

Anno 4 - Numero 3 - 2017

# **Ematologia** **Oncologica**.it

**Nuove strategie  
di immunoterapia**

Organo Ufficiale  
della **Fondazione Matarrelli** - Milano

*Con il supporto non condizionato di*



## Nuove strategie di immunoterapia

### **Elementi di immunoterapia** **7**

*Francesco Di Virgilio, Anna Lisa Giuliani*

---

### **Linfomi Maligni**

*Fortunato Morabito, Massimo Gentile, Lucio Morabito, Ernesto Vigna* **17**

---

### **Mieloma Multiplo**

*Alessandra Larocca, Mario Boccardo* **29**

---

### **Leucemie acute infantili refrattarie**

*Andrea Biondi, Chiara F. Magnani, Sarah Tettamanti, Ettore Biagi* **39**

---

### **Leucemia linfoblastica acuta dell'adulto**

*Sabina Chiaretti, Valentina Gianfelici, Robin Foà* **49**

---

## Ematologia Oncologica.it

Vol 4 - n.3 - 2017

### 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 rinviate 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

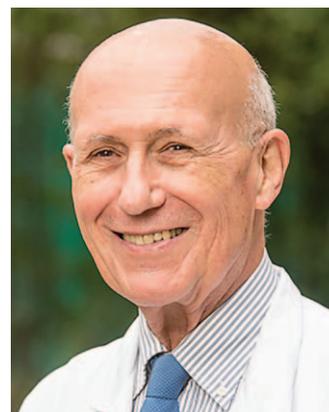
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. *The Hemoglobin*, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

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



Negli ultimi decenni abbiamo assistito ad un progressivo e significativo miglioramento nel trattamento delle emopatie neoplastiche, grazie all'introduzione di farmaci ad alta selettività per uno specifico bersaglio cellulare. Più recentemente sono state introdotte terapie immunobiologiche per l'eradicazione dei residui minimi di malattia, responsabili di recidive anche a distanza di anni. A queste è dedicato il numero attuale di *Ematologia Oncologica.it*.

È noto che l'immunoterapia può essere praticata con modalità differenti. La forma passiva agisce tramite l'uso di anticorpi diretti contro specifici antigeni tumorali. Viceversa, la forma attiva si basa su farmaci che inibiscono molecole espresse sulla membrana dei linfociti T (*immune check-point inhibitors*), su anticorpi bi-specifici capaci di creare un efficace ponte molecolare tra la cellula tumorale e la cellula T effettrice, e su cellule T ingegnerizzate per esprimere un recettore per l'antigene chimerico (*CAR T-cells*). Inoltre sono in corso sperimentazioni cliniche con nanoparticelle *immunoswitch*, con vaccinazioni a base di peptidi antigenici e con citochine immunostimolatorie. Tutte queste modalità di immunoterapia hanno aperto prospettive affascinanti nel campo dei tumori del sangue, anche se ancora oggi molte variabili ne condizionano il successo.

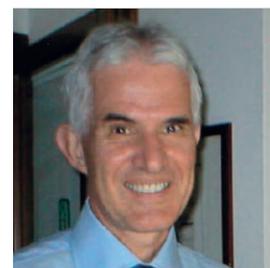
Il primo esempio di immunoterapia lo dobbiamo al rituximab, l'anticorpo anti-CD20 chimerico che ha rivoluzionato il trattamento dei linfomi maligni. La segnalazione di neoplasie a cellule B resistenti ha portato alla sintesi di altri anticorpi completamente umanizzati, che sembrano essere superiori al rituximab. L'utilizzo di coniugati farmaco-anticorpo ad alta capacità di legame su precisi target per ottenere un killing neoplastico selettivo con minimi effetti collaterali, sta assumendo una posizione di primo piano in alcune neoplasie linfatiche. Grande interesse stanno suscitando anche le terapie con gli inibitori dei *checkpoints*, gli anticorpi bi-

specifici e le *CAR T-cells*. Analoghe considerazioni si possono fare per il mieloma multiplo, patologia ancora incurabile nonostante i notevoli progressi di questi ultimi anni. Recentemente sono stati utilizzati diversi tipi di anticorpi monoclonali chimerici o umanizzati, da soli o in varie combinazioni polichemioterapiche. Questi esercitano un'attività citotossica con un meccanismo cellulo-mediato o legandosi ad un epitopo specifico della glicoproteina transmembrana CD38 oppure bloccando l'attività immunitaria con l'espressione di ligandi dei recettori *checkpoint*. Infine ancora sperimentali sono i tentativi di immunoterapia con *CAR T-cells*, dirette contro target specifici della cellula mielomatosa. L'efficacia clinica e/o la loro potenziale tossicità, dovuta al rilascio di citochine, stanno sollevando alcune perplessità.

Nelle leucemie dell'età pediatrica esiste la necessità di migliorare ulteriormente la sopravvivenza globale con nuove strategie immunoterapiche basate su anticorpi monoclonali e su cellule linfocitarie antitumorali potenziate tramite la terapia genica. Le *CAR T-cells* di prima e seconda generazione vengono attualmente utilizzate in protocolli sperimentali nelle forme linfatiche e mieloidi, che esprimono un ampio spettro di antigeni potenzialmente bersagliabili. I risultati sono promettenti, anche se è necessario migliorare il processo di manipolazione delle cellule e dei geni, nonché gestire i meccanismi di evasione immunologica. Analogamente nella leucemia linfoblastica acuta dell'adulto, lo sviluppo dell'immunoterapia sta aprendo nuove prospettive per migliorare la prognosi, attualmente largamente insoddisfacente soprattutto negli anziani. Nuovi anticorpi monoclonali bi-specifici o coniugati ad agenti citotossici sono stati sviluppati per i pazienti in recidiva o con malattia minima residua. Studi iniziali confermano la fattibilità e l'efficacia delle *CAR T-cells*, nonostante l'elevata incidenza di importanti effetti collaterali.



