
51. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Brusca G, Rasi S, Spina V, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med*. 2012;209(9):1537-51.
52. Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, Zhao L, Weigelin HG, Chiang MY, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med*. 2012;209(9):1553-65.
53. Waterfall JJ, Arons E, Walker RL, Pineda M, Roth L, Killian JK, et al. High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34-expressing hairy-cell leukemias. *Nat Genet*. 2014;46(1):8-10.
54. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, Morel D, Gazzo S, Ffrench M, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood*. 2008;111(4):2253-60.
55. Quesada JR, Reuben J, Manning JT, Hersh EM, Gutterman JU. Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 1984;310(1):15-8.
56. Federico M, Frassoldati A, Lamparelli T, Foa R, Brugiatelli M, Annino L, et al. Long-term results of alpha interferon as initial therapy and splenectomy as consolidation therapy in patients with hairy cell leukemia. Final report from the Italian Cooperative Group for HCL. *Ann Oncol*. 1994;5(8):725-31.
57. Grever M, Kopecky K, Foucar MK, Head D, Bennett JM, Hutchison RE, et al. Randomized comparison of pentostatin versus interferon alfa-2a in previously untreated patients with hairy cell leukemia: an intergroup study. *J Clin Oncol*. 1995;13(4):974-82.
58. Spiers AS, Moore D, Cassileth PA, Harrington DP, Cummings FJ, Neiman RS, et al. Remissions in hairy-cell leukemia with pentostatin (2'-deoxycoformycin). *N Engl J Med*. 1987;316(14):825-30.
59. Piro LD, Carrera CJ, Carson DA, Beutler E. Lasting remissions in hairy-cell leukemia induced by a single infusion of 2-chlorodeoxyadenosine. *N Engl J Med*. 1990;322(16):1117-21.
60. Ravandi F, O'Brien S, Jorgensen J, Pierce S, Faderl S, Ferrajoli A, et al. Phase 2 study of cladribine followed by rituximab in patients with hairy cell leukemia. *Blood*. 2011;118(14):3818-23.
61. Shelledy L, Roman D. Vemurafenib: First-in-Class BRAF-Mutated Inhibitor for the Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Adv Pract Oncol*. 2015;6(4):361-5.
62. Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, von Kalle C, Ho AD, Zenz T. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(21):2038-40.
63. Follows GA, Sims H, Bloxham DM, Zenz T, Hopper MA, Liu H, et al. Rapid response of biallelic BRAF V600E mutated hairy cell leukaemia to low dose vemurafenib. *Br J Haematol*. 2013;161(1):150-3.
64. Peyrard F, Re D, Ginet C, Gastaud L, Allegra M, Ballotti R, et al. Low-dose vemurafenib induces complete remission in a case of hairy-cell leukemia with a V600E mutation. *Haematologica*. 2013;98(2):e20-2.
65. Munoz J, Schlette E, Kurzrock R. Rapid response to vemurafenib in a heavily pre-treated patient with hairy cell leukemia and a BRAF mutation. *J Clin Oncol*. 2013;31(20):e351-2.
66. Samuel J, Macip S, Dyer MJ. Efficacy of vemurafenib in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(3):286-8.
67. Bailleux C, Robert G, Ginet C, Re D, Thyss A, Sudaka I, et al. Successful re-treatment of a relapsed V600E mutated HCL patient with low-dose vemurafenib. *Oncoscience*. 2015;2(1):44-9.
68. Vergote V, Dierickx D, Janssens A, Verhoef G, Tousseyn T, Vandenberghe P, et al. Rapid and complete hematological response of refractory hairy cell leukemia to the BRAF inhibitor dabrafenib. *Ann Hematol*. 2014;93(12):2087-9.
69. Blachly JS, Lozanski G, Lucas DM, Grever MR, Kendra K, Andritsos LA. Cotreatment of hairy cell leukemia and melanoma with the BRAF inhibitor dabrafenib. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015;13(1):9-13.
70. Tiaci E, Park JH, De Carolis L, Chung SS, Broccoli A, Scott S, et al. Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(18):1733-47.
71. Flaherty KR, Keith T, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(9):809-19.
72. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-16.
73. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*. 2012;366(8):707-14.
74. Su F, Viros A, Milagre C, Trunzer K, Bollag G, Spleiss O, et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med*. 2012;366(3):207-15.
75. Maurer H, Haas P, Wengenmayer T, Lubbert M, Duyster J, Zeiser R. Successful vemurafenib salvage treatment in a patient with primary refractory hairy cell leukemia and pulmonary aspergillosis. *Ann Hematol*. 2014;93(8):1439-40.
76. Wagle N, Emery C, Berger ME, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol*. 2011;29(22):3085-96.
77. Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov*. 2014;4(1):80-93.
78. Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Fung C, Hyman J, et al. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical

- impact. Clin Cancer Res. 2014;20(7):1965-77.
79. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. Nature. 2012;487(7408):500-4.
 80. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. Nature. 2010;468(7326):973-7.
 81. Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutson TE, et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2013;31(14):1767-74.
 82. Marusiak AA, Edwards ZC, Hugo W, Trotter EW, Girotti MR, Stephenson NL, et al. Mixed lineage kinases activate MEK independently of RAF to mediate resistance to RAF inhibitors. Nat Commun. 2014;5(3901):1-11.
 83. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. Nature. 2010;468(7326):968-72.
 84. Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. Nat Commun. 2012;3:724.
 85. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF (V600E). Nature. 2011;480(7377):387-90.
 86. Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. Ther Adv Med Oncol. 2016;8(1):48-56.



Hairy cells al ME a scansione
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).



Hairy cell al ME a trasmissione
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri).

Parole Chiave

Leucemia a cellule capellute, BRAF, mutazioni, terapia

Indirizzi per la corrispondenza

Brunangelo Falini

Dipartimento di Medicina, Sezione di Ematologia
e Immunologia Clinica, Università di Perugia

Tel: +39 075 5783190

Fax: +39 075 5783834

E-mail: brunangelo.falini@unipg.it

ESSERCI.

Con un tumore del sangue è difficile pensare ad altro. Celgene sviluppa terapie contro le sindromi mielodisplastiche che danno più tempo per vivere i momenti. Le persone. La tua vita.

celgene.com

Improving the lives of patients worldwide.



Linfoma di Hodgkin



Andrea Gallamini¹, Anna Borra²

¹Département Recherche, Innovation et Statistique Centre A. Lacassagne. 33, Rue de Valombrese, 06129 Nice Cedex-2, France

²SC Ematologia Azienda Ospedaliera S. Croce e Carle Via M. Coppino, 26 12100 Cuneo, Italia.

Introduzione

Il linfoma di Hodgkin (LH) costituisce il modello di riferimento per moltissime neoplasie ematologiche e solide: numerose procedure diagnostiche, prognostiche e di approccio terapeutico in oncologia si sono ispirate al LH. Pensiamo all'evoluzione del concetto di stadiazione tumorale: in nessun'altra malattia oncologica la definizione della massa tumorale e lo studio dei meccanismi di diffusione della malattia ha raggiunto la accuratezza ottenuta nel LH. Nella ricerca della procedura ottimale per la definizione dello stadio, da un approccio totalmente chirurgico si è passati ad un approccio radiologico, inteso come descrizione anatomica della massa tumorale e, in tempi più recenti, ad una definizione del volume tumorale metabolicamente attivo, mediante *imaging* funzionale.

Lo *staging* del LH ha costituito l'ossatura della proposta di stadiazione per tutti i linfomi e, successivamente, del sistema TMN in oncologia solida; la conoscenza dei meccanismi di diffusione tumorale e la presenza di solidi indicatori prognostici ha permesso il raggruppamento a fini terapeutici dei pazienti affetti da LH in tre gruppi principali con intensità e modalità di cura specifici.

La complessità dell'approccio diagnostico e terapeutico in tale malattia ha permesso l'interazione tra clinici, patologi, chirurghi, fisici, radioterapisti, radiologi, medici nucleari e dall'approccio interdisciplinare tra queste diverse figure professionali sono scaturite proposte innovative straordinarie, che spesso sono diventate riferimento anche per altre affezioni oncologiche. Il presente capitolo riporta gli aspetti principali della gestione del LH nei suoi aspetti di clinica, diagnostica, prognosi, stadiazione e risposta alla terapia, di programmazione terapeutica di 1° e 2° linea, e infine delle peculiarità di tale affezione nell'anziano.

Cenni Storici

La prima descrizione del LH venne fatta dal medico inglese Sir Thomas Hodgkin nel 1832 nella sua opera *"On Some Morbid Appearance of the Absorbent Glands and Spleen"*⁽¹⁾, in cui veniva descritta una nuova malattia, spesso coesistente alla tubercolosi, ma differente da

essa per un significativo incremento dei linfonodi e del volume della milza, e con prognosi nettamente peggiore. Solo vent'anni più tardi grazie a Samuel Wilks, la descrizione del morbo di Hodgkin prese la connotazione di malattia a se stante, riconoscendo tuttavia al pioniere Sir Thomas Hodgkin il primato della prima descrizione.

La conferma istologica della scoperta di una nuova malattia avvenne a pochi anni di distanza (1898 e 1902) all'alba del XX secolo, quando le tecniche di preparazione campionaria e la qualità dei microscopi ottici permisero in maniera del tutto indipendente una descrizione dettagliata del peculiare tessuto patologico del LH, presente nelle linfoghiandole e nella milza del paziente.

Gli aspetti cito-morfologici di tale tessuto dimostravano la presenza di una popolazione cellulare prevalente di aspetto polimorfo, infiammatorio e di alcune cellule abnormi, di grandi dimensioni, binucleate o multilobate, che in seguito sarebbero state denominate cellule di Hodgkin e Reed-Sternberg (HRS). In Europa, Carl Sternberg e negli Stati Uniti Dorothy Reed riconobbero nelle HRS la caratteristica istologica e la controparte neoplastica del LH.

Epidemiologia

L'incidenza del LH in Europa è di 2,2-3 casi nuovi su 100.000 abitanti per anno, con una mortalità di 0,7 casi su 100.000 abitanti per anno. In Italia nel 2014⁽²⁾ l'incidenza dei nuovi casi nei maschi si è attestata intorno ai 1300 per anno e nelle femmine è di poco inferiore contando 1000 casi, con una prevalenza di un sesto circa rispetto all'incidenza di tutti i linfomi non Hodgkin (LNH) e molto al di sotto delle comuni neoplasie solide epiteliali, i cosiddetti *Big Killer*, il carcinoma polmonare e il carcinoma della mammella.

La malattia è più frequente nel sesso maschile, con un'incidenza maggiore nella razza bianca rispetto alle popolazioni del sud-est asiatico come Cina e Giappone, e predilige la popolazione ad elevato standard socio economico. Le fasce di età maggiormente interessate sono l'infanzia nei paesi in via di sviluppo o la tarda adolescenza (18-29 anni) nell'emisfero occidentale, e l'età avanzata, dopo i sessant'anni, secondo un caratteristico profilo d'incidenza bimodale.

Patogenesi

Nel 1987 si ebbe finalmente la conferma della natura clonale del LH e la controparte cellulare normale da cui prendono origine le HRS venne identificata nella popolazione di linfociti B del centro germinativo del follicolo linfatico. Da tali studi si sono potute isolare, mediante sofisticate tecniche di micro-dissezione, popolazioni pure di HRS e con metodiche di immunoistochimica e di biologia molecolare si concluse che ⁽³⁾:

- nella cellula HRS il normale programma di espressione fenotipica del linfocita B era ancora riconoscibile, seppure in forma difettiva;
- nel DNA delle HRS era presente un ri-arrangiamento dei geni delle catene pesanti delle immunoglobuline nella quasi totalità dei casi, in maniera non differente da quanto riscontrato nei più comuni LNH della linea B;
- in circa un terzo dei casi l'agente immortalizzante e responsabile della trasformazione neoplastica dei B-linfociti era il virus di Epstein-Barr (EBV), più comunemente nella forma classica (sottotipo a sclerosi nodulare e cellularità mista), rispetto alla variante con prevalenza linfocitaria nodulare ⁽⁴⁾.

Il LH presenta inoltre un'architettura estremamente interessante e caratterizzata da un ristretto numero di cellule tumorali immerse in un microambiente ricco di cellule immuno-reattive. La popolazione polimorfa del microambiente, ritenuta espressione di una risposta immunitaria difettiva dell'ospite contro il tumore, non solo risulta inefficace ma sembra addirittura promuovere l'immortalizzazione e la proliferazione delle cellule neoplastiche. Queste ultime, a loro volta, sono spinte a proliferare e a sfuggire al loro normale destino apoptotico grazie alla presenza di proteine di attivazione nucleare come il NFkB, a loro volta indotte dall'infezione da parte dell'EBV. L'idea di una stretta correlazione tra la patogenesi del LH e l'infezione da EBV è stata dimostrata da alti livelli di immunoglobuline specifiche anti-EBV e dall'espressione sulla membrana cellulare delle HRS di proteine indotte dal virus quali LMP-1 e LMP-2 ⁽⁵⁾.

Un'ulteriore ipotesi per spiegare la scarsa competenza immunitaria dell'ospite contro il tumore risiede nell'associazione tra particolari aplotipi del locus A del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (HLA-A*01 e HLA-A*02) e la prevalenza di LH correlato a EBV. La spiegazione di tale associazione suggerisce, per i pazienti con aplotipo HLA-A*01, un'anomala presentazione dei peptidi antigenici di membrana di origine virale LMP-1 e LMP-2 da parte dei macrofagi presentanti l'antigene (APC), con conseguente assenza di cloni T citotossici (CTL) ^(6,7).

I pazienti omozigoti per tale locus hanno inoltre una frequenza 10 volte maggiore di malattia correlata ad EBV rispetto a pazienti con aplotipo HLA-A*02. I meccanismi con cui il virus EBV favorisce l'inibizione delle difese dell'ospite contro il linfoma sono comunque molteplici: inibisce la sintesi di proteine di trasporto dell'antigene (TAP) e l'espressione sulla superficie cellulare dell'HLA di classe I

che sono normalmente coinvolte nell'attivazione della risposta innata NK attraverso i recettori KIRs (*Missing Self Hypothesis*) ⁽⁸⁾. Questa osservazione spiegherebbe in parte l'assenza quasi completa delle cellule NK nell'infiltrato immunitario che circonda le cellule neoplastiche e nel sangue del paziente con LH ^(9,10).

Diagnostica istopatologica

Secondo la classificazione WHO del 2008 ⁽¹¹⁾ il LH si suddivide in 4 differenti sottotipi: sclero nodulare (NS), a cellularità mista (CM), ricco di linfociti (LR), e a deplezione linfocitaria (LD). NS e CM sono le forme più frequenti e con percentuali dell'80% circa per NS e 20-25% per CM, mentre LR e LD insieme non superano il 5% dei casi. A parte viene considerato il sottotipo a prevalenza linfocitaria nodulare (NLPHL), una volta classificato da Lukes e Parker come paragranuloma, che costituisce il 5% di tutti i LH (Tabella 1). Come già accennato in precedenza, nell'istotipo LH classico la cellula neoplastica caratteristica è la cellula HRS.