# Elementi di immunoterapia



Francesco Di Virgilio, Anna Lisa Giuliani

Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Ferrara

## Introduzione

L'introduzione dei farmaci di origine biologica ha rivoluzionato la terapia di molte patologie neoplastiche o su base infiammatoria cronica. Nonostante il costo a volte molto elevato di questi trattamenti (e le inevitabili ricadute sui Sistemi Sanitari Nazionali), la disponibilità di farmaci ad alta selettività per uno specifico bersaglio cellulare ha accresciuto enormemente l'efficacia del nostro armamentario terapeutico. Ciò non implica in nessun modo un pensionamento anticipato dei farmaci di sintesi chimica, ma piuttosto il loro affiancamento con nuove molecole di origine biologica caratterizzate da alta specificità e selettività, e perciò in grado di interagire con un determinato bersaglio molecolare con grande, virtualmente assoluta, precisione. L'impiego di molecole immunomodulatorie di origine biologica ha subito una vigorosa accelerazione a partire dal 1997, quando l'anticorpo monoclonale rituximab (diretto contro il determinante di superficie CD20, espresso dai linfociti B nelle fasi iniziali del differenziamento) ricevette dalle autorità regolatorie statunitensi (FDA) l'autorizzazione per il trattamento di neoplasie del sistema linfopoietico ed, in seguito, di leucemie e linfomi a cellule B e di alcune patologie autoimmuni<sup>(1,2)</sup>.

L'impetuoso sviluppo delle terapie immunobiologiche si è basato, da un lato sui progressi delle tecniche di biologia molecolare e di ingegnerizzazione cellulare e dall'altro su un radicale mutamento di paradigma nella terapia dei tumori<sup>(3)</sup>. Infatti, il perfezionamento delle tecniche di manipolazione di cellule ed anticorpi ha permesso di produrre molecole ricombinanti virtualmente specifiche per qualsiasi bersaglio cellulare e, grazie all'introduzione delle tecniche di umanizzazione degli anticorpi monoclonali, ha ridotto sostanzialmente il rischio di reazioni avverse. Inoltre, le nuove terapie antitumorali hanno progressivamente spostato l'enfasi dalla cellula neoplastica al contesto in cui si sviluppa la neoplasia (il microambiente tumorale), di cui il sistema immunitario è un componente fondamentale<sup>(4)</sup>. Per usare una perifrasi, si sta rapidamente affermando una nuova concezione della lotta contro i tumori basata su una più approfondita comprensione dell'ecologia del tumore, cioè dei rapporti che il tumore stabilisce con il microambiente che lo circonda e, più in generale, con l'organismo che lo ospita<sup>(3,5)</sup>.

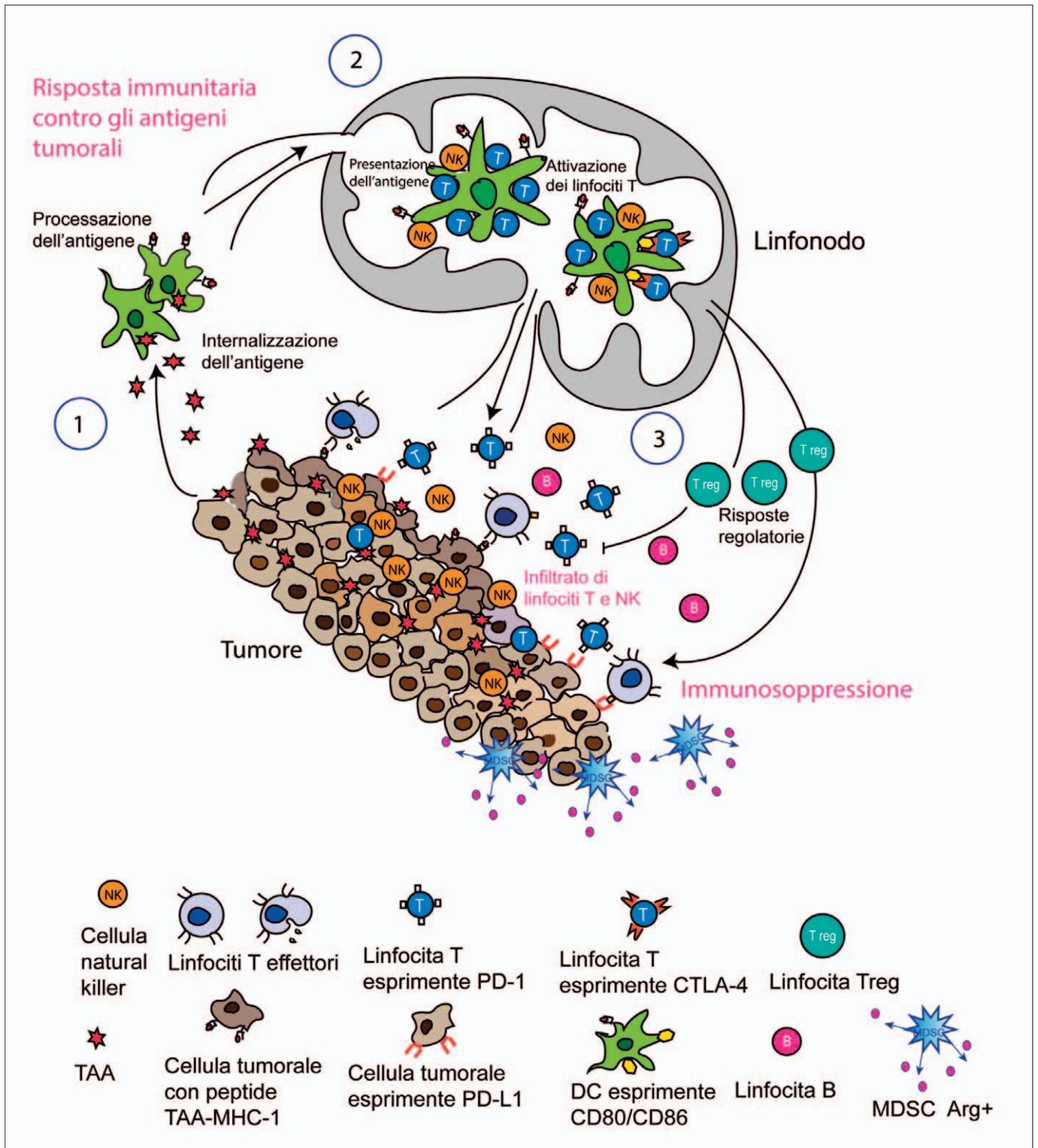
L'immunoterapia dei tumori ha attraversato fasi alterne nel suo sviluppo, fin dai tentativi iniziali di William Coley che nel 1891 sperimentò l'effetto dell'inoculo intratumorale di *Streptococcus pyogenes* e di *Serratia marcescens*<sup>(6)</sup>. Coley aveva notato che pazienti affetti da sarcoma che contraevano l'erisipela andavano occasionalmente incontro a remissione spontanea, ed aveva postulato che la concomitante infiammazione esercitasse una risposta citotossica contro il tumore. Questi primi tentativi di stimolare un'attiva risposta immunitaria antitumorale furono abbandonati nel corso degli anni, con l'eccezione della terapia locale del carcinoma vescicale con il bacillo di Calmette-Guerin<sup>(7)</sup>, e furono soppiantati dal trasferimento passivo di anticorpi (immunoterapia passiva) diretti contro proteine espresse da cellule tumorali<sup>(8)</sup>. L'impiego di questi bio-farmaci, ben radicato nella terapia di tumori solidi ed ematologici, è giustificato dai loro molteplici meccanismi d'azione, tra cui l'abilità di inibire specifiche vie di attivazione coinvolte nell'oncogenesi, la capacità di opsonizzare le cellule tumorali, di indurre una reazione citotossica anticorpo-dipendente (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC), o di stimolare la rimozione delle cellule tumorali per fagocitosi.

Si può considerare un esempio di immunoterapia passiva anche il trasferimento di cellule T da donatore nel contesto del trapianto allogenico di midollo osseo. Tuttavia l'azione terapeutica della reazione dei linfociti trapiantati (*graft-versus-leukemia effect*) oltre all'uccisione diretta delle cellule leucemiche da parte dei linfociti del donatore sfrutta anche un effetto stimolatorio più ampio sull'immunità innata ed acquisita, il che colloca il trapianto di midollo allogenico di buon diritto tra le tecniche di immunoterapia attiva<sup>(9)</sup>.

## Elementi di immunologia

La risposta immunitaria contro i tumori evolve schematicamente attraverso tre fasi schematizzate in Figura 1:

- le cellule dendritiche dell'ospite endocitano gli antigeni delle cellule tumorali, li elaborano e li associano ai complessi maggiori di istocompatibilità di I e II classe (MHC-I e MHC-II);



**Figura 1** - La risposta immunitaria contro i tumori. Tre fasi sono evidenziabili: 1) gli antigeni tumorali vengono internalizzati dalle cellule dendritiche dell'ospite che li processano ed associano a molecole MHC-II; 2) negli organi linfatici le cellule dendritiche presentano gli antigeni tumorali ai linfociti T; questo rappresenta un passaggio chiave poiché la presentazione dell'antigene da parte di cellule dendritiche non adeguatamente stimolate da segnali immunostimolanti accessori promuove l'espansione di popolazioni cellulari Treg soppressive. 3) i linfociti T attivati migrano dai linfonodi al tumore dove esercitano la loro azione citotossica sulle cellule neoplastiche. Al fine di evitare fenomeni autoaggressivi, i linfociti T esprimono anche molecole inibitorie, tra cui CTLA-4 e PD-1. Le cellule dendritiche stimolate esprimono CD80 e CD86 che legano il recettore CTLA-4 dei linfociti T e ne modulano negativamente l'attività. Le cellule tumorali esprimono PD-L1, l'agonista naturale di PD-1. Il legame PD-L1/PD-1 induce anergia o morte dei linfociti T. L'azione citotossica antitumorale dei linfociti T viene favorita dalla presentazione da parte delle cellule tumorali di peptidi derivati da TAA associati a molecole MHC-I. L'immunosoppressione nel microambiente tumorale viene sostenuta dall'azione delle cellule MDSC e dall'incremento della produzione di arginasi. CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; MDSC, myeloid derived suppressor cells; PD-1, programmed cell death-1; PD-L1, programmed cell death ligand-1; TAA: tumor associated antigens<sup>(6)</sup>.

- negli organi linfatici le cellule dendritiche presentano gli antigeni tumorali ai linfociti T;
- i linfociti T attivati dalle cellule dendritiche lasciano i linfonodi e penetrano nel tumore, dove esercitano la loro azione effettrice.

Queste tre fasi sono modulate in modo molto complesso nel microambiente tumorale e negli organi linfatici. Gli antigeni tumorali possono essere più o meno specifici, ed in ogni caso la loro elaborazione da parte delle cellule dendritiche è soggetta all'azione di numerosi fattori promoventi l'attivazione (maturazione) delle cellule dendritiche stesse<sup>(10)</sup>. Per esempio, agonisti dei *toll-like receptors* (TLRs) potenziano l'elaborazione e la presentazione degli antigeni. Un'azione simile è svolta anche dai segnali di danno endogeno o di allarme come le *high mobility group proteins* o l'ATP extracellulare<sup>(11)</sup>. Questi fattori endogeni, noti anche come DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) rivestono un ruolo importantissimo nella stimolazione dell'immunità anti-tumorale anche nel corso della terapia con alcuni chemioterapici citotossici che causano una forma particolare di morte cellulare nota come morte cellulare immunogenica<sup>(12,13)</sup>.