Quest'ultima si presenta come un elemento cellulare di grandi dimensioni, con citoplasma abbondante, è quasi sempre provvista di doppio nucleo, spesso eccentrico e provvisto di nucleolo evidente. Per questo tipico aspetto, questo elemento cellulare in passato è stato definito ad occhi di civetta. Nel sottotipo a SN ampie fibre di collagene circondano aggregati nodulari di cellule di HRS, dette anche cellule lacunari più o meno confluenti fra di loro. Quando questi aggregati cellulari contenenti cellule lacunari pleomorfe confluenti e cellule HRS sono numerosi si parla di variante sinciziale. Nella variante a CM ciò che prevale in misura variabile è il ricco infiltrato reattivo con cellule HRS che si presentano mummificate per fenomeni di apoptosi dei nuclei e condensazione del citoplasma. La forma classica ricca in linfociti è caratterizzata dalla infiltrazione più o meno massiva da parte di piccoli linfociti maturi disposti in architettura prevalentemente nodulare che circondano fino a quasi sequestrare le cellule di RS. Nella forma a deplezione linfocitaria, gli elementi del pabulum reattivo sono virtualmente assenti. La forma nodulare a prevalenza linfocitaria (NLPHL) ha come elemento neoplastico tipico la cellula LP (*Lymphocyte Predominant*) anche detta a popcorn per il nucleo multilobato con multipli nucleoli. Meno fre-

HISTOLOGIC SUBTYPES 2008 WHO CLASSIFICATION OF HODGKIN LYMPHOMA

Classical Hodgkin lymphoma

- Nodular sclerosis (NS)
- Lymphocyte rich (LR)
- Mixed cellularity (MC)
- Lymphocyte depletion (LD)

Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma

Tabella 1 – Classificazione del LH e dei sottotipi istologici, WHO 2008 ⁽¹¹⁾.

quente della forma classica e quasi assente è l'infiltrato reattivo e la fibrosi, tale caratteristica rende indispensabile l'Immunofenotipo, indispensabile per la diagnosi differenziale della forma classica a con la forma a deplezione linfocitaria.

Immunofenotipo

La cellula HRS presenta un fenotipo caratteristico con negatività del CD45, tenue positività di CD20 e PAX-5 e intensa espressione di CD30 e CD15. Caratteristica è l'espressione del CD30, a localizzazione paranucleare e nell'apparato del Golgi, condivisa con i linfomi T anaplastici, e la debole espressione del CD20. L'intensa espressione di CD30 ha fornito il razionale per la sintesi di un anticorpo monoclonale umanizzato, l'SGN-35 o brentuximab, diretto contro questo epitopo e coniugato con un'immunotossina, la mono-metil-aunistatina A (MMA) ⁽¹²⁾. La cellula HRS esprime inoltre i marcatori dell'infezione da virus EBV come EBER e LMP1 nel 30-40% casi.

Le cellule LP della forma nodulare a prevalenza linfocitaria esprimono il CD45 ed i marcatori di linea B come il PAX-5, CD19, CD20, CD22 e CD79a rendendo virtualmente la forma non classica una forma borderline tra il LH classico con cui condivide in parte l'istologia e la presentazione clinica ed i linfomi non Hodgkin indolenti a cellule B, con cui condivide per contro gli schemi di trattamento. Da non dimenticare l'infiltrato reattivo, la ricca componente cellulare del microambiente (ME), lungamente definito spettatore innocente ora sempre più chiaramente coinvolto nella patogenesi della malattia e di cui fanno parte i linfociti B maturi, eosinofili, mastzellen, cellule follicolari dendritiche CD21 positive, macrofagi CD68 positivi ed i linfociti T helper follicolari (THF) che esprimono i marcatori immunofenotipici CD4, CD57, MUM-1 e PD1. Quest'ultimo marcatore è coinvolto anch'esso come target dei nuovi farmaci immunomodulatori ⁽¹³⁾.

Quadro clinico

La presentazione clinica nel LH è tipicamente caratterizzata dalla graduale comparsa di linfo-adenomegalie superficiali o profonde, per lo più in assenza di sintomatologia soggettiva. Il paziente classicamente riferisce un incremento dimensionale del linfonodo (o dei linfonodi) verificatosi nel corso di settimane o a volte anche mesi, non dolente, talora con oscillazioni spontanee di volume, che alla palpazione si rivela di consistenza duro-parenchimatosa e mobile sui piani profondi. Le sedi più interessate dalla malattia sono quelle laterocervicali e sovra-claveari (60%), mediastiniche (20%) inguinali (7%) ascellari (5%) e altro (8%). Non sempre il LH è accompagnato da una sintomatologia sistemica: alcune volte una vaga astenia e la comparsa di una tumefazione linfonodale possono rimanere misconosciute per molto tempo, in altri casi invece un interessamento mediastinico all'origine può diventare una voluminosa massa (*bulky*) che comprime e disloca le strutture circostanti, spesso asintomatica

o talora accompagnata da tosse stizzosa. In qualche caso la sintomatologia di esordio è una febbre isolata di tipo intermittente-remitte (in passato definita come febbre di Pel-Ebstein) ma che spesso presenta la caratteristica di non avere caratteristiche; in altri casi il prurito intenso e diffuso *sine materia* è l'unica avvisaglia della malattia. In passato i sintomi di esordio più frequenti, presenti nel 25-30% dei casi, sono stati definiti dalla classificazione di Ann Arbor sintomi B, e sono: la febbre o febbre serotina, con puntate non inferiori ai 38 °C, la perdita di peso uguale o superiore al 10% del peso corporeo negli ultimi sei mesi e le sudorazioni notturne. Queste ultime non sono correlate alla febbre ma alle citochine, e sono descritte in maniera caratteristica dal paziente come abbondanti e tali da dover cambiare i propri indumenti e le lenzuola più volte nel corso della notte. Altro sintomo meno comune e non compreso nei sintomi B, ma non infrequente, è il dolore in sede di linfadenomegalia dopo l'assunzione di alcolici. Sono stati riportati in letteratura casi di LH associati o preceduti da malattie autoimmuni quali artrite reumatoide, valvulopatia cardiaca post-reumatica, malattia di Crohn, polimialgia reumatica nelle femmine e artrite reumatoide, *Lupus erythematoses* sistemico, anemia megaloblastica, e spondilite anchilosante ⁽¹⁴⁾. Dal momento che la sopravvivenza a 5 anni per le femmine come per i maschi è risultata in questi casi nettamente inferiore (46,0% vs. 63,3% e 48,5% vs. 59,2%, rispettivamente) ⁽¹⁴⁾, la consapevolezza del significato clinico di tale associazione risulta essenziale. In altri rari casi il LH si è manifestato all'esordio con un quadro del tutto simile alla mielofibrosi, con pancitopenia, epatosplenomegalia, aspirato midollare con *punctio sicca* per fibrosi midollare e presenza di sintomi sistemici ⁽¹⁵⁾. Tale quadro può essere sincrono o precedere la diagnosi di LH da qualche mese fino a oltre 2 anni. Alla biopsia ossea raramente viene dimostrata la presenza di cellule HRS. Quando compaiono manifestazioni più tipiche del LH quali linfadenomegalie superficiali o profonde, la diagnosi viene per lo più effettuata su biopsia linfonodale o con la splenectomia. La prognosi può essere identica a quella dei pazienti senza manifestazioni mielofibrotiche, ma un diffuso interessamento osteomidollare condiziona una prognosi peggiore. Dopo un approfondito esame clinico ed obbiettivo, è suggerita la esecuzione di esami di primo livello come: un esame emocromocitometrico nella ricerca di modesta anemia, leucocitosi neutrofila o linfopenia, il quadro proteico e il dosaggio delle proteine totali, la lattico deidrogenasi (LDH), enzimi epatici e funzionalità renale ed una velocità di sedimentazione eritrocitaria. Il rilevamento di parametri aspecifici di infiammazione costituisce un reperto comune nel LH all'esordio. Una radiografia del torace è utile per rivelare la presenza di un allargamento mediastinico, ma anche escludere la presenza di un infiltrato flogistico polmonare o una neoplasia polmonare. La ecografia dell'addome può essere utile per confermare la presenza di epato/splenomegalia e per dimostrare la presenza di epatomegalie profonde. Gli organi ipocon-

driaci (milza e fegato) si presentano ingranditi all'esordio di malattia nel 10-15% dei casi. Una volta sospettata la possibile natura maligna della linfadenomegalia, è necessario effettuare una biopsia linfonodale per la conferma istologica. Ancorché molto diffuso, l'agoaspirato con ago sottile da linfonodo ingrandito o da massa patologica risulta inutile ai fini diagnostici

- per i noti problemi di campionamento,
- per la sopra-accennata rarità delle HRS nel tessuto Hodgkiniano
- per l'impossibilità di eseguire una corretta diagnosi differenziale con altre patologie linfoproliferative con fenotipo simile a quella del LH classico e spesso ritarda l'intero iter diagnostico della malattia ⁽¹⁶⁾. Uno screening esclusivamente citologico mediante aspirazione con ago sottile è consigliabile solo nei casi in cui venga utilizzata come strumento preliminare di diagnostica differenziale in un fondato sospetto con neoplasie di competenza otorinolaringoiatrica. Esami più approfonditi come la TAC *total-body* con mezzo di contrasto (CeCT) e la TC-PET sono per lo più utilizzati nell'indicazione allo *staging* quando sia già acquisita la diagnosi istopatologica di LH. La progressione della malattia avviene normalmente per via linfatica, da stazione a stazione linfonodale contigua e, successivamente, per contiguità assiale, coinvolgendo le regioni sovra o sotto diaframmatiche a seconda della zona di partenza, ed infine, nelle fasi più avanzate, anche per via ematogena.

Più recentemente il concetto di diffusione della malattia secondo modalità legate alla gravità o alla estensione della malattia è stato rivisto, e alcuni aspetti dipendenti dall'ospite, quali la tolleranza della immunità nativa contro il tumore o aspetti immunogenetici, sembrano avere un ruolo predominante sulla modalità di presentazione e diffusione della malattia, in particolar modo sulle localizzazioni extra-linfatiche. Una volta completato l'iter diagnostico e di stadiazione della malattia, andranno richiesti alcuni accertamenti per valutare l'idoneità del paziente al trattamento, secondo gli standard clinici in uso nella Istituzione Onco-ematologica a cui il paziente è affetto. In generale questi accertamenti comprendono: lo screening per virus HIV dell'immunodeficienza umana e della epatite (HAV, HBV, HCV, CMV), una valutazione della *performance* miocardica tramite ecocardiogramma 2D, la funzionalità respiratoria con studio dei volumi statici e dinamici ventilatori nonché della diffusione alveolo-capillare con un test di capacità polmonare (DLCO) e il test di gravidanza in donne in età fertile.

Stadiazione e ristadiazione

Background

Il LH da sempre è considerato l'archetipo per la definizione di stadiazione della malattia in oncologia. La stadiazione secondo Ann Arbor ⁽¹⁷⁾ proposta all'inizio degli anni settanta e le successive modifiche proposte nel *meeting* di Cotswolds ⁽¹⁸⁾ hanno introdotto il concetto che le manifestazioni legate alla malattia e l'estensione della

massa tumorale identificano categorie distinte di pazienti con prognosi differente e che necessitano diversi approcci terapeutici. La proposta di quattro stadi per identificare estensioni crescenti della malattia (stadio I: malattia localizzata in singola regione linfonodale; stadio II malattia localizzata in 2, o più stazioni linfonodali dalla medesima parte del diaframma; stadio III: malattia estesa a due o più stazioni linfonodali da entrambi i versanti del diaframma; stadio IV: malattia con interessamento di organi extra-linfatici) è valida ancora oggi e costituisce lo strumento per identificare la intensità e la modalità di cura per le diverse categorie di pazienti. A causa delle limitate possibilità diagnostiche messe a disposizione dalle tecniche di imaging disponibili al tempo delle proposte di stadiazione secondo Ann-Arbor, specie per quanto riguarda le localizzazioni addominali del LH, è stata proposta la stadiazione chirurgica della malattia, mediante laparotomia, splenectomia e biopsia intraoperatoria del fegato ⁽¹⁹⁾. Queste procedure hanno avuto il merito di ampliare le conoscenze sui meccanismi di diffusione della malattia, che si pensava avvenisse principalmente per via linfatica ma, almeno nelle fasi tardive della malattia, anche per via ematogena.

Tali procedure tuttavia si rivelarono di non facile attuazione nella intera categoria di pazienti e per di più gravate da una certa morbidità e persino mortalità; per tale ragione vennero ben presto soppiantate da metodiche di imaging considerate all'epoca all'avanguardia, come la linfografia e specialmente la tomografia assiale computerizzata (TAC) con infusione di mezzo di contrasto.

Quest'ultima si è dimostrata uno strumento diagnostico non invasivo, disponibile su larga scala per tutti i pazienti e dotato di un'elevata sensibilità e specificità. L'esecuzione in sequenza della TAC con mezzo di contrasto, seguita dalla laparotomia esplorativa, principalmente negli studi eseguiti in California, ha permesso di stabilire con precisione la sensibilità, la specificità e la accuratezza globale della TAC per la stadiazione della malattia sottodiaframmatica ⁽¹⁹⁾.

Gradatamente si è passati dalla stadiazione chirurgica alla stadiazione radiologica e la TAC con mezzo di contrasto è rimasta, per oltre un decennio, lo strumento diagnostico standard per la stadiazione e la ristadiazione non solo dell'LH ma anche di tutti i linfomi.

Nello stesso periodo, sulla base di numerosi studi retrospettivi sulla prognosi, si è fatto strada il concetto che sia la massa tumorale in se stessa sia la reazione dell'ospite erano entrambi correlati alla prognosi della malattia e i fattori prognostici sono stati suddivisi in tre grandi gruppi:

- fattori legati al tumore;
- fattori legati all'ospite;
- fattori legati all'ambiente ⁽²⁰⁾.

I fattori legati al tumore includono il sottotipo istologico, i marcatori biologici dipendenti dalla neoplasia stessa e l'entità della massa tumorale. I fattori legati all'ospite comprendono età, comorbidità, infezioni virali e immunità nativa contro il tumore.

STAGING AND TREATMENT APPROACHES

	Stage (Ann Arbor)			
Risk Factor	IA, IB, IIA	IIB	IIIA, IIIB	IVA, IVB
No	Early Favourable		Advanced	
≥ 3 or more sites	Early unfavourable			
Elevated ESR				
Large mediastinal mass				
Extranodal disease				

- **Early stage favourable:** HD10 trial: Median f.u. 7.5 years, 2x ABVD + 20Gy IFRT as effective as 4 x ABVD + 30Gy¹
- **Early stage unfavourable:** HD11 trial: BEACOPP did not improve outcome over 4 x ABVD + 30 Gy IFRT²
- **Advanced:** Under 60s – 6/8 x ABVD or BEACOPP esc + 30Gy, BEACOPP esc superior FFTF and OS but inc toxicity³
- Can FDG-PET predict which patients can be treated with chemotherapy alone?³

ESR – esoinophil sedimentation rate; ABVD – adriamycin, bleomycin, vinblastin, dacarbazine; IFRT – Involved field radiation therapy; BEACOPP – bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prednisone; FFTF – freedom from treatment failure; OS – overall survival; FDG-PET – FDG-positron emission tomography

1. Engert A et al. NEJM. 2010; 363: 640-52;
 2. Eich H et al. J Clin Oncol. 2010;28:4199-206;
 3. Eichenauer D et al. Ann Oncol 2014;25:iii70–75

Figura 1 – Gruppi prognostici in funzione delle strategie terapeutiche.