La stimolazione delle cellule dendritiche da parte dei DAMPs potenzia la presentazione degli antigeni tumorali attraverso molecole MHC-I e MHC-II e la successiva stimolazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. In assenza di stimoli immunogenici accessori, le cellule dendritiche che migrano alle stazioni linfatiche piuttosto che una risposta protettiva inducono una risposta tolerogenica, o addirittura provocano anergia.

La migrazione delle cellule dendritiche dal sito tumorale alle stazioni linfatiche permette l'attivazione e l'espansione di popolazioni linfocitarie effettrici, tra cui cellule *natural killer* (NK) e *T natural killer* (NKT)<sup>(14)</sup>. La stimolazione della risposta immunitaria nelle sedi linfonodali rappresenta un passaggio chiave nell'immunità anti-tumorale perché la presentazione dell'antigene da parte di cellule dendritiche non adeguatamente stimolate da segnali immunostimolanti accessori promuove l'espansione di popolazioni cellulari Treg soppressorie. Lo sviluppo di una efficiente risposta immunitaria richiede una rigorosa modulazione dell'attivazione delle cellule T al fine di evitare fenomeni autoaggressivi, per questo i linfociti T esprimono anche molecole inibitorie. Una delle più importanti e di grande rilievo nell'immunoterapia è CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*, CD152), un recettore di membrana espresso dai linfociti T attivati che viene legato dalle molecole CD80 e CD86 espresse sulla membrana delle cellule dendritiche antigene-stimolate<sup>(15)</sup>. L'attivazione di CTLA-4 modula negativamente le cellule T e perciò inibisce potentemente l'immunità antitumorale.

Le cellule T tumore-specifiche migrano poi dalle stazioni linfatiche al tumore e penetrano al suo interno. Durante la loro progressione, i tumori sono infatti infiltrati da cellule linfoidi e mieloidi, tra cui linfociti T CD8<sup>+</sup>, cellule Treg, macrofagi associati al tumore

(*tumor-associated macrophages*, TAM) e popolazioni di linfociti B immunosoppressivi. Un infiltrato ricco in linfociti T CD8<sup>+</sup> è considerato un fattore prognostico positivo, soprattutto in presenza di ridotti livelli di cellule Treg. Anche elevati livelli di macrofagi con fenotipo M1, in grado di attivare cellule NK e di secernere citochine di tipo Th1, sono considerati un indice prognostico favorevole<sup>(16)</sup>. Al contrario, sono indicatori prognostici infausti l'infiltrazione da parte di macrofagi di tipo M2, o la presenza nel microambiente tumorale di alte concentrazioni di citochine immunosoppressorie quali IL-10 e TGFβ1, di fattore di crescita per gli endoteli di tipo A (*vascular endothelial growth factor A*, VEGFA) e di metallo proteasi rimodellanti la matrice<sup>(17)</sup>.

Questa fase della risposta immunitaria anti-tumorale è molto delicata perché nel microambiente tumorale possono entrare in gioco diversi meccanismi immunosoppressori che riducono fino ad annullare l'attività antitumorale delle cellule immunitarie. Le cellule tumorali possono infatti inibire l'espressione di molecole MHC-I e di altri antigeni, ostacolando così il loro riconoscimento da parte dei linfociti T. Inoltre, le cellule T attivate esprimono il recettore PD-1 (*programmed cell death-1*) che è parte del fisiologico meccanismo di feed-back che modula la risposta immunitaria, ed ha perciò funzione inibitoria<sup>(18)</sup>. Le cellule tumorali possono sovra-esprimere l'agonista naturale di PD-1 (PD-1 *ligand*, PD-L1), e perciò sopprimere l'attività effettrice delle cellule T<sup>(19)</sup>. Le cellule tumorali possono anche rilasciare molecole immunosoppressorie, come l'indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO), o stimolarne la produzione a partire da precursori che si accumulano nel microambiente tumorale, come nel caso dell'adenosina che viene generata nello spazio interstiziale utilizzando come precursore l'ATP extracellulare<sup>(20,21)</sup>. L'adenosina è un potente agente immunosoppressore che inibisce le risposte delle cellule T effettrici e potenzia l'attività Treg. Nel microambiente tumorale le cellule T tumore-specifiche devono anche fronteggiare l'azione di cellule mieloidi soppressorie (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) infiltranti il tumore. Le cellule mieloidi soppressorie elaborano svariati fattori solubili che inibiscono la risposta immunitaria, tra cui l'arginina ed il TGFβ<sup>(22)</sup>.

Stanti queste premesse, sembra che tutto congiuri per rendere l'immunoterapia virtualmente impossibile per diversi motivi: gli antigeni associati al tumore sono in genere molto simili o addirittura identici agli antigeni espressi dalle cellule normali; l'interferenza con i fisiologici meccanismi di regolazione della risposta immunitaria è molto probabile che provochi un fenomeno autoaggressivo (autoimmunità); il microambiente tumorale è intrinsecamente immunosoppressivo. Perciò l'immunità anti-tumorale è inesorabilmente destinata ad essere repressa proprio nel sito anatomico dove la sua piena funzionalità è più necessaria. Tuttavia, i più recenti successi dell'immunoterapia stanno a dimostrare che queste scoraggianti previsioni possono essere smentite.

## Immunoterapia

Le immunoterapie anti-tumorali sono generalmente classificate come passive o attive, in base alla loro abilità di stimolare le risposte del sistema immunitario dell'ospite contro le cellule tumorali <sup>(23)</sup>. L'utilizzo di anticorpi diretti contro cellule tumorali o l'infusione di cellule T utilizzate per terapia adottiva sono considerate forme di immunoterapia passiva poiché dotate di attività anti-neoplastica intrinseca <sup>(24,25)</sup>. Al contrario, l'immunoterapia attiva prevede l'uso di vaccini anti-cellule tumorali o di anticorpi (per es. *check-point inhibitors*) che svolgono un'azione anti-tumorale in seguito al reclutamento del sistema immunitario dell'ospite. In alternativa, le immunoterapie anti-tumorali possono essere classificate in base alla specificità antigenica. Perciò, gli anticorpi anti-cellule tumorali sono considerati terapie antigene-specifiche, mentre le citochine immuno-stimolatorie e i *check-point inhibitors*, che attivano risposte immunitarie ad ampia e non sempre ben definita specificità, sono considerati non antigene-specifici <sup>(15,26)</sup>.

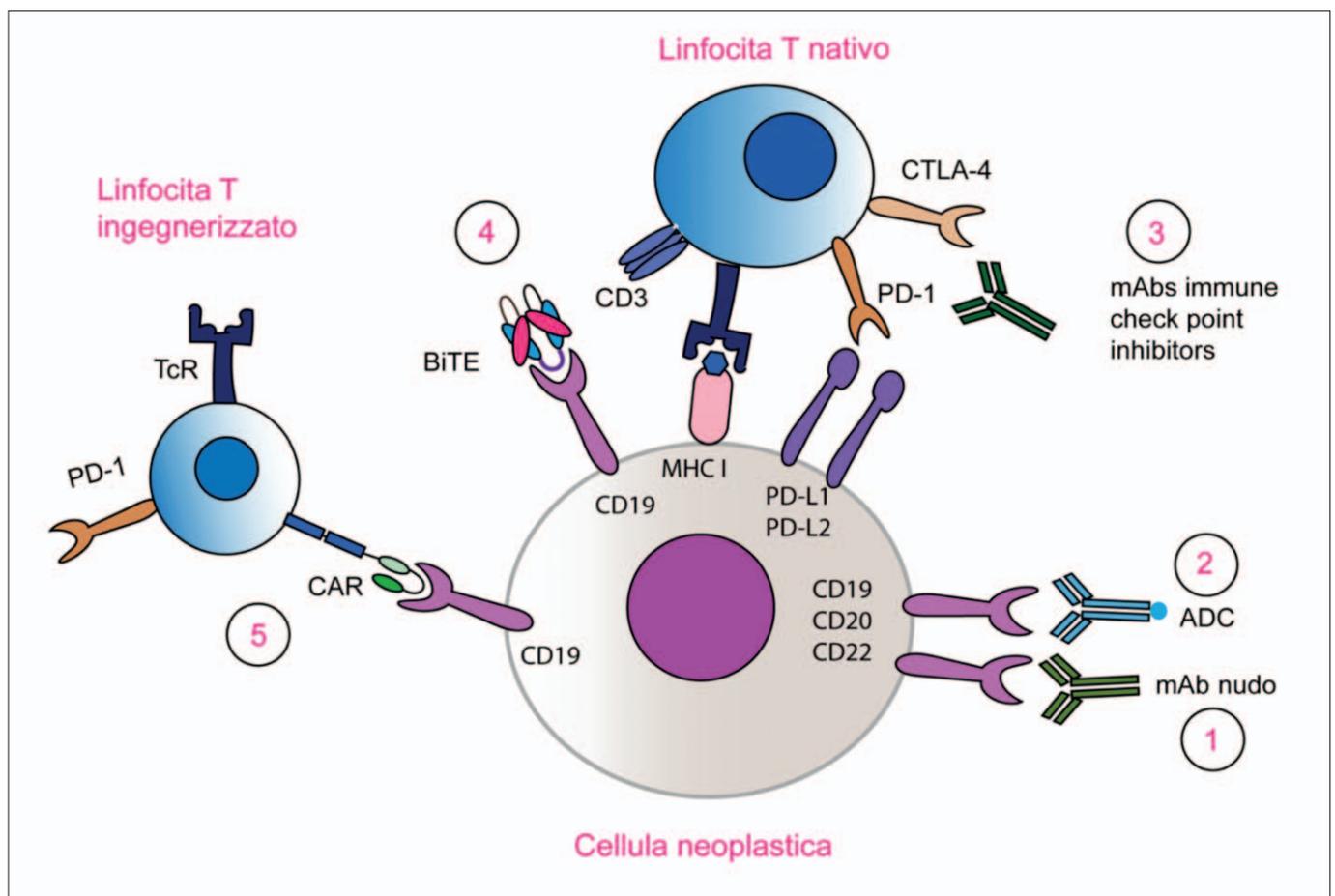
## Immunoterapia passiva

Una forma molto diffusa e ben caratterizzata di immunoterapia passiva è costituita dall'utilizzo di anticorpi diretti contro specifici antigeni tumorali. Tali anticorpi sono in grado di svolgere una delle seguenti funzioni:

- riconoscere le cellule tumorali che esprimono antigeni tumore associati (*tumor-associated antigens*, TAA), ovvero antigeni specificamente o prevalentemente espressi dalle cellule tumorali ma non dalle cellule normali di quel tessuto <sup>(27)</sup>;
- alterare in modo specifico la sequenza di segnalazione intracellulare attivata da recettori di membrana delle cellule tumorali <sup>(28)</sup>;
- legare e neutralizzare segnali trofici rilasciati dalle stesse cellule tumorali o dalle cellule dello stroma che supporta la neoplasia <sup>(29)</sup>.

Vengono correntemente utilizzate cinque diverse strategie nella terapia con anticorpi anti-cellule tumorali (Figura 2, tabella1).