I fattori ambientali includono lo stato socio-economico del paziente e l'accesso a procedimenti diagnostici e terapeutici tecnologicamente evoluti. Sia i fattori legati al tumore che i fattori legati all'ospite concorrono alla definizione della terapia più efficace nell'LH in stadio precoce (stadio I e II) ^(21,22) e stadio avanzato (III e IV) ⁽²³⁾. In pratica, lo stadio e i fattori legati all'ospite sono utilizzati sia per identificare i tre gruppi di pazienti da trattare in maniera omogenea: stadi precoci favorevoli, stadi precoci sfavorevoli e stadi avanzati (Figura 1) sia per la creazione di modelli prognostici per gli stadi precoci e per gli stadi tardivi (Tabella 2, Figura 2) ⁽²⁴⁾.

Agli inizi degli anni '90, contemporaneamente all'affacciarsi di nuove tecniche diagnostiche in oncologia, i limiti della stadiazione e ristadiatione con imaging statico di tipo anatomico divennero evidenti. La possibilità di identificare la presenza di tessuto neoplastico metabolicamente attivo e quindi vitale, grazie alla presenza di un tracciante quale il 18-fluoro deossiglucosio (FDG) ha permesso di aumentare in modo decisivo la sensibilità e la accuratezza globale della PET nella stadiazione e ristadiatione dell'LH.

All'inizio degli anni '90 il sistematico utilizzo della PET nella stadiazione del LH ha riclassificato come stadi più avanzati fino al 25% dei pazienti, principalmente per migrazione da stadio III a IV, ma

	EORTC	GHLG	Canadian HDSC
Risk Factors	Large mediastinal mass	Large mediastinal mass	Large mediastinal mass
	Age > 50 y.	Extranodal disease	Age > 40 y.
	ESR > 50 mm	ESR > 50 mm	ESR > 40
	≥ 4 involved regions	≥ 3 involved regions	≥ 3 involved regions

Tabella 2 – Fattori prognostici negli stadi precoci (I e II) di malattia.

anche, in misura minore, da stadio II a stadio III o IV ⁽²⁵⁾. Di conseguenza, la strategia terapeutica veniva modificata in circa il 6-9% dei pazienti. Una conseguenza ancora più rilevante della capacità della PET e in generale dell'imaging funzionale di rilevare la presenza di tessuto metabolicamente attivo, risulta particolarmente importante nel LH in cui la ristadiatione con TAC al termine del trattamento permette di riscontrare la presenza di una massa residua in oltre due terzi dei pazienti, senza che questo reperto condizioni un esito negativo della terapia nella maggior parte dei pazienti ^(26,27).

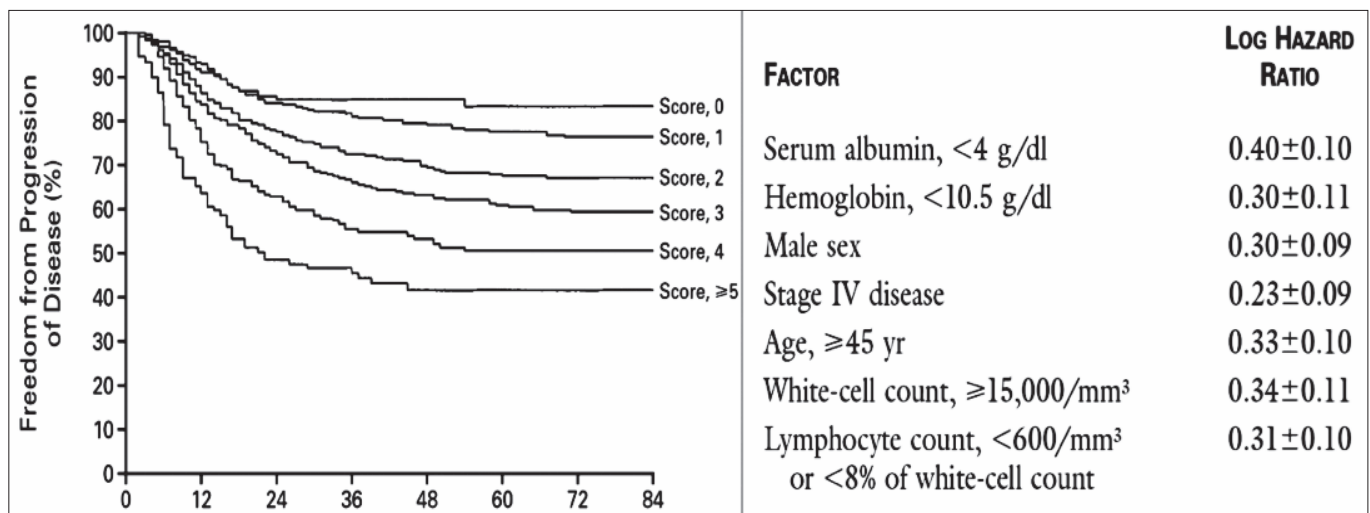


Figura 2 – Fattori prognostici negli stadi avanzati (III e IV) di malattia.

In questi casi, definiti come risposta completa indeterminata (RCu) secondo i criteri tradizionali radiologici IWC⁽²⁸⁾ la PET si è rivelata essenziale per riclassificare correttamente la presenza di masse residue al termine del trattamento con un potere predittivo negativo (NPV) del 95%⁽²⁹⁾. Naturalmente il NPV dipende anche dall'intensità del trattamento somministrato prima di eseguire la PET, essendo 94% dopo BEACOPP *escalated*⁽²⁹⁾, 92%⁽³⁰⁾ dopo ABVD e solo 86% dopo VEBEP⁽³¹⁾. Nel 2007 la PET è stata incorporata nei criteri di risposta alla terapia dei linfomi⁽³²⁾ con due principali conseguenze:

- la categoria RCu è stata abbandonata;
- la prognosi dei pazienti con risposta parziale (PR), malattia stabile (SD) e malattia in progressione (PRO) è stata definita con maggiore accuratezza rispetto alle categorie di risposta definite dai criteri IWC⁽³³⁾.

Nel 2009, principalmente come conseguenza del progressivo diffondersi di un'altra grande indicazione della PET - la valutazione precoce della chemio-sensibilità mediante esecuzione dell'esame dopo pochi cicli di chemioterapia - un gruppo di esperti ematologi e medici nucleari, riunitosi a Deauville, ha proposto semplici e riproducibili criteri per la lettura della PET effettuata durante (*Interim* PET) e dopo la terapia (PET finale) nei linfomi, utilizzando criteri d'interpretazione visuale⁽³⁴⁾. In pratica, lo scopo di tale proposta di standardizzazione è stato di quantizzare l'entità della captazione residua di FDG paragonandola visualmente alla intensità di captazione dell'FDG in organi di riferimento quali il pool vascolare mediastinico ed il fegato, organi ritenuti relativamente stabili per entità di captazione del FDG durante la PET. La intensità di captazione residua poteva essere quantizzata in modo crescente secondo una scala numerica da 1 a 5 nel modo seguente (Figura 3). La soglia per definire un esame positivo è stata fissata tra lo *score* (livello) 3 e 4, in seguito all'osservazione che un certo grado di captazione aspecifica di FDG può essere considerata fisiologica e non dipendente dalla persistenza di cellule neoplastiche vitali, ma dalla presenza di reazione

infiammatoria aspecifica all'infiammazione e alla necrosi tessutale indotte dalla chemio- o radio-terapia⁽³⁵⁾.

Nel 2013 nel corso del 12° congresso internazionale sui linfomi maligni tenutosi a Lugano si è definitivamente stabilito un ruolo standard della PET nella stadiazione e ristadiazione ad *interim* ed al termine della terapia nei linfomi avidi di FDG^(36,37). Questi ultimi sono la stragrande maggioranza dei sottotipi istologici, con la eccezione dei linfomi extra-nodali cutanei e del MALT, del linfoma linfocitico e della leucosi linfatica cronica⁽³⁸⁾. Le conclusioni raggiunte da questo gruppo di esperti furono quelle riportate di seguito.

FDG-PET per la stadiazione

- La PET deve essere considerata uno strumento standard per la stadiazione dei linfomi FDG-avidi. La TAC senza mezzo di contrasto e a basso voltaggio dovrebbe essere eseguita contemporaneamente alla PET in una singola sessione d'esame.
- La TAC con mezzo di contrasto non ha più un'indicazione precisa nello staging se non (i) quando è richiesta una misurazione precisa delle dimensioni linfonodali, (ii) per distinguere la presenza di adenopatie da anse intestinali contigue; (iii) per la definizione di trombosi/compressione di grossi vasi contigui ad adenopatie; (iv) per programmare i campi di irradiazione per la terapia radiata (*Involved field or involved nodal*).

Deauville score (DS)	
☐ Score 1 no uptake	
☐ Score 2 uptake ≤ mediastinum	
☐ Score 3 uptake > mediastinum but ≤ liver	
☐ Score 4: moderately ↑ uptake > liver	Positivity threshold
☐ Score 5 markedly ↑ uptake > liver and/or new sites of disease	

Barrington S: Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010;37:1824-33
Meignan M: Leukemia & Lymphoma 2009; 50(8): 1257-1260

Figura 3 – Score di Deauville per la interpretazione visuale della PET.

- Per la definizione di massa *bulky* la sede linfonodale di maggiori dimensioni deve essere misurata sul suo diametro assiale maggiore. La definizione di *bulky* per l'LH resta invariata rispetto a quanto proposto dal *meeting* di Cotswolds (massa con diametro assiale maggiore o uguale a 10 cm o, se mediastinica, massa con diametro trasverso uguale o maggiore di un terzo del diametro transtoracico a livello di D6) ⁽¹⁸⁾.
- La localizzazione splenica da parte di LH viene definita come una fissazione omogenea o multifocale (macro o micro-nodulare) o in forma di singola massa di grandi dimensioni in una milza normale per dimensioni o in presenza di splenomegalia (definita dalla presenza di viscere con diametro massimo assiale uguale o superiore a 13 cm).
- L'interessamento epatico da parte di LH viene definito come una fissazione focale (micro o macro nodulare) o diffusa di FDG in sede epatica, indipendentemente dalle dimensioni del viscere.
- L'interessamento osteo-midollare da parte di LH è definito come una fissazione focale a livello osseo di FDG. Dal momento che in nessun caso la biopsia osteo-midollare fornisce indicazioni aggiuntive e utili al trattamento in un paziente stadiato con FDG-PET, la biopsia osteo-midollare non è più indicata in questo contesto clinico.
- La presenza di sintomi sistemici (rialzo febbrile, calo ponderale e sudorazioni notturne) che definiscono due sottogruppi nella stadiazione di Ann Arbor (A: assenza; B: presenza di sintomi sistemici) ancorché non ben definiti, rimangono importanti solo nel linfoma di Hodgkin, perché in questa malattia il trattamento è modulato dalla presenza o assenza di tali sintomi.

FDG-PET per la ristadiazione precoce

- Se esiste l'indicazione clinica a valutare chemio-sensibilità del LH precocemente durante il trattamento, la *interim* PET è lo strumento di scelta.
- La chiave di lettura della *interim* PET è la scala di Deauville a 5 punti.
- Uno *score* da 1 a 3 definisce una *interim* PET come negativa nel caso che sulla base di tale risultato il trattamento debba essere intensificato, mentre in caso di riduzione di intensità di trattamento è consigliabile considerare negativa una *interim* PET con *score* 1 e 2.
- Non esistono al momento evidenze cliniche sufficienti per intensificare o de-intensificare il trattamento sulla base della *interim* PET nella pratica clinica quotidiana.
- Nel caso si preferisca un lettura quantitativa della PET (mediante valutazione del SUV e di altri parametri da esso derivati) la standardizzazione delle apparecchiature e delle procedure di *scanning* deve essere fatta sia nella pratica quotidiana che nei trials clinici.

FDG-PET per la ristadiazione al termine della terapia.

- La PET è lo strumento diagnostico standard per la valutazione della risposta alla terapia nei linfomi FDG-avid.

- La chiave di lettura della PET fine trattamento è la scala di Deauville a 5 punti.
- Lo *score* 1, 2 e 3 rappresentano una risposta metabolica completa (CMR). Uno *score* 4 o 5 con riduzione di fissazione di FDG rispetto alla PET basale costituisce una risposta metabolica parziale (PMR). Un aumento di fissazione di FDG a *score* 5, la presenza di *score* 5 senza diminuzione di fissazione, e la comparsa di nuovi foci di fissazione di FDG compatibili con localizzazioni linfomatose rappresentano una non risposta e/o progressione.

Ristadiazione precoce

La velocità della risposta al trattamento è stata considerata da sempre un parametro indiretto di chemio-sensibilità e quindi di buona prognosi in numerose neoplasie ematologiche e solide. Nel LH in stadio intermedio-avanzato, fin dal 1987 era stato dimostrato che i pazienti che raggiungevano la remissione dopo 3 cicli di MOPP avevano una prognosi nettamente migliore della intera popolazione trattata, con una sopravvivenza a 8 anni del 90% rispetto al 55% della intera coorte di pazienti ⁽³⁹⁾.

All'inizio del millennio la capacità della PET di valutare la presenza di tessuto residuo metabolicamente attivo alla fine della chemioterapia è stata sfruttata per valutare, precocemente nel corso della chemioterapia, la chemio-sensibilità del LH. Tale utilizzo della PET è stato probabilmente il contributo più importante di questo strumento diagnostico e prognostico nella gestione globale del LH. Quest'ottima performance dipende da molti fattori, ma probabilmente il più importante risiede nella peculiare architettura istopatologica del LH: rare cellule neoplastiche, le cellule di HRS e le cellule di Hodgkin, circondate da una predominante popolazione di cellule non neoplastiche, reattive alla presenza delle cellule linfomatose. Questa popolazione cellulare, che costituisce il ME è una popolazione attivata e attratta in loco grazie ad un gradiente citochinico. Tali cellule, che sono attivate dalle HRS e a loro volta garantiscono la immortalizzazione di queste ultime, risultano funzionalmente poco attive e non immunologicamente competenti, dimostrano per converso un metabolismo cellulare molto attivo, e sono ritenute responsabili della fissazione di FDG da parte del tessuto neoplastico. La precoce lisi delle HRS da parte della chemioterapia causa a sua volta il silenziamento metabolico e il conseguente azzeramento della captazione di FDG da parte delle cellule del ME, che, come accennato in precedenza, rappresentano oltre il 95% delle cellule del tessuto. Queste ultime, quindi, funzionano da amplificatore della capacità della PET di localizzare tessuto neoplastico vitale, e sono in ultimo responsabili della grande accuratezza della *interim* PET nel predire la chemio-sensibilità del tumore ⁽⁴⁰⁾. Come dato di fatto, la PET effettuata precocemente nel corso della terapia si è dimostrata lo strumento più efficace nel predire la risposta finale al trattamento nel LH in stadio avanzato (IIB-IVB) trattato con ABVD ⁽⁴¹⁾. Sia

negli stadi precoci che in quelli avanzati la PET effettuata dopo 2 cicli di chemioterapia con ABVD ha dimostrato un elevatissimo potere predittivo negativo mentre il potere predittivo positivo è risultato deludente negli stadi precoci sia per la bassa tendenza a recidivare della malattia in stadio limitato sia per la capacità della radioterapia di indurre la remissione della malattia in pazienti che sono risultati resistenti alla chemioterapia ^(42, 43).