La prima consiste di anticorpi che inibiscono vie di segnalazione necessarie per la sopravvivenza della cellula neoplastica o per la pro-



**Figura 2** - Principali meccanismi di azione della immunoterapia. Vengono utilizzati: 1) anticorpi monoclonali nudi TAA-specifici con funzioni di opsonizzazione, ADCC, fagocitosi, attivazione del complemento; 2) anticorpi monoclonali coniugati a tossine o radionuclidi; 3) anticorpi monoclonali con attività di immune check point inhibitors bloccando gli effetti della attivazione di PD-1 e CTLA-4; 4) anticorpi bifunzionali BiTEs in grado di indurre una stretta interazione tra linfociti T e cellule tumorali e di attivare le cellule T in assenza di segnali co-stimolatori; 5) linfociti T ingegnerizzati esprimenti CAR in grado di riconoscere molecole di superficie indipendentemente da molecole MHC. ADC, antibody-drug conjugated; ADCC, antibody dependent cell cytotoxicity; BiTE, bispecific T-cell engager antibody; CAR, chimeric antigen receptor; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; mAb, monoclonal antibody; PD-1, programmed cell death-1; PD-L1, programmed cell death ligand-1; TcR, T cell receptor <sup>(43)</sup>.

gressione del tumore. Tra questi ricordiamo il cetuximab, un anticorpo monoclonale specifico per il recettore del fattore di crescita per gli epitelii (*epidermal growth factor receptor*, EGF-R) che viene utilizzato per il trattamento del cancro della testa e del collo (*head and neck carcinoma*, HNC) e del carcinoma coloretale (*colorectal carcinoma*, CRC) <sup>(30)</sup>.

La seconda strategia terapeutica prevede l'uso di anticorpi che attivano recettori potenzialmente letali espressi sulla superficie delle cellule neoplastiche, ma non della loro controparte normale. Tra questi il tigatuzumab un anticorpo monoclonale specifico per il recettore di membrana TNFRSF10B (noto anche come TRAILR2 o DR5) appartenente alla superfamiglia dei recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNF) <sup>(31)</sup>. Una terza strategia è costituita dai cosiddetti immuno-coniugati, ovvero anticorpi specifici per TAA ai quali vengono legate tossine o radionuclidi. Tra questi ricordiamo:

- il coniugato gemtuzumab-ozogamicina, un anticorpo anti-CD33 coniugato con calicheamicina che viene utilizzato per la terapia della leucemia mieloide acuta (LMA) <sup>(32)</sup>;
- il coniugato inotuzumab-ozogamicina, un anticorpo anti CD22 coniugato con calicheamicina;
- il coniugato SGN-CD19A (denintuzumab mafodotin), un anticorpo anti CD19 coniugato con l'agente citotossico monometil auristatina F;
- il coniugato SAR3419 (ora noto anche con la denominazione di coltuximab-ravtansine), un anticorpo anti CD19 coniugato all'agente citotossico ravtansine DM4 utilizzato per la terapia del linfoma diffuso a grandi cellule B <sup>(33,34)</sup>.

Sono state portate in sperimentazione clinica anche miscele di due anticorpi, anti CD19 e CD22, coniugati con la catena A della tossina della ricina, somministrati in combinazione (combotox) <sup>(35)</sup>.

Per una rivisitazione degli approcci correnti di immunoterapia passiva nella leucemia linfoblastica acuta il lettore può consultare la recente rassegna di Ai e Advani <sup>(36)</sup>.

La quarta strategia prevede l'uso di anticorpi TAA-specifici in grado di eliminare le cellule tumorali grazie alla attivazione di un insieme di reazioni: opsonizzazione e perciò attivazione della ADCC, fagocitosi anticorpo-dipendente, e citotossicità mediata dalla attivazione del sistema del complemento. Un esempio di questo tipo di anticorpi è costituito dal rituximab, un anticorpo anti CD20, attualmente utilizzato per il trattamento della leucemia linfatica cronica (LLC) e dei linfomi non-Hodgkin <sup>(37)</sup>. Un altro esempio è costituito dall'elotuzumab, un anticorpo IgG1 umanizzato diretto contro l'antigene SLAMF7 (*signaling lymphocytic activation molecule family 7*) noto anche come CS-1 (*cell-surface glycoprotein CD2 subset 1*). SLAMF7 è espresso sulle cellule NK, e si rinviene nel 95% dei pazienti con mieloma multiplo. Elotuzumab è l'unico anticorpo monoclonale che, in associazione con lenalidomide e desametasone, è giunto con incoraggianti risultati in fase 3 nella cura del mieloma multiplo <sup>(38)</sup>. Un'ultima strategia prevede l'utilizzo dei cosiddetti BiTEs (BiTE, *bispecific T cell Engager*), ovvero anticorpi bifunzionali chimerici formati dalle regioni variabili di due diversi anticorpi monoclonali, uno diretto contro un TAA e l'altro contro un antigene di superficie dei linfociti T <sup>(39)</sup>. Un esempio è costituito dal blinatumomab, un BiTE specifico per CD19 e CD3, recentemente approvato per il tratta-

Strategia terapeutica	Anticorpi	Bersagli	Tumori trattati
Inibizione di vie di segnalazione essenziali per la sopravvivenza della cellula neoplastica	Cetuximab	EGF-R	Carcinomi della testa e del collo (HNC); carcinoma del retto-colon (CRC)
Attivazione di recettori letali per la cellula neoplastica	Tigatuzumab	TNFRSF10B	Carcinoma della mammella triplo negativo
Veicolazione di tossine o radionuclidi attraverso il legame con antigeni tumorali specifici	Gemtuzumab-ozogamicina	CD33	Leucemia mieloide acuta (LMA)
	Inotuzumab-ozogamicina	CD22	Leucemia linfoblastica acuta (LLA)
Stimolazione di opsonizzazione, fagocitosi, ADCC, attivazione del complemento attraverso il legame con antigeni tumorali specifici	Rituximab	CD20	Leucemia linfocitica cronica (LLC/LINFOMI B)
	Elotuzumab	SLAMF7	Mieloma multiplo (MM)
Promozione dell'interazione cellula tumorale-linfociti T attraverso anticorpi bifunzionali chimerici specifici per un antigene tumorale e per il recettore CD3 dei linfociti T (BiTEs)	Blinatumomab	CD19+CD3	Leucemia linfoblastica acuta (LLA negativa per il cromosoma Philadelphia)

Tabella 1 - Principali anticorpi monoclonali utilizzati nella immunoterapia passiva.

mento della leucemia linfoblastica acuta (LLA) a cellule B negativa per il cromosoma Philadelphia<sup>(40)</sup>.

L'attività terapeutica degli anticorpi opsonizzanti e dei BiTEs implica la partecipazione del sistema immunitario. Perciò queste strategie possono essere anche annoverate tra le immunoterapie attive. D'altra parte, anche anticorpi cosiddetti nudi possono essere considerati a pieno titolo agenti immunoterapeutici attivi poiché la loro attività terapeutica risiede in parte o in tutto nella loro capacità di stimolare il sistema immunitario dell'ospite. Per esempio il cetuximab, oltre ad inibire l'EGF-R, è anche in grado di promuovere l'ADCC e di indurre effetti immunostimolatori ad ampio spettro<sup>(41)</sup>. Analogamente, l'anticorpo bevacizumab, approvato nel trattamento di diversi tumori tra cui il glioblastoma multiforme ed i carcinomi del colon retto, della cervice uterina, del rene e del polmone, oltre a svolgere un effetto anti-angiogenetico in quanto inibitore del VEGFA, è anche in grado di promuovere l'infiltrazione del tumore da parte di linfociti T e B, e di inibire i linfociti Treg<sup>(42)</sup>.

### Immunoterapia attiva

Attualmente, tre approcci terapeutici basati sulla modulazione del sistema immunitario (immunoterapia attiva) sono stati approvati per l'impiego clinico:

- blocco delle molecole che fungono da inibitori della risposta immunitaria (*immune check-point inhibitors*) espresse sulla membrana plasmatica dei linfociti T. Sono disponibili anticorpi (nivolumab e pembrolizumab) diretti contro il recettore PD-1, utilizzati soprattutto per il trattamento del linfoma di Hodgkin, ed anticorpi anti-CTLA-4 (ipilimumab), sperimentati con successo in varie neoplasie ematologiche<sup>(43)</sup>;
- terapia con anticorpi bi-specifici (BiTE, vedi sopra) per il trattamento della LLA negli adulti;
- terapia con cellule T esprimenti un recettore chimerico per l'antigene (*chimeric antigen receptor (CAR)-T-cells*), soprattutto per la terapia della LLA refrattaria al trattamento con i correnti protocolli chemioterapici.

Probabilmente il progresso più rilevante nell'immunoterapia dei tumori è stato l'introduzione dell'ipilimumab nella terapia del melanoma metastatico<sup>(44)</sup>. L'impiego di questo anticorpo monoclonale ha dimostrato l'efficacia di terapie volte ad interferire con i processi endogeni di immunomodulazione, ed ha incentivato lo sviluppo di protocolli che sfruttano l'inibizione di altri recettori espressi dai linfociti T<sup>(45)</sup>. Tra questi, un recettore inibitorio delle cellule T che sta suscitando un certo interesse quale bersaglio della immunoterapia è LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*)<sup>(46)</sup>. I linfociti T attivati esprimono LAG-3 al fine di prevenire la sovra-stimolazione, ma tuttavia ciò nel contesto della risposta immunitaria al tumore provoca immunosoppressione. LAG-3 è espresso da linfociti T attivati e cellule NK, nonché da Tregs. Il legame di LAG-3 da parte di molecole espresse sulla membrana delle cellule tumorali (putativamente le lec-

tine LSEctin e Galectin-3) inibisce la funzionalità delle cellule T effettrici, e stimola l'attività delle cellule Treg. Trials clinici basati sulla somministrazione di una proteina di fusione IMP321-LAG-3 Ig (forma solubile di LAG-3 coniugata con un anticorpo), o di anticorpi monoclonali diretti contro LAG-3 sono in corso.

Le speranze più concrete di sviluppo dell'immunoterapia si concentrano attualmente sull'uso di anticorpi diretti contro il sistema PD-1/PD-L1. Sono attualmente autorizzati due anticorpi monoclonali contro PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) e due contro PD-L1 (atezolizumab e durvalumab). Questi anticorpi hanno dimostrato una buona efficienza terapeutica in diverse neoplasie solide, e stanno avendo un riscontro positivo anche nei tumori ematologici. Il nivolumab ed il pembrolizumab sono stati utilizzati con successo nel linfoma di Hodgkin ed in linfomi non Hodgkin, in alcuni protocolli terapeutici in associazione con altri anticorpi monoclonali (per es. il brentuximab). La applicazione dei *check-point inhibitors* nella terapia del mieloma multiplo ha dato risultati meno incoraggianti, ma è in corso la valutazione della possibile associazione di anticorpi anti PD-1 o PD-L1 con anticorpi monoclonali diretti contro altri determinanti espressi da cellule Treg o NK (per es. contro CD38 o contro il recettore inibitorio KIR). Evidenze preliminari suggeriscono che check-point inhibitors (anti-CTLA4, PD-1 o PD-L1) potrebbero rivelarsi utili anche nella terapia della leucemia mieloide acuta (LMA), nella leucemia mieloide cronica (LMC) e nella sindrome mielodisplastica.