Negli stadi avanzati invece la PET è risultata molto più efficace nel predire la risposta alla terapia rispetto allo *score* di Hasenclever: i pazienti con una PET positiva dimostravano una sopravvivenza libera da progressione a 2 anni (2-y PFS) contro una PFS del 95% per quelli con una PET-2 negativa, qualunque fosse lo *score* IPS dei pazienti (Figure 4, 5). Come logica conseguenza di questa osservazione numerosi trials sono stati proposti, tesi a valutare il ruolo dell'intensificazione del trattamento nei pazienti che dimostravano una *interim* PET positiva o, reciprocamente, il ruolo della de-intensificazione in pazienti che dimostravano una *interim* PET negativa ⁽⁴⁴⁾.

In molti di questi trials, sia nella malattia limitata che in quella avan-

zata, la terapia adattata alla PET era paragonata con due braccia di trattamento randomizzato alla terapia standard.

Nell'LH in stadio precoce due trials clinici condotti rispettivamente dal *National Cancer Research Institute* inglese e dall'organizzazione europea per la lotta contro il cancro (EORTC), sono stati condotti per valutare la fattibilità e la sicurezza della chemioterapia non seguita da radioterapia. Questi due studi sono giunti a conclusioni opposte: il trial inglese era stato disegnato per dimostrare una riduzione di efficacia non superiore al 6% in termini di PFS a 3 anni per i pazienti trattati con la chemioterapia sola rispetto a quelli trattati con terapia combinata, e l'endpoint risultava raggiunto, mentre nel trial EORTC i pazienti trattati con sola chemioterapia non hanno raggiunto l'endpoint della non inferiorità rispetto a quelli trattati con la terapia combinata con irradiazione e chemioterapia ^(45,46).

Nel LH in stadio avanzato è stato valutato sia il ruolo dell'intensificazione precoce della chemioterapia in pazienti con una *interim* PET positiva dopo 2 cicli di ABVD, sia il ruolo della de-intensificazione del trattamento in pazienti con una *interim* PET negativa dopo 2 cicli di BEACOPP *escalated*.

I risultati preliminari dei tre studi, tesi a valutare il ruolo della intensificazione della terapia in pazienti in stadio avanzato con PET *interim* positiva, possono essere così riassunti:

- circa il 10% dei pazienti con una PET-2 negativa, nonostante la teorica buona prognosi, vanno incontro a fallimento della terapia;
- circa due terzi (60-70%) dei pazienti con una *interim* PET positiva possono essere salvati dalla terapia con BEACOPP *escalated*;
- la sopravvivenza libera da progressione a tre anni della intera coorte dei pazienti sembra essere superiore del 5-10% rispetto ai pazienti trattati con la terapia standard con ABVD ⁽⁴⁷⁾.

Radioterapia: metodologia ed indicazioni

Solo sette anni dopo la scoperta dei raggi X da parte di Wilhelm Conrad Roentgen nel 1895, il primo caso documentato di HL è stato trattato con la radioterapia ⁽⁴⁸⁾.

Un bambino di 4 anni con linfadenopatia laterocervicale delle dimensioni di un pugno venne inviato al dott. Pusey, dermatologo presso l'Università dell'Illinois, e dopo una seduta di radioterapia la massa si ridusse miracolosamente ad una piccola tumefazione delle dimensioni di una mandorla. Negli anni successivi la radioterapia venne impiegata in numerosi casi di LH e, benché efficace, si rivelò presto una terapia palliativa. Gli strumenti di allora erano in grado di produrre solo raggi X a basso voltaggio, e la malattia invariabilmente andava incontro a recidiva. Negli anni '20 vennero messi a punto strumenti in grado di generare radiazioni a partire da kilovoltaggi e nel 1939 un radioterapista svizzero, René Gilbert, ottenne la prima remissione di lunga durata in un paziente affetto da LH trattato con radioterapia con campi di irradiazione che prevedevano non

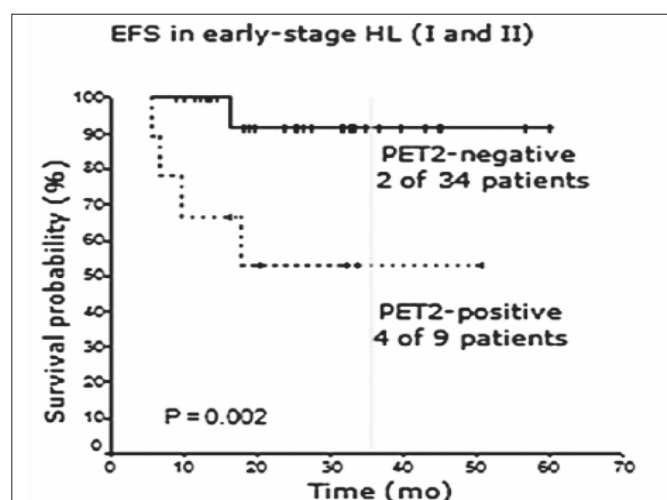


Figura 4 – Valore predittivo della *interim* PET negli stadi precoci di malattia ⁽⁴³⁾.

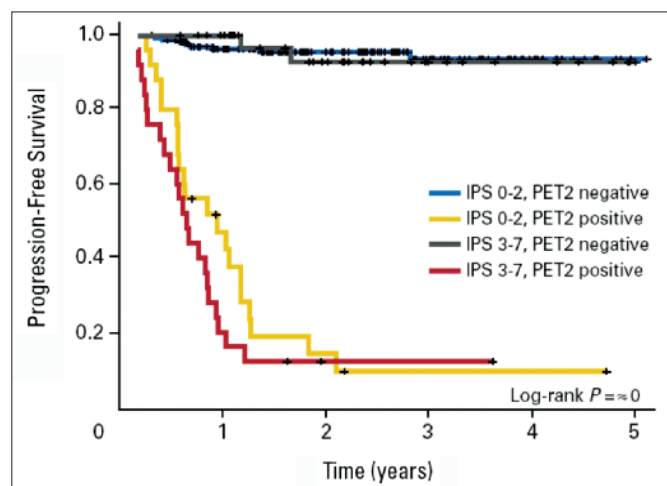


Figura 5 – Valore predittivo della *interim* PET negli stadi avanzati di malattia ⁽⁴¹⁾.

solo la sede interessata dalla linfadenopatia, ma anche sedi contigue. Nel 1950 Vera Peters, una radioterapista dell'Istituto di Radioterapia dell'Ontario, trattò con radioterapia a campi estesi un numero tale di pazienti con LH in stadio precoce da poter concludere che il morbo di Hodgkin poteva essere curato con la radioterapia. Da allora la radioterapia ha mantenuto un ruolo essenziale nella terapia del LH in stadio precoce e un ruolo accessorio nella terapia del LH avanzato, come consolidamento della chemioterapia sulle masse *bulky* presenti all'esordio o sulle masse residue al termine della chemioterapia. La radioterapia di oggi si basa esclusivamente su fotoni ad alta energia emessi da un acceleratore lineare.

Negli ultimi 40 anni la tecnologia in campo radioterapico ha fatto enormi progressi sia per quanto riguarda la dosimetria, con una distribuzione sempre più omogenea delle dosi radioterapiche ai tessuti linfomatosi, sia nella definizione anatomica dei campi da irradiare, con una progressiva riduzione della esposizione i tessuti circostanti alla lesione alle radiazioni ionizzanti. Oggi, grazie alla combinazione di radioterapia e chemioterapia, oltre l'80% dei pazienti con LH ottiene una guarigione. Sfortunatamente, questi ragguardevoli risultati terapeutici hanno un prezzo in termini di effetti collaterali, prevalentemente a lungo termine, e prevalentemente dovuti alla radioterapia: l'emergenza di eventi acuti cardiovascolari oltre 5 anni dalla fine della radioterapia ⁽⁴⁹⁾ e neoplasie secondarie, con un rischio relativo di secondi tumori a 30 anni del 18% per i soggetti maschili e del 26.1% per i soggetti femminili ⁽⁵⁰⁾. Non stupisce quindi la ricerca di metodologie tese a limitare il più possibile la esposizione alla irradiazione dei tessuti sani. All'inizio degli anni '80, grazie alla disponibilità della TC, un primo passo in questo senso è stato il passaggio della terapia dai campi estesi (i cosiddetti campi di irradiazione "a mantellina" per la malattia sopradiaframmatica e a "Y rovesciata" per la malattia sotto-diaframmatica), alla tecnica *Involved field* (IFRT)

nella quale vengono dapprima contornate e identificate nella TC le regioni da irradiare e quindi vengono irradiate solo le stazioni anatomiche linfonodali in cui si localizza il linfoma (Figure 6 e 7).

Con il continuo progresso delle apparecchiature e tecnologie, con la possibilità di disegnare campi di irradiazione in tridimensionale e infine con l'avvento della PET, è stato possibile un ulteriore decisivo passo in avanti nella riduzione della esposizione dei tessuti sani alla irradiazione, utilizzando campi di radioterapia limitati al volume occupato dalle diverse adenopatie interessate dal linfoma: la cosiddetta radioterapia con tecnica *Involved nodal* (INRT) (Figure 8, 9).

Diversamente dalla tecnica IFRT in cui la radioterapia viene somministrata alla intera regione linfonodale interessata dal linfoma, la INRT prevede l'irradiazione del volume occupato dal linfonodo alla diagnosi e dal suo residuo alla fine della chemioterapia più una zona di 1 cm attorno al residuo post-attinico ⁽⁵¹⁾. Per poter identificare correttamente le zone da irradiare si è reso necessario la definizione di precise volumetrie, utili alla identificazione anatomica delle masse linfomatose alla diagnosi e dopo la chemioterapia, con le relative terminologie, come recentemente dettagliato dal ILROG (*International Lymphoma Radiation Oncology Group*) ⁽⁵²⁾:

- **Gross Tumor Volume (GTV):** si riferisce alla posizione d'estensione del volume linfomatoso: in pratica tutte le lesioni tumorali che possono essere viste, palpate o delineate nelle tecniche di imaging. In pratica il GTV viene delineato manualmente sulle immagini trans-assiali della CT alla diagnosi.
- **Clinical Target Volume (CTV):** normalmente costituito dal GTV assommato a un volume che circonda il GTV e che tiene conto: della possibilità che il tumore si espanda dopo l'imaging e prima della terapia, delle localizzazioni sub-microscopiche della malattia, delle vie di diffusione della malattia stessa. Ad esempio: se le adenopatie distano tra loro più di 5 cm differenti e multipli CTV an-

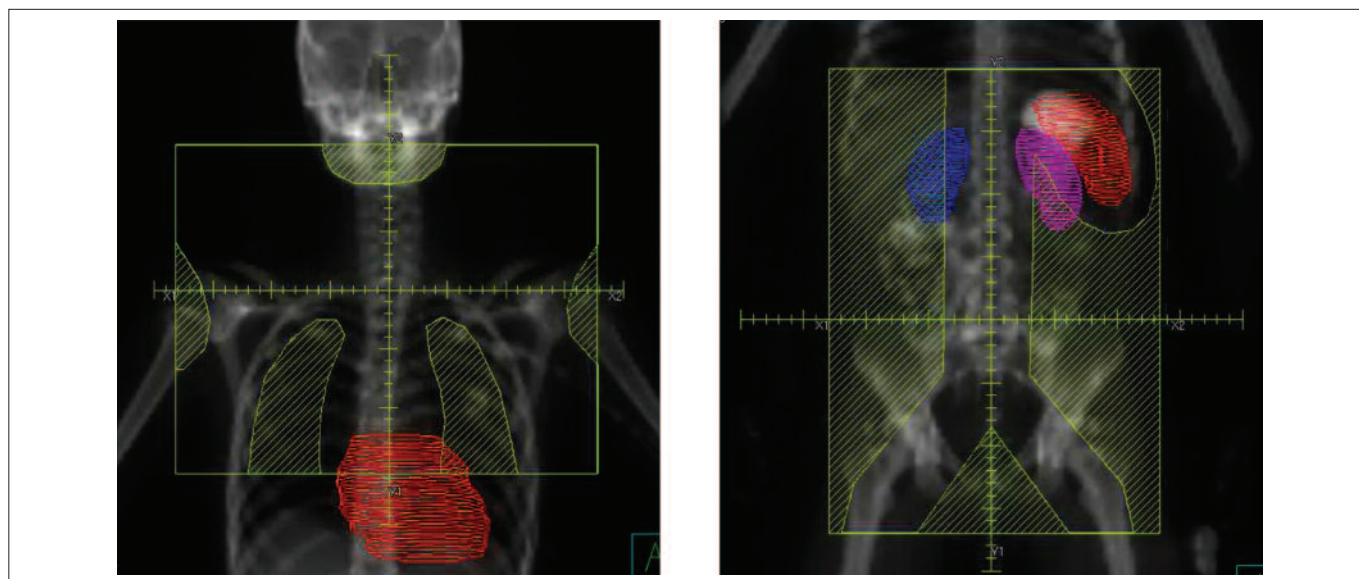


Figure 6 e 7 – Radioterapia a campi estesi: “a mantellina (sinistra) e a “Y rovesciata (destra).

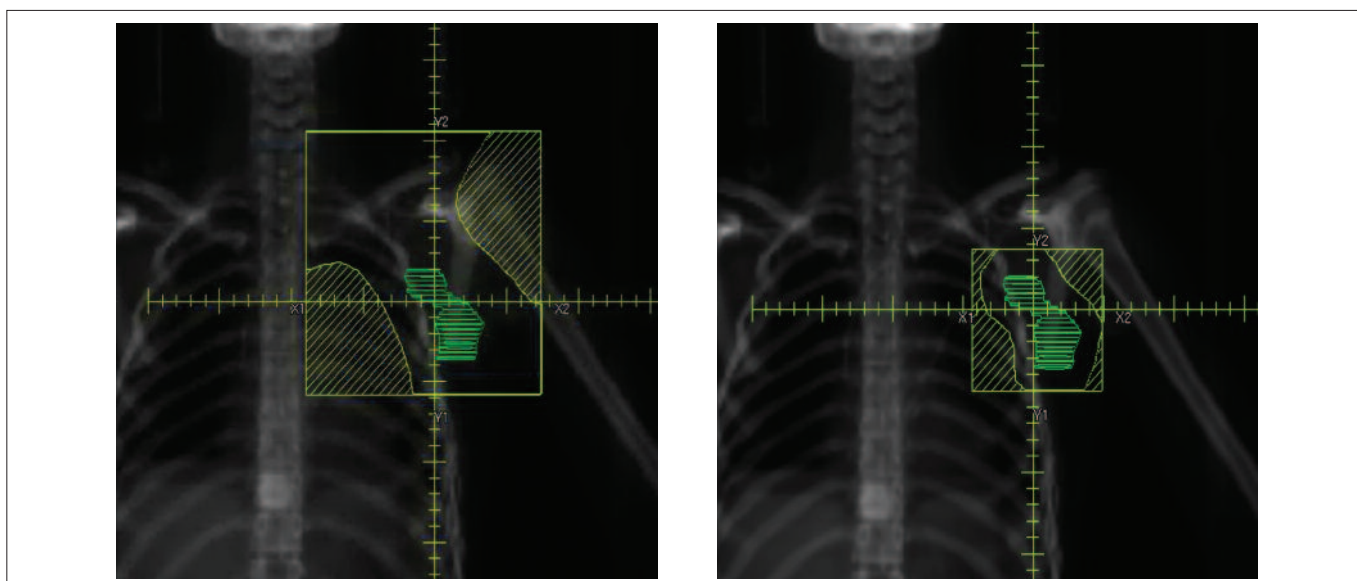


Figure 8 e 9 – Radioterapia secondo Involved field (sinistra) e Involved nodal (destra).

dranno delineati, ma se sono più vicine di tale distanza un unico CTV può essere delineato.

- **Internal Target Volume (ITV):** è costituito dal CTV più un volume che tiene conto delle incertezze legate alla forma più o meno irregolare del tumore, ai movimenti durante l'imaging, alla posizione del paziente durante la seduta di imaging. Nel torace e nell'addome superiore, per via dei movimenti respiratori, un margine di 3 cm in alto e in basso in più rispetto al CTV serve a delineare il ITV.
- **Planning Target Volume (PTV):** è legato alla tecnica di irradiazione di ogni singolo centro di radioterapia e al grado di immobilità del paziente durante la seduta radioterapica della sede da irradiare e dalla cooperazione del paziente.

Dosi e campi di irradiazione

Per pazienti con malattia in stadio precoce e cLH in CR dopo chemioterapia, il CTV deve essere delineato in accordo con i trial tedeschi HD10⁽⁵³⁾ e HD11⁽⁵⁴⁾. Per i pazienti con malattia in stadio precoce favorevole la dose è di 20 Gy mentre per i pazienti con malattia in stadio limitato sfavorevole la dose è di 30 Gy. Per quanto riguarda la delineazione del CTV, la procedura standard secondo le linee guida internazionali del ILROG è la seguente⁽⁵²⁾:

- Le immagini CT pre-chemioterapia sono usate per contornare il GTV: GTV_{ct}
- Le immagini PET pre-chemioterapia sono usate per contornare il GTV: GTV_{pet}
- Le immagini CT pre-chemioterapia vengono fuse con le immagini CT post-chemioterapia e il GTV_{ct} e il GTV_{pet} vengono importati sulle immagini CT.
- Il CTV viene così contornato, tenendo presente il GTV_{ct} e il GTV_{pet} pre-chemioterapia, tenendo però conto della riduzione di volume del tumore dovuto alla chemioterapia.

Nella delineazione del CTV occorre rispettare tutte le strutture anatomiche che non sono mai state infiltrate dal linfoma, come polmoni, pareti toraciche, muscoli e strutture mediastiniche normali (Figura 10).

Terapia

LLH non deve essere solo considerato una malattia paradigmatica per quanto riguarda il concetto di stadiazione e ristadiazione tumorale, di utilizzo di modelli prognostici e fattori predittivi di risposta alla terapia, ma anche come modello di studio in Oncologia per la programmazione concatenata di trials clinici successivi finalizzati al progressivo miglioramento dell'efficacia della terapia.

La costante evoluzione tecnologica dei metodi diagnostici ha permesso anche un'evoluzione degli strumenti prognostici, dapprima utilizzati per definire categorie di pazienti con differente rischio di refrattarietà alla terapia e candidati a regimi di chemio- e radio-terapia omogenei, e successivamente impiegati per programmare una strategia terapeutica adattata al rischio di insuccesso del trattamento nel singolo paziente. Oggi la terapia del LH può considerarsi come un successo di un moderno approccio terapeutico oncologico basato sulla combinazione di due trattamenti ben distinti: la radioterapia e la chemioterapia, somministrati con tre diversi livelli di intensità, rispettivamente nel LH limitato (stadio I-II) favorevole, nel LH limitato sfavorevole e stadio avanzato (III e IV) (Figura 1).

Pazienti in stadio limitato

Malattia favorevole

Circa un terzo dei pazienti con diagnosi di LH presenta una malattia in stadio limitato favorevole⁽⁵⁵⁾. Tale definizione riguarda i pazienti in stadio I o II senza fattori di rischio sfavorevoli come presenza di sintomi B, malattia *bulky* (definita come una massa mediastinica >10 cm o superiore ad un terzo del diametro mediastinico), VES

>50 (o >30 se è presente una malattia *bulky*) e coinvolgimento di più di tre siti nodali o malattia extra-nodale. Nello studio tedesco HD7 condotto dal gruppo multicentrico *German Hodgkin Study Group* (GHSG) la combinazione di un breve ciclo di chemioterapia seguito da radioterapia *extended field* (EF-RT) si è dimostrato maggiormente efficace in termini di sopravvivenza libera da fallimento della terapia (*Freedom From Treatment Failure: FFTF*) a 7 anni rispetto alla sola radioterapia^(56,57). Nei primi anni del terzo millennio, allo scopo di evitare le gravi morbidità e mortalità a lungo termine della radioterapia, e con la disponibilità di nuove tecniche tridimensionali radiologiche e anche di imaging funzionale per la definizione dei campi da irradiare, con sempre maggiore frequenza sono state proposte tecniche di irradiazione secondo *involved field* (IF) (campi di irradiazione limitati alla sola regione anatomica di una specifica sede linfonodale: ad esempio inguine o ascella) anziché *extended field* (EF) (campi di irradiazione che si estendono a diverse stazioni linfonodali: ad esempio mantellina o a Y rovesciata, vedi sezione precedente). Determinanti sono stati gli studi di Tubiana et al.⁽⁵⁸⁾ e il più recente studio di Haskin et al. del 2005⁽⁵⁹⁾ che non hanno dimostrato una significativa superiorità della radioterapia EF sulla radioterapia IF in termini di sopravvivenza globale (OS), ma con una tossicità polmonare della radioterapia estesa non trascurabile. Qualche anno più tardi anche la pubblicazione, da parte del GHSG del trial clinico a 4 braccia HD10 ha permesso di identificare la dose ottimale di chemioterapia con ABVD e di radioterapia IF per gli stadi precoci sia favorevoli che sfavorevoli: rispettivamente 2 cicli di ABVD seguiti

da RT-IF a 20 Gy per la malattia limitata favorevole e 4 cicli di ABVD seguiti da RT-IF a 30 Gy per la malattia limitata sfavorevole. Lo studio ha dimostrato una OS del 95% e una sopravvivenza libera da progressione (PFS) del 86%, entrambe sovrapponibili nelle 4 braccia, ma ha evidenziato una netta riduzione della tossicità nel braccio con 2 cicli di ABVD e con basse dosi di radioterapia (20Gy)⁽⁵³⁾. Per contro, lo studio clinico condotto dal EORTC HD6 ha ribadito una sostanziale equivalenza in termini di efficacia della terapia combinata (chemioterapia e radioterapia) rispetto alla chemioterapia sola, ma una netta riduzione della tossicità con quest'ultimo tipo di terapia⁽⁶⁰⁾. In accordo con le linee guida ESMO⁽⁶¹⁾ comunque il *gold standard* di trattamento nei pazienti con malattia limitata a prognosi favorevole rimane la combinazione ABVD per due o tre cicli, seguita da radioterapia IF-RT (20 Gy o 30 Gy). Le linee guida nord-americane NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) estendono le raccomandazioni anche allo schema Stanford V, ma la superiorità in questo schema rispetto all'ABVD non è effettivamente mai stato provato⁽⁶²⁾. Del tutto recentemente sono stati pubblicati i risultati dello studio inglese RAPID, condotto dal *National Cancer Research Institute* teso a valutare la fattibilità e la sicurezza di un trattamento *chemotherapy only* nei pazienti in stadio I e IIA non *bulky* che presentavano una PET negativa dopo 3 cicli di chemioterapia con ABVD⁽⁴³⁾. Il trial era stato disegnato, dal punto di vista statistico, per dimostrare una riduzione di efficacia inferiore al 6% in termini di PFS dei pazienti trattati con la sola chemioterapia rispetto ai pazienti trattati con la terapia combinata chemio-radiante.

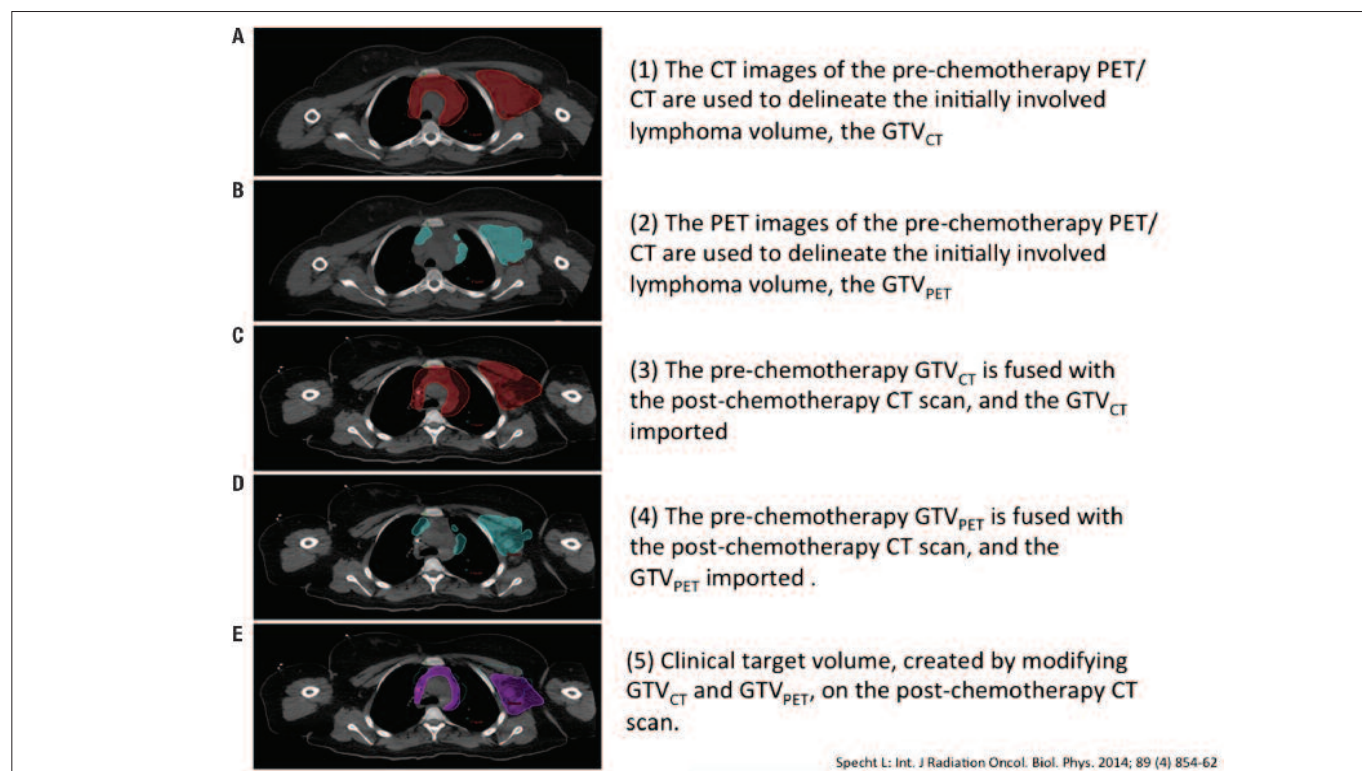


Figura 10 – Moderna radioterapia conformazionale con utilizzo di CT e PET/CT.

Gli Autori di tale studio hanno potuto concludere che l'end-point dello studio era stato raggiunto dal momento che la omissione della radioterapia causava una riduzione, in termini di punti percentuali di PFS, inferiore al 6% (per la precisione 3.8%).

Malattia sfavorevole

Anche nelle forme di malattia a stadio limitato ma a prognosi sfavorevole la combinazione tra chemio e radioterapia deve ritenersi il trattamento standard. L'importante studio tedesco HD11⁽⁵⁴⁾, che ha arruolato 1.395 pazienti randomizzati in quattro braccia di trattamento: 4 cicli di ABVD seguiti da RT-IF a 20 o a 30 Gy e 4 cicli di BEACOPP standard seguiti da RT-IF a 20 o a 30 Gy ha dimostrato una equivalenza, in termini di FFTF a 5 anni, del BEACOPP rispetto all'ABVD, se quest'ultimo è seguito da RT-IF a 30Gy. A fronte di una maggiore efficacia in termine di remissione completa del regime BEACOPP, tale sostanziale equivalenza poteva ritenersi strettamente dipendente dalla maggiore morbilità e mortalità a lungo termine non legata al linfoma di quest'ultima rispetto all'ABVD. La conferma per contro della superiorità della RT a 30 Gy rispetto a 20 Gy viene ripresa dalle linee guida ESMO⁽⁶¹⁾ che indicano come trattamento standard del LH in stadio limitato sfavorevole 4 cicli di ABVD seguiti da RT-IF a 30 Gy. Uno studio successivo di Treskow et al., 2013⁽⁶³⁾ lo HD14, riprende l'idea di base dello HD11, con l'obiettivo di migliorare la PFS e la FFTF con un trattamento combinato maggiormente aggressivo: 2 cicli di BEACOPP *escalated* seguiti da 2 cicli ABVD e da RT-IF a 30 Gy sono comparati in modo randomizzato al braccio standard di 4 cicli ABVD seguiti da RT-IF a 30 Gy. Il trattamento intensificato, pur ottenendo una migliore PFS, non ha alla fine definito una vera e propria superiorità rispetto al solo ABVD, ma, come atteso, ha riportato dati di maggiore tossicità sia a breve che a lungo termine. Il trattamento ottimale della malattia a stadio limitato sfavorevole con massa *bulky* resta ancora da definire ed è attualmente oggetto di trials clinici tesi a valutare il ruolo della *interim*-PET nel modulare la intensità di trattamento in base alla valutazione precoce della chemio-sensibilità. Le linee guida NCCN cercano di rispondere a tale quesito e auspicano per tale tipo di malattia un trattamento maggiormente aggressivo: l'alternativa all'ABVD per 4 cicli seguito da RT a 36 Gy può essere un trattamento combinato con 2 cicli di BEACOPP *escalated* e 2 cicli di ABVD seguito da RT a 36 Gy o lo Stanford V per 3 cicli⁽⁶²⁾.

Pazienti in stadio avanzato

Per definizione appartengono a tale gruppo i pazienti in stadio III o IV. A differenza delle forme in stadio iniziale l'impiego della radioterapia è ancora oggi dibattuto e limitato al ruolo di consolidamento sulle masse residue a fine terapia e sulle masse *bulky* alla diagnosi. Il trattamento standard è basato essenzialmente sulla chemioterapia. Nei pazienti con massa *bulky* la radioterapia viene presa in considerazione qualora persista, alla fine del trattamento chemioterapico

una minima captazione PET, residuale e confinata nella sede anatomica riscontrata pre-terapia. La chemioterapia considerata standard all'inizio degli anni novanta negli stati Uniti e in svariati paesi europei prevedeva 6-8 cicli di ABVD^(61, 64, 65) con il raggiungimento della remissione completa nell'80% circa dei pazienti, mantenuta nel tempo però solo nel 70% dei casi. Esistevano quindi ampi margini di miglioramento. La pubblicazione da parte del GHSG del trial clinico HD9⁽⁶⁶⁾ ha cercato di rispondere al quesito se una chemioterapia con più farmaci e con una maggiore *dose intensity* rispetto all'ABVD potesse migliorare l'outcome a lungo termine dei pazienti. A tale scopo sono stati arruolati nello studio 1.196 pazienti con un periodo di osservazione di 10 anni circa. I pazienti venivano randomizzati a tre schemi di chemioterapia differenti: COPP alternato ad ABVD (COPP/ABVD) per un totale di 8 cicli, BEACOPP *baseline* per 8 cicli e BEACOPP *escalated* per 8 cicli. I risultati hanno dimostrato una sopravvivenza globale (OS) a 10 anni rispettivamente del 75%, 80%, e 86%. Da allora il regime BEACOPP *escalated* è rimasto in Germania e in molti altri stati Europei il *gold standard* per il trattamento dei pazienti con malattia in stadio avanzato.

Risultati simili ai dati del GHSG ma conclusioni differenti sono state riportate da Viviani et al. dell'Istituto Nazionale dei Tumori⁽⁶⁷⁾, in uno studio randomizzato di terapia di prima linea tra BEACOPP *escalated* e ABVD seguiti da radioterapia di consolidamento, quando indicato. Sono stati arruolati 331 pazienti, e dopo un follow up mediano di 61 mesi la sopravvivenza libera da prima progressione (*freedom from first progression*: FFFP) a 7 anni è stata dell'85% tra i pazienti nel braccio BEACOPP (82% nel GHSG) e del 73% nei pazienti nel braccio ABVD ($p = 0,004$) con un *event free survival* (EFS) a 7 aa del 78 e del 73%, rispettivamente ($p = 0,15$).

Un totale di 65 pazienti recidivati (20 del braccio BEACOPP e 45 del braccio ABVD) sono andati incontro ad un trattamento di seconda linea per lo più con alte dosi di chemioterapia seguite da autotrapianto, raggiungendo una sopravvivenza libera da seconda progressione a 7 anni e una OS a 7 anni del 88% e 89% nel gruppo trattato inizialmente con BEACOPP (86% nello studio GHSG) e 82% e 84% nel gruppo trattato inizialmente con ABVD, senza una differenza statisticamente significativa tra le due strategie terapeutiche (rispettivamente $p = 0,12$ e $p = 0,39$).

Questi dati confermano come l'iniziale vantaggio in termini di PFS del BEACOPP rispetto all'ABVD sia in realtà a lungo termine ridotto, con risultati simili nell'OS, non giustificando il prezzo della sua tossicità a breve ed a lungo termine nel braccio trattato intensivamente: una media del 20% di ricoveri per complicanze infettive, il 3% dei pazienti ha una mortalità correlata alla terapia, il 2-3% presenta seconde neoplasie, infertilità maschile e menopausa precoce^(67, 68). In definitiva, dal momento che il LH risulta comunque curabile in oltre l'85% dei casi, la sfida principale nella malattia in stadio precoce ed avanzato attualmente consiste nel cercare di aumentare ulterior-

mente i casi in cui è possibile raggiungere una remissione duratura, riducendo al contempo al minimo la tossicità indotta dal trattamento. Il raggiungimento di questo obiettivo è stato concretamente l'endpoint del trial clinico Italiano GITIL/FIL HD0607, che è basato sul presupposto che la valutazione precoce della chemio-sensibilità mediante FDG-PET effettuata dopo 2 cicli di chemioterapia permette di intensificare il trattamento nei (pochi) pazienti chemio-resistenti e di mantenere inalterata la intensità della chemioterapia nei (molti) pazienti chemio-sensibili ⁽⁶⁹⁾. Tale studio, come quello molto simile condotto dall'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro Inglese (NCRI), il RATHL ⁽⁷⁰⁾, ha dimostrato che tale approccio ha permesso di migliorare i dati storici ottenuti con la terapia standard con ABVD dal momento che circa l'80-85% di tutti i pazienti in stadio avanzato otteneva una remissione duratura della malattia dopo una mediana di osservazione di circa tre anni.

LH a predominanza linfocitaria

Frequentemente la forma nodulare a prevalenza linfocitaria (NLPHL) può presentare delle forme di confine con il LNH follicolare (FL), il LNH a grandi cellule B (DLBCL) e il *T-cell rich B-cell lymphoma* (TCRBCL). In questo sottotipo di LH molti continuano a ritenere la radioterapia IF o IN alla dose di 30 Gy trattamento standard per lo stadio precoce IA ^(61, 71, 72).

Lo studio di fase II condotto dal GHSG ha arruolato 21 pazienti nell'arco di 5 anni, dal 1999 al 2004, trattati con solo rituximab (anticorpo monoclonale anti CD20+) riportando un ORR del 94% (follow up mediano 63 mesi, range 3-84). Il rituximab deve comunque essere inserito in un regime di poli-chemioterapia secondo lo schema terapeutico R-CHOP (rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone) nei pazienti in stadio IB-IV.

LH ricaduto o refrattario

Il LH rappresenta un successo della moderna chemioterapia e radioterapia oncologica ed è oggi considerata una neoplasia curabile, con circa il 80% dei pazienti che acquisiscono un controllo a lungo termine della malattia dopo terapia di 1° linea e il 90% dei pazienti che sopravvivono, liberi da malattia, a 10 anni ⁽⁷³⁾. Nonostante questi ragguardevoli risultati, il 10-15% dei pazienti con malattia limitata e il 20-30% dei pazienti con malattia avanzata vanno incontro a recidiva, e una parte di questi soccombe per la malattia stessa ⁽⁶⁵⁾. La chemioterapia ad alte dosi (HDCT) seguita da autotrapianto (ASCT) rappresenta il trattamento standard per i pazienti con LH ricaduto. Il regime di condizionamento con chemioterapia ad alte dosi prima del ASCT attualmente più usato è il BEAM (BCNU, etoposide ARA-C e melphalan). La superiorità in termini di *event-free survival* (EFS) dei regimi che includono ASCT verso la semplice chemioterapia di salvataggio è dimostrata dal risultato di due trials prospettici ^(74, 75).

Lo stesso tipo di terapia per l'LH ricaduto è quella che viene scelta

da molti centri per il LH refrattario, sempre che la malattia si dimostri chemio-sensibile nel corso della terapia di re-induzione della remissione. Nonostante questi assunti, alcune questioni rimangono non risolte, come l'utilità dei fattori prognostici prima del ASCT, il tipo e numero di regimi di salvataggio da somministrare prima del ASCT e il ruolo della PET nel predire l'esito finale del trattamento. Nella valutazione degli elementi prognostici o predittivi di risposta alla terapia di 2° linea nel LH ricaduto, un vasto database di dati provenienti dagli studi del gruppo cooperatore tedesco sul LH (GHSG) e dal Gruppo Europeo per il trapianto di Midollo Osseo (EBMT) ha permesso di evidenziare alcuni fattori statisticamente legati all'esito della terapia di salvataggio ⁽⁷⁶⁻⁷⁷⁾.

La prognosi di pazienti con malattia primitivamente refrattaria è particolarmente severa e nettamente inferiore a quella di pazienti con malattia ricaduta, con una sopravvivenza a 5 anni rispettivamente del 30% e 76%, come dimostrato dallo studio GELA H89 ⁽⁷⁸⁾. Altri fattori prognostici importanti si sono rivelati la durata della prima remissione, lo stadio di malattia al momento della ricaduta e i valori di emoglobina (Tabella 3).

Fattore	Modalità	OS a 4 anni
Durata 1° remissione	Recidiva precoce	47
	Recidiva tardiva	73
Stadio alla ricaduta	Stadio III/IV	46
	Stadio I/II	77
Emoglobina	F: Hb < 10.5 gr/dl	40
	M: Hb < 12.0 gr/dl	
	F: Hb > 10.5 gr/dl	72
	M: Hb > 12.0 gr/dl	

Tabella 3 – Fattori prognostici statisticamente significativi nel predire l'outcome di ASCT in una coorte di pazienti con LH ricaduto ⁽⁷⁶⁾.

Negli ultimi anni ha acquisito sempre più importanza la valutazione della chemiosensibilità prima dell'autotrapianto. Studi recenti hanno dimostrato che i pazienti con una PET negativa hanno una sopravvivenza libera da eventi (EFS) a 5 anni di circa il 75% contro il 30% per i pazienti che dimostrano una riduzione delle masse alla TAC ma una PET persistentemente positiva ⁽⁷⁹⁻⁸⁰⁾. Questi risultati sono stati confermati anche più recentemente presso il *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* di New York ⁽⁸¹⁾.

Un certo numero di regimi di polichemioterapia è stato proposto come terapia di seconda linea per il LH ricaduto o refrattario. Uno dei regimi più usati in Europa è il DHAP (desametazone, ARA-C ad alte dosi, cis-platino) o il suo analogo DHAOX (desametazone, ARA-C ad alte dosi, oxaliplatino). Sorprendentemente, né l'intensità della dose né la cadenza dei farmaci somministrati pare influenzare l'esito della terapia di 2° linea ma soltanto la chemiosensibilità valutata precocemente durante la terapia di salvataggio: i pazienti che

ottenivano una risposta completa o parziale dopo DHAP non avevano alcun vantaggio a proseguire la chemioterapia con un regime ad alte dosi sequenziali (HDS) contenente ciclofosfamide (4 g/m^2), metotrexate i (8 g/m^2) ed etoposide (2 g/m^2) ⁽⁸²⁾.

Successivamente, in uno studio randomizzato successivo, i pazienti con LH ricaduto, venivano trattati con 2 cicli di DHAP e randomizzati a proseguire chemioterapia con lo schema HDS o ad andare direttamente al ASCT: nessuna vantaggio veniva dimostrato in termini di EFS e OS per i pazienti trattati con DHAP + HDS verso i pazienti trattati con solo DHAP prima del trapianto ⁽⁸³⁾.

Un altro farmaco molto attivo nel LH in recidiva è la Gemcitabina. Il regime polichemioterapico IGEV (Ifosfamide, Gemcitabina, Vinorelbina e prednisone) ha dimostrato una elevata attività mobilizzante sulle cellule staminali e una efficacia simile a quella del DHAP (CR 54% and PR 27.5%) ⁽⁸⁴⁾.

Un regime polichemioterapico molto usato negli Stati Uniti è l'ICE (ifosfamide, carboplatino e etoposide) o lo *augmented ICE* (Ifosfamide 10 g/m^2 in infusione continua, etoposide 200 mg/m^2 e carboplatino con area sotto la curva (AUC) di 5). Anche in questo caso il tasso di remissione completa è stato del 50% ⁽⁸⁵⁾.

Del tutto recentemente un anticorpo monoclonale umanizzato diretto (SGN-35) contro l'antigene CD30, coniugato con un'immunotossina (MMA), denominato Brentuximab-Vedotin (BV) si è dimostrato molto attivo anche nel LH ricaduto.

Il gruppo ha studiato specificamente il ruolo di BV nell'indurre una negativizzazione della PET prima del ASCT: i pazienti con LH ricaduto refrattario venivano trattati con due cicli di BV in monoterapia alla dose di 1.8 mcg/Kg. , per un totale di 6 dosi, e successivamente veniva effettuata una PET/CT: i pazienti con PET negativa erano avviati ad ASCT mentre i pazienti che dimostravano una PET persistentemente positiva venivano trattati con due cicli di

ICE aumentato (v. sopra). I pazienti che ottenevano una negativizzazione della PET procedevano ad ASCT, mentre quelli che avevano una PET ancora positiva uscivano dallo studio.

Grazie a questo approccio terapeutico 34/45 (75%) ottennero una negativizzazione e furono sottoposti ad ASCT; 10/11 pazienti con PET positiva furono comunque in grado di procedere ad ASCT. Tuttavia la prognosi dei pazienti con PET negativa risultò nettamente migliore di quelli con PET positiva ⁽⁸⁶⁾ (Figure 11, 12).

LH del paziente anziano

Epidemiologia e patogenesi

L'LH nell'anziano è, a tutti gli effetti, una malattia diversa rispetto a quella del giovane adulto. Molteplici ragioni spingono a considerare il LH dell'anziano una malattia a sé stante, ma la principale risiede nella risposta alla terapia nettamente inferiore rispetto alla malattia dell'adulto. Questo relativo insuccesso della terapia, a sua volta, è stato imputato alla presenza di co-morbidità, cattivo *performance status*, differenze nella istologia e nella biologia di tale neoplasia in questa fascia di età. La co-morbidità sembra giocare un ruolo determinante: se si osservano contemporaneamente la incidenza di progressione di malattia e il decesso nelle popolazioni inferiori o superiori ai 60 anni, nelle popolazioni più giovani la morte era sempre associata alla progressione di malattia, mentre nell'anziano il decesso era indipendente dalla progressione della malattia ⁽⁸⁷⁾ (Figura 13). In uno studio condotto nel 2003, Levis et al hanno trattato 105 pazienti anziani con il regime VEPEMB (vinblastina, ciclofosfamide, procarbazine, prednisone, etoposide, mitoxantrone e bleomicina) ⁽⁸⁸⁾. In analisi multivariata la co-morbidità, insieme allo stadio avanzato e ai sintomi B risultava influenzare in modo significativo il controllo a lungo termine della malattia: OS 59% vs. 74% ($p < 0,01$); FFS 40% Vs. 64%, ($p < 0,02$).

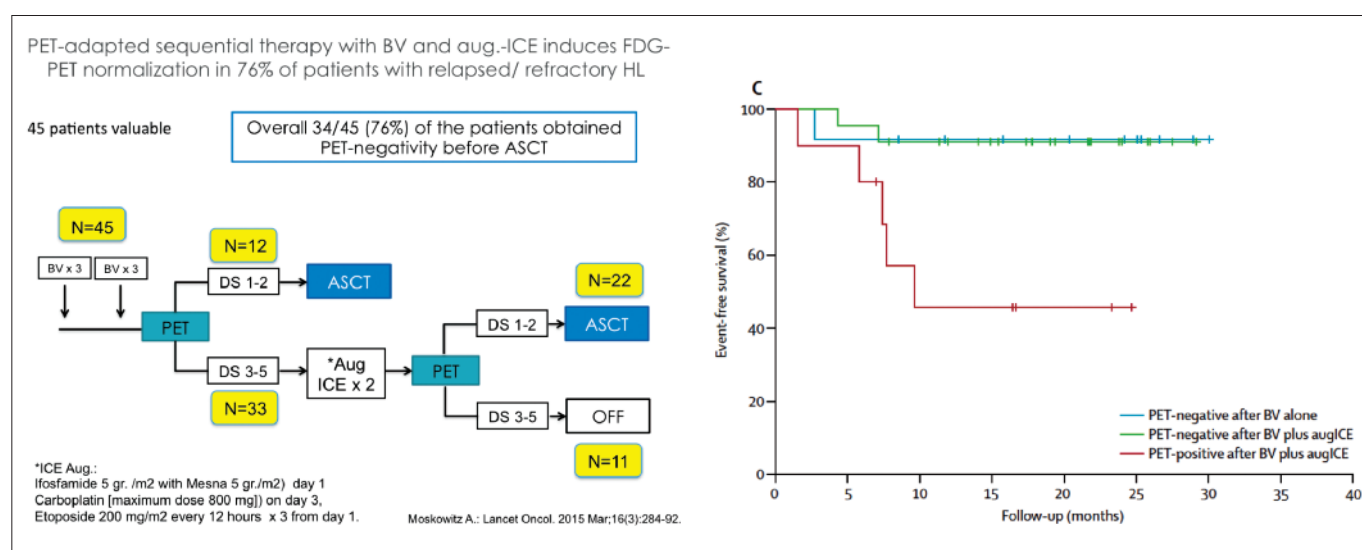


Figure 11 e 12 – Strategia di salvataggio per pazienti affetti da LH ricaduto/refrattario, con strategia “PET Response-adapted”⁽⁸⁶⁾.

Una conseguenza pratica di queste differenze è di fatto stato un arruolamento nei trials clinici decisamente ridotto rispetto all'adulto e, di conseguenza, una minore conoscenza delle caratteristiche biologiche e cliniche del LH in età geriatrica. Le differenze rispetto alla forma dell'adulto iniziano con la epidemiologia: la incidenza maggiore si riscontra tra gli ispanici, con 6,5 casi nuovi / 100.000/anno, seguita dalla razza bianca (4,5 casi nuovi/100.000/anno) e successivamente dalle popolazioni africane 3,4 casi nuovi/100.000/anno⁽⁸⁹⁾. Anche la biologia della malattia sembra nettamente diversa: l'istotipo che si ritrova più frequentemente nell'anziano è la CM con una prevalenza variabile tra il 31 e il 50%⁽⁹⁰⁻⁹²⁾.

L'integrazione del genoma del virus di Epstein-Barr nelle HRSc è più frequentemente riscontrata nel paziente anziano rispetto al giovane adulto, e sembra essere inoltre correlata con lo stadio più avanzato e con una sopravvivenza globale ridotta rispetto alla forma non EBV correlata⁽⁹³⁾.

Le differenze biologiche non possono non condizionare la presentazione clinica della malattia in questa fascia di età: in generale i sintomi B sono frequentemente uno dei primi campanelli di allarme e spesso sono purtroppo confusi con altre malattie co-esistenti⁽⁹⁴⁾, interferendo o ritardando la diagnostica. La malattia si manifesta frequentemente in forma disseminata e ad insorgenza sottodiffamatica⁽⁹⁵⁾. Dal punto di vista prettamente statistico, le fasce di età superiore a 65 anni mancano ancora completamente di una valutazione prognostica corretta perché non contemplate nel modello prognostico IPS, in cui i pazienti con età superiore ai 55 anni erano solo il 9% e nessun paziente aveva più di 65 anni^(96, 97).

Del tutto recentemente è stato proposto un modello prognostico specifico per il paziente anziano con LH, basato su solo 2 fattori: età ≥ 70 anni e perdita di punteggio dello *score* ADL per le attività elementari della vita quotidiana⁽⁹¹⁾.

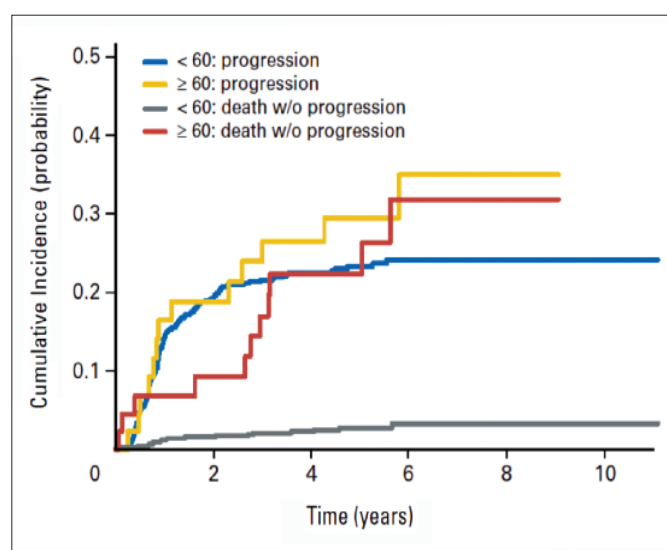


Figura 13 – Probabilità di progressione e cause di decesso in funzione della età.⁽⁹¹⁾

Terapia

Per lungo tempo il trattamento standard di prima linea nel paziente anziano è stato la chemioterapia con ABVD, in modo del tutto uguale, con la stessa posologia e *relative dose intensity* (RDI) del paziente giovane⁽⁶⁴⁾. Quest'ultima, al di sotto di un certo valore, sembra influenzare nettamente l'esito del trattamento: in uno studio recente Landgren et al. hanno riportato che una RDI per ABVD $< 65\%$ condizionava una OS nettamente inferiore rispetto ai pazienti nei quali era possibile raggiungere RDI superiori⁽⁹⁷⁾.

Da un'analisi di 117 pazienti con età > 60 anni, inclusi nei protocolli HD10 ed HD11 del GHSG e trattati con 4 cicli di ABVD, è emersa una notevole difficoltà a concludere l'intero trattamento per la insorgenza di tossicità gravi (di grado 3 e 4 secondo la WHO). La RDI nel paziente anziano è stata inferiore rispetto a quella nel paziente giovane (80% rispetto all'85%) e circa il 14% non hanno potuto completare il trattamento con un 5% di mortalità correlata alla terapia rispetto allo 0.3% del paziente < 60 anni. Le PFS ed OS a 5 anni sono state stimate del 75 ed 81% nei pazienti > 60 anni e del 90 e 97% nei pazienti < 60 anni, i pazienti con una ridotta RDI ($< 65\%$) hanno correlato con una minore sopravvivenza rispetto al paziente che ha terminato correttamente tutti i cicli di trattamento⁽⁹⁸⁾. Già nel 1996 gli studi di Levis et al. avevano preso in considerazione l'utilizzazione di un regime chemioterapico che potesse essere meno tossico nell'anziano. Uno schema CVP/CEB (clorambucile, vinblastina, procarbazine e prednisone alternato a ciclofosfamide, etoposide e bleomicina) aveva permesso una maggiore aderenza alla terapia e una minore TRM ma a prezzo di una minore efficacia, con una sopravvivenza libera da malattia a 5 anni del 43%⁽⁹⁹⁾.

Sempre tra i regimi non ABVD-based, ancora Levis et al.⁽⁸⁸⁾ hanno proposto in un'analisi prospettica un regime secondo schema VEPEMB (vinblastina, ciclofosfamide, procarbazine, prednisone, etoposide, mitoxantrone e bleomicina) riportando dati di RC del 58%, con *failure free survival* e OS a 3 anni del 34% e del 32%. Curiosamente, utilizzando un regime originariamente proposto per alcuni linfomi non-Hodgkin a cellule B quali il CHOP, Kolstad et al.⁽¹⁰⁰⁾ hanno riportato in un piccola coorte prospettica pazienti un tasso di RC ben del 93% con una PFS ed OS a 3 anni rispettivamente del 67% e del 72%. Questi brillanti risultati sono alla base del concetto che nel paziente anziano la mortalità correlata al trattamento, sia nei regimi ABVD-like o non^(88,100-102), non deve essere considerata marginale ma soppesata nella valutazione finale del rischio/beneficio soprattutto in riferimento al generale invecchiamento della popolazione, alle comorbidità coesistenti alla malattia e nei cosiddetti grandi anziani (oltre i 76 anni). In conclusione, è comunque auspicabile che nuovi studi possano far luce sulle fasce di popolazione al di sopra dei 60 anni sia in termini prognostici con scale geriatriche ad hoc che con l'obiettivo di ridurre la mortalità legata alla terapia.

Bibliografia

- Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chirurg Trans* 1832;17:69-97.
- Dati AIRTUM 2014. www.registri-tumori.it.
- Weiss LM, Movahed LA, Lucile A, Movahed BS, Roger A, Warnke MD, et al. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1989;320(8):502-6.
- Dolcetti R, Boiocchi M, Gloghini A, Carbone A. Pathogenetic and histogenetic features of HIV-associated Hodgkin's disease. *European J Cancer*. 2001;37(10):1276-87.
- Levine PH, Ablashi DV, Berard CW, Carbone PP, Waggoner DE, Malan L. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Cancer*. 1971;27(2):416-21.
- Hjalgrim H, Rostgaard K, Johnson PC, Lake A, Shield L, Little AM, et al. HLA-A alleles and infectious mononucleosis suggest a critical role for cytotoxic T-cell response in EBV-related Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:6400-6405.
- McAulay KA, Higgings CD, Macsween KE, Lake A, Jarret RE, Robertson FL, et al. HLA class I polymorphisms are associated with development of infectious mononucleosis upon primary EBV infection. *J Clin Investigation*. 2007;117(10):3042-28.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1205-11.
- Diepstra A, Poppema S, Boot M, Visser L, Nolte IM, Niens M, et al. HLA-G protein expression as potential immune escape mechanism in classical Hodgkin's lymphoma. *Tissue Antigens*. 2008;71(3):219-26.
- Gallamini A, Di Raimondo F, La Nasa G, Romano A, Borra A, Greco M. Standard therapies versus novel therapies in Hodgkin lymphoma. *Immunol Lett*. 2013;155(1-2):56-9.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. *Lione: IARC*;2008;1-439.
- Gravanis I, Tzoganis K, van Hennik P, de Graeff P, Schmitt P, Mueller-Berghaus J, et al. The European Medicines Agency Review of Brentuximab Vedotin (Adcetris) for the Treatment of Adult Patients With Relapsed or Refractory CD30+ Hodgkin Lymphoma or Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *Oncologist*. 2016;21(1):102-9.
- Bennani-Baiti N, Thanarajasingam G, Ansell S. Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Hodgkin Lymphoma. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016;17:1-7.
- Landgren O, Pfeiffer RM, Kristinsson SY, Bjorkholm M: Survival patterns in patients with Hodgkin's Lymphoma with a pre-existing hospital discharge diagnosis of autoimmune disease. *J Clin Oncol*. 2010; 28(34):5081-7.
- Meadows LM, Wendell RR, Moore JO, Crawford J, Lazlo J, Kaufman RE. Hodgkin's disease presenting as myelofibrosis. *Cancer*. 1989;64(8):1720-6.
- El-Galaly TC, Hutchings M, Mylam KJ, Brown Pde N, Bukh A, Johnsen HE, et al. Impact of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography staging in newly diagnosed classical Hodgkin lymphoma: fewer cases with stage I disease and more with skeletal involvement. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(10):2349-55.
- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the committee on Hodgkin's Disease staging classification. *Cancer Res* 1971;31(11):1860-1.
- Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC et al.: Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 1989;7(11):1630-6.
- Kaplan HS: Contiguity and progression in Hodgkin's Disease. *Cancer Res*. 1971; 31(11):1811-3.
- Castellino RA, Hoppe RT, Blank N, Young SW, Neumann C, Rosenberg SA, et al. Computed tomography, lymphography, and staging laparotomy: correlations in initial staging of Hodgkin disease. *AJR* 1984;143(7):37-41.
- Horwich A, Easton D, Nogueira-Costa R, Liew KH, Colman M, Peckam MJ. An analysis of prognostic factors in early stage Hodgkin's disease. *Radiother Oncol*. 1986;7(2):95-106.
- Mauch P, Tarbell N, Weinstein H, Silver B, Goffman T, Osteon R, et al. Stage IA and IIA supradiaphragmatic Hodgkin's disease: prognostic factors in surgically staged patients treated with mantle and paraaortic irradiation. *J Clin Oncol*. 1988;6(10):1576-83.
- Hasenclever D and Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1998;339(21):1506-14.
- Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D, et al. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *N Engl J Med*. 2003;348(24):2386-95.
- Hutchings M, Loft A, Hansen M, Pedersen LM, Berthelsen AK, Keiding S, et al. Position emission tomography with or without computed tomography in the primary staging of Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2006;91(4):482-9.
- Naumann R, Vaic A, Beuthien-Baumann B, Bredow J, Kropp J, Kittner T, et al. Prognostic value of positron emission tomography in the evaluation of post-treatment residual mass in patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 2001;115(4):793-800.
- Radford JA, Cowan RA, Flanagan M, Dunn G, Crowther D, Johnson RJ, et al. The significance of residual mediastinal abnormality on the chest radiograph following treatment for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 1988;6(6):940-6.
- Juweid ME1, Wiseman GA, Vose JM, Ritchie JM, Menda Y, Wooldridge JE, et al. Response assessment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma by integrated International Workshop Criteria (IWC) and fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Clin Oncol*. 2005;23(21):4652-61.
- Engert A, Haverkamp H, Kobe C, Markova J, Renner C, Ho A, et al. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2012;379(9828):1791-9.
- Savage K, Connors JM, Villa DR, Hapgood, Gerrie AS, Shenkier TN, et al. Advanced Stage Classical Hodgkin Lymphoma Patients with a negative PET-Scan following treatment with ABVD have excellent outcomes without the need for consolidative radiotherapy regardless of disease bulk at presentation. *Blood*. 2015;126(23):579.
- Picardi M, De Renzo A, Pane F, Nicolai E, Pacelli R, Salvatore M, et al. Randomized comparison of consolidation radiation versus observation in bulky Hodgkin's lymphoma with post-chemotherapy negative positron emission tomography scans. *Leukemia & Lymphoma*. 2007;48(9):1721-1727.
- Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(5):579-86.
- Brepoels L, Stroobants S, De Wever W, Spaepen K, Vandenbergh P, Thomas J, et al. Hodgkin lymphoma: Response assessment by Revised International Workshop Criteria. *Leukemia & Lymphoma*. 2007;48(8):1539-1547.
- Meignan M, Gallamini A, Haioun C. Report on the First International Workshop on interim-PET scan in lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 2009;50(8):1257-1260.
- Meignan M, Gallamini A, Haioun C, Polliack A. Report on the Second International Workshop on interim positron emission tomography in lymphoma held in Menton, France, 8-9 April 2010. *Leuk. Lymphoma*. 2010;51(12):2171-80.
- Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-68.
- Barrington SF, Mikhael NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müller SP, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3048-58.
- Weiler-Sagie M, Bushelev O, Epelbaum R, Dann EJ, Haim N, Avivi I, et al. 18F-FDG Avidity in Lymphoma Readdressed: A Study of 766 Patients. *J Nucl Med*. 2010;51(1):25-30.
- Levis A, Vitolo U, Ciocca Vasino MA, Cametti G, Urgesi A, Bertini M, et al. Predictive value of the early response to chemotherapy in high-risk stages II and III Hodgkin's disease. *Cancer*. 1987;60(8):1713-9.
- Gallamini A, Rigacci L, Merli F, Nassi L, Bosi A, Capodanno I, et al. The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage Hodgkin's disease. *Haematologica*. 2006;91(4):475-81.

41. Gallamini AI, Hutchings M, Rigacci L, Specht L, Merli F, Hansen M, et al. Early interim 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study. *J Clin Oncol.* 2007;25(24):3746-52.
42. Evens AM, Kostakoglu L. The role of FDG-PET in defining prognosis of Hodgkin lymphoma for early-stage disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2014;2014(1):135-43.
43. Cerci J, Pracchia LF, Linardi C, Pitella F, Delbeke D, Izaki M, et al. 18F-FDG PET After 2 Cycles of ABVD Predicts Event-Free Survival in Early and Advanced Hodgkin Lymphoma. *J Nucl Med.* 2010;51(9):1337-43.
44. Kostakoglu L, Gallamini A. Interim 18F-FDG PET in Hodgkin lymphoma: would PET-adapted clinical trials lead to a paradigm shift? *J Nucl Med.* 2013;54(7):1082-93.
45. Radford J, Illidge T, Counsell N, Hancock B, Pettengell R, Johnson P, et al. Results of a Trial of PET-Directed Therapy for Early-Stage Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2015;372(17):1598-607.
46. Raemaekers JM, André MP, Federico M, Girinsky T, Oumedaly R, Brusamolino E, et al. Omitting Radiotherapy in Early Positron Emission Tomography-Negative Stage I/II Hodgkin Lymphoma Is Associated With an Increased Risk of Early Relapse: Clinical Results of the Preplanned Interim Analysis of the Randomized EORTC/LYSA/FIL H10 Trial. *J Clin Oncol.* 2014;32(12):1188-94.
47. Gallamini A, Kostakoglu L. Does interim PET increase the value of ABVD in advanced-stage Hodgkin lymphoma? *Ann Oncol.* 2015;26(6):1045-7.
48. Pusey WA. Cases of sarcoma and of Hodgkin's disease treated by exposure to X-rays-a preliminary report. *J Am Med Assoc.* 1902;38:166-96.
49. Armitage JO. Early-Stage Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2010;363(7):653-62.
50. Hodgson DC, Hudson MM, Constine LS. Pediatric Hodgkin lymphoma: maximizing efficacy and minimizing toxicity. *Semin Radiat Oncol.* 2007;17(3):230-242.
51. Girinsky T, van der Maazen R, Specht L, Aleman B, Poortmans P, Lievens Y, et al. Involved-node radiotherapy (INRT) in patients with early Hodgkin lymphoma: concepts and guidelines. *Radiother Oncol.* 2006;79(3):270-7.
52. Specht L, Yahalom J, Illidge T, Berthelsen AK, Constine LS, Eich HT, et al. Modern Radiation Therapy for Hodgkin Lymphoma: Field and Dose Guidelines From the International Lymphoma Radiation Oncology Group (ILROG). *Int J Radiation Oncol Biol Phys.* 2014;89(4):854e-862.
53. Engert A, Plütschow A, Eich HT, Lohri A, Dörken B, Borchmann P, et al. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2010;363(7):640-52.
54. Eich HT, Diehl V, Görgen H, Pabst T, Markova J, Debus J, et al. Intensified chemotherapy and dose-reduced involved-field radiotherapy in patients with early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD11 trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(27):4199-206.
55. Connors JM. Positron emission tomography in the management of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:317-322.
56. Engert A, Franklin J, Eich HT, Brillant C, Sehlen S, Cartoni C, et al. Two cycles of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine plus extended-field radiotherapy is superior to radiotherapy alone in early favorable Hodgkin's lymphoma: final results of the GHSG HD7 trial. *J Clin Oncol.* 2007;25(23):3495-502.
57. Ferme C, Eghbali H, Meerwaldt JH, Rieux C, Bosq J, Berger F, et al. Chemotherapy plus involved-field radiation in early-stage Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 2007;357(19):1916-27.
58. Tubiana M, Henry-Amar M, Hayat M, Burgers M, Qasim M, Somers R, et al. The EORTC treatment of early stages of Hodgkin's disease: the role of radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1984;10(2):197-210.
59. Hoskin PJ, Smith P, Maughan TS, Gilson D, Vernon C, Syndikus I, et al. Long-term results of a randomised trial of involved field radiotherapy vs extended field radiotherapy in stage I and II Hodgkin lymphoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2005;17(1):47-53.
60. Meyer RM, Gospodarowicz MK, Connors JM, Pearcey RG, Wells WA, Winter JN, et al. ABVD alone versus radiation-based therapy in limited-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2012;366(5):399-408.
61. Eichenauer DA, Engert A, André M, Federico M, Illidge T, Hutchings M, et al. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up. *Ann Oncol.* 2014;25 Suppl 3:iii70-5.
62. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Hodgkin Lymphoma. Version 2.2015.
63. von Tresckow B, Plütschow A, Fuchs M, Klimm B, Markova J, Lohri A, et al. Dose-Intensification in Early Unfavorable Hodgkin's Lymphoma: Final Analysis of the German Hodgkin Study Group HD14 Trial. *J Clin Oncol.* 2012;30(9):907-13.
64. Canellos GP, Niedzwiecki D. Long-term follow up of Hodgkin's disease trial. *N Engl J Med.* 2002 May 2;346(18):1417-8.
65. Bonadonna G, Viviani S, Bonfante V, Gianni AM, Valagussa P. Survival in Hodgkin's disease patients - Report of 25 years of experience at the Milan cancer Institute. *Eur J Cancer.* 2005;41(7):998-1006.
66. Engert A, Diehl V, Franklin J, Lohri A, Dörken B, Ludwig WD, et al. Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 years of follow up of the GHSG HD9 study. *J Clin Oncol.* 2009;27(27):4548-54.
67. Viviani S, Zinzani PL, Rambaldi A, Brusamolino E, Levis A, Bonfante V, et al. ABVD versus BEACOPP for Hodgkin's lymphoma when high-dose salvage is planned. *N Engl J Med.* 2011;365(3):203-12.
68. Federico M, Luminari S, Iannitto E, Polimeno G, Marcheselli L, Montanini A, et al. ABVD compared with BEACOPP compared with CEC for the initial treatment of patients with advanced Hodgkin's lymphoma: results from the HD2000 Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi Trial. *J Clin Oncol.* 2009; 27(5):805-11.
69. Gallamini A, Rossi A, Patti C, Picardi M, Di Raimondo F, Cantonetti M, et al. Interim-PET adapted chemotherapy in advanced Hodgkin Lymphoma: results of the second interim analysis of the Italian GITIL/FIL HD0607 trial. *Hematol Oncol.* 2015;33(S1):163.Abstract 118.
70. Johnson P, Federico M, Fossa A, O'Doherty M, Roberts T, Stevens L, et al. Response-adapted therapy based on interim FDG-PET scans in advanced Hodgkin lymphoma: first analysis of the safety of de-escalation and efficacy of escalation in the international RATHL study (CRUK/07/033). In: 13th International Conference on Malignant Lymphoma (ICML) 2015.
71. Nogová L, Reineke T, Eich HT, Josting A, Müller-Hermelink HK, Wingbermühle K, et al. Extended field radiotherapy, combined modality treatment or involved field radiotherapy for patients with stage IA lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma: a retrospective analysis from the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Ann Oncol.* 2005;16(10):1683-1687.
72. Shulz H, Rehwald U, Morschhauser F, Elter T, Driessen C, Rüdiger T, et al. Rituximab in relapsed lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: long term results of phase 2 trial by German Hodgkin Study Group (GHSG). *Blood.* 2008;111(1):109-11.
73. Brenner H, Gondos A, Pulte D. Ongoing improvement in long-term survival of patients with Hodgkin disease at all ages and recent catch-up of older patients. *Blood.* 2008;111(6):2977-83.
74. Linch DC, Winfield D, Goldstone AH, Moir D, Hancock B, McMillan A, et al. Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: results of a BNLI randomised trial. *Lancet.* 1993; 341(8852):1051-4.
75. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, Sieber M, Carella AM, Haenel M, et al. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial. *Lancet.* 2002;359(9323):2065-71.
76. Josting A, Rudolph C, Reiser M, Mapara M, Sieber M, Kirchner HH, et al. Time-intensified dexamethasone/cisplatin/cytarabine: an effective salvage therapy with low toxicity in patients with relapsed and refractory Hodgkin's disease. *Ann Oncol.* 2002;13(10):1628-35.
77. Sureda A, Constans M, Iriando A, Arranz R, Caballero MD, Vidal MJ, et al. Prognostic factors affecting long-term outcome after stem cell transplantation in Hodgkin's lymphoma autografted after a first relapse. *Ann Oncol.* 2005;16(4):625-33.
78. Ferme C, Mounier N, Divine M, Brice P, Stamatoullas A, Reman O, et al. Intensive therapy with high-dose chemotherapy for patients with advanced Hodgkin's disease

- in relapse or failure after initial chemotherapy: Results of the Groupe d'Études des Lymphomes de l'Adulte H89 Trial. *J Clin Oncol*. 2002;20(2):467-75.
79. Mocikova H, Pytlík R, Markova J, Steinerova K, Kral Z, Belada D, et al. Pre-transplant positron emission tomography in patients with relapsed Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(9):1668-74.
 80. Sweetenham JW. "Pet negativity" the new goal of cytoreductive therapy in Hodgkin's lymphoma? *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(11):1569-70.
 81. Moskowitz CH, Matasar MJ, Zelenetz AD, Nimer SD, Gerecitano J, Hamlin P, et al. Normalization of pre-ASCT, FDG-PET imaging with second-line, non-cross-resistant, chemotherapy programs improves event-free survival in patients with Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012;119(7):1665-70.
 82. Josting A, Rudolph C, Mapara M, Glossmann JP, Sieniawski M, Sieber M, et al. Cologne high-dose sequential chemotherapy in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma: results of a large multicenter study of the German Hodgkin Lymphoma Study Group (GHSG). *Ann Oncol*. 2005;16(1):116-23.
 83. Josting A, Müller H, Borchmann P, Baars JW, Metzner B, Döhner H, et al. Dose intensity of chemotherapy in patients with relapsed Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(34):5074-80.
 84. Magagnoli M, Spina M, Balzarotti M, Timofeeva I, Isa L, Michieli M, et al. IGEEV regimen and a fixed dose of lenograstim: an effective mobilization regimen in pretreated Hodgkin's lymphoma patients. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(11):1019-25.
 85. Moskowitz AJ, Yahalom J, Kewalramani T, Maragulia JC, Vanak JM, Zelenetz AD, et al. Pretransplantation functional imaging predicts outcome following autologous stem cell transplantation for relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2010;116(23):4934-7.
 86. Moskowitz AJ, Schöder H, Yahalom J, McCall SJ, Fox S, Gerecitano J, et al. PET-adapted sequential salvage therapy with brentuximab-vedotin followed by augmented ifosamide, carboplatin, and etoposide for patients with relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma: a non-randomised, open-label, single-centre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2015;16(3):284-92.
 87. Evens AM, Hong F, Gordon LI, Fisher RI, Bartlett NL, Connors JM, et al. The efficacy and tolerability of adriamycin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine and Stanford V in older Hodgkin lymphoma patients: A comprehensive analysis from the North American Intergroup trial E2496. *Br J Haematol*. 2013;161(1):76-86.
 88. Levis A, Anselmo AP, Ambrosetti A, Adamo F, Bertini M, Cavalieri E, et al. VEPEMB in elderly Hodgkin's lymphoma patients. Results from an Intergruppo Italiano Linfomi (IIL) study. *Ann Oncol*. 2004;15(1):123-8.
 89. Jagaadish D, Diefenbach C, Evens AM. Hodgkin lymphoma in older patients: challenges and opportunities to improve outcomes. *Haematol Oncol*. 2013;31(S1):69-75.
 90. Klimm B, Diehl V, Engert A. Hodgkin's lymphoma in the elderly: a different disease in patients over 60. *Oncology (Williston Park)* 2007;21(8): 982-90; discussion 90, 96, 98 passim.
 91. Evens AM, Helenowski I, Ramsdale E, Nabhan C, Karmali R, Hanson B, et al. A retrospective multicenter analysis of elderly Hodgkin lymphoma: outcomes and prognostic factors in the modern era. *Blood*. 2012;119(3):692-5.
 92. Proctor SJ, Wilkinson J, Jones G, Watson GC, Lucraft HH, Mainou-Fowler T, et al. Evaluation of treatment outcome in 175 patients with Hodgkin lymphoma aged 60 years or over: the SHIELD study. *Blood*. 2012;119(25):6005-15.
 93. Stark GL, Wood KM, Jack F, Angus B, Proctor SJ, Taylor PR. Hodgkin's disease in the elderly: a population-based study. *Br J Haematol*. 2002;119(2):432-40.
 94. van Spronsen DJ, Janssen-Heijnen ML, Lemmens VE, Peters WG, Coebergh JW. Independent prognostic effect of co-morbidity in lymphoma patients: results of the population-based Eindhoven Cancer Registry. *Eur J Cancer*. 2005;41(7):1051-7.
 95. Evens AM, Sweetenham JW, Horning SJ. Hodgkin lymphoma in older patients: an uncommon disease in need of study. *Oncology (Williston Park)* 2008; 22(12):1369-79.
 96. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*. 1998;339(21):1506-14.
 97. Landgren O, Algernon C, Axedorph U, Nilsson B, Wedelin C, Porwit-MacDonald A, et al. Hodgkin's lymphoma in the elderly with special reference to type and intensity of chemotherapy in relation to prognosis. *Haematologica*. 2003;88(4):438-44.
 98. Böll B, Görgen H, Fuchs M, Pluetschow A, Eich HT, Bargetzi MJ, et al. ABVD in older patients with early-stage Hodgkin lymphoma treated within the German Hodgkin Study Group HD10 and HD11 trials. *J Clin Oncol*. 2013;31(12):1522-9.
 99. Levis A, Depaoli L, Bertini M, Botto B, Ciravegna G, Freilone R, et al. Results of a low aggressivity chemotherapy regimen (CVP/CEB) in elderly Hodgkin's disease patients. *Haematologica*. 1996;81(5):450-6.
 100. Kostad A, Nome O, Delabie J, Lauritzen GE, Fossa A, Holte H. Standard CHOP-21 as first line therapy for elderly patients with Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2007;48(3):570-576.
 101. Halbsgut TV, Nogova L, Mueller H, Sieniawski M, Eichenauer DA, Schober T, et al. Phase 2 study of BACOPP in older patients with Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Blood*. 2010;116(12):2026-32.
 102. Böll B, Bredenfeld H, Görgen H, Halbsgut T, Eich HT, Soekler M, et al. Phase 2 study of PVAG (prednisone, vinblastine, doxorubicin, gemcitabine) in elderly patients with early unfavorable or advanced stage Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011;118(24):6292-8.

Parole Chiave

Linfoma di Hodgkin, stadiazione, prognosi, terapia.

Indirizzi per la corrispondenza

Andrea Gallamini

Piazza Europa 13, 12100 Cuneo, Italia

Tel. 338 5032130

Mail: andrea.gallamini@gmail.com

La rivista è consultabile anche sui siti web:

Società Italiana di Ematologia (SIE)

www.siematologia.it

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)

www.siesonline.it

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini

www.beat-leukemia.com

Nel prossimo numero: Anno 3 - Numero 2 - 2016

Trapianto allogenico

L'evoluzione della filosofia trapiantologica nella leucemia acuta

Scelta del donatore di cellule staminali

Regimi di condizionamento

Profilassi e terapia della GvHD acuta

Profilassi e terapia della recidiva post-trapianto

Con il supporto non condizionato di