Poiché alcuni pazienti risultano non responsivi ai trattamenti anti-CTLA4 e anti-PD-1, ulteriori studi sono in corso per individuare nuovi check-point inhibitors. Studi recenti hanno identificato TIGIT (*T-cell immunoglobulin and ITIM domain*) e CD96 quali bersagli potenzialmente utilizzabili nell'immunoterapia dei tumori<sup>(47,48,49)</sup>. TIGIT e CD96 sono recettori co-inibitori che insieme al recettore CD226 danno vita ad un meccanismo analogo a quello della coppia CD28/CTLA-4. TIGIT è un membro della superfamiglia delle Ig la cui funzione è stata finora principalmente studiata nelle cellule NK, mentre CD96 è espresso da linfociti T, cellule NK e cellule NKT. I loro ligandi sono costituiti da CD155 e CD112, rispettivamente, espressi da cellule dendritiche, linfociti T e molti altri tipi cellulari, incluse le cellule tumorali. Studi recenti suggeriscono che TIGIT e CD96 possano essere bersagli promettenti da combinare con le attuali immunoterapie. Poiché l'espressione di TIGIT è aumentata sui Treg e sulle cellule T effettrici associate ai tumori rispetto agli organi periferici, le terapie contro TIGIT potrebbero avere un rischio minore di provocare una risposta autoimmunitaria. Studi preliminari in pazienti affetti da melanoma hanno dimostrato il vantaggio terapeutico della somministrazione combinata di anticorpi anti-TIGIT e anti-PD-1 rispetto alla somministrazione del solo anticorpo anti-PD-1. Infatti, il trattamento combinato stimola molto più efficacemente l'espansione dei linfociti CD8<sup>+</sup> specifici per gli antigeni del melanoma e la risposta citotossica antitumorale<sup>(50)</sup>.

Oltre alle terapie basate sulla somministrazione di anticorpi sono oggetto di grande attenzione anche le terapie cellulari, che prevedono cioè l'infusione di cellule immunitarie attivate. Probabilmente il primo esempio clinico di immunoterapia attiva si può far risalire alla reazione contro il tumore in seguito all'infusione di cellule allo-geniche nel contesto del trapianto di midollo per la terapia delle leucemie <sup>(9)</sup>. Sulla base di queste osservazioni iniziali si sono sviluppate diverse procedure basate sull'impiego terapeutico di cellule T attivate. Con trasferimento cellulare adottivo (*adoptive cell transfer*, ACT), si intende una complessa procedura che prevede la raccolta di linfociti infiltranti il tumore, la loro selezione, modificazione ed espansione *ex vivo*, e la loro re-infusione nel paziente, spesso in associazione ad agenti immunostimolanti <sup>(51)</sup>. I protocolli iniziali prevedevano il trasferimento adottivo di linfociti T citotossici diretti contro TAA, come per esempio linfociti T specifici per l'antigene del tumore di Wilms (WT1) o antigeni dell'*Epstein-Barr virus*. Questi protocolli sono stati applicati con successo nella terapia di varie malattie linfoproliferative come la LLA, il linfoma di Hodgkin, ed i disordini linfoproliferativi post-trapianto. Un recente sviluppo della immunoterapia basata sul trasferimento di linfociti T attivati è stato l'uso di cellule T ingegnerizzate per esprimere un recettore per l'antigene chimerico (CAR, *chimeric antigen receptor*), e perciò comunemente indicate come cellule CAR-T (*CAR T cells*). Le cellule CAR-T sono linfociti T policlonali autologhi ingegnerizzati perché esprimano una proteina transmembrana comprendente un dominio TAA specifico (per esempio CD19 nel caso delle neoplasie ematologiche a cellule B) di una Ig legata ad un dominio immunostimolatorio. Il sito di legame anticorpale è costituito dalla regione variabile di una singola catena di un anticorpo fusa al dominio intracellulare attivatorio [tipicamente la regione ζ (zeta) del recettore delle cellule T, TCR, *T-cell receptor*]. Il vantaggio delle cellule CAR-T consiste nella possibilità di riconoscere l'antigene bersaglio attraverso l'anticorpo ingegnerizzato, indipendentemente dalla presentazione dell'antigene MHC-dipendente. I protocolli più recenti prevedono l'ingegnerizzazione con una (per es. le regioni CD28 o 4-1BB) o due (per es. CD28 e 4-1BB o OX-40 in tandem) sequenze co-stimolatorie inserite nella coda citoplasmatica del recettore per l'antigene. Un'ulteriore evoluzione delle cellule CAR-T consiste nella trasfezione con geni codificanti citochine o molecole co-stimolatorie che accrescono l'espansione e la longevità delle cellule CAR-T. La terapia con cellule CAR-T è stata applicata con successo soprattutto nella LLA; risultati degni di nota sono stati ottenuti anche nella LLC e nei linfomi non-Hodgkin. È interessante l'osservazione che *in vivo* le cellule CAR-T possono espandersi da 1.000 a 10.000 volte, persistendo in circolo per settimane, ed in alcuni casi anche per anni.

Gli anticorpi bispecifici BiTE sono in grado di reclutare con grande efficienza le cellule T e portarle a stretto contatto con le cellule tumorali. L'impiego dei BiTE ha dimostrato una incoraggiante attività

terapeutica nella LLA e nei linfomi non-Hodgkin. Il razionale per lo sviluppo degli anticorpi bispecifici è quello di creare un efficace ponte molecolare tra la cellula tumorale e la cellula T effettrice che riproduca la sinapsi immunologica all'interno della quale possono essere rilasciati segnali citotossici che portano all'uccisione della cellula bersaglio. Il primo anticorpo bispecifico ad essere approvato dalla FDA è stato il blinatumomab, che lega il CD3 ed il CD19. I linfociti T citotossici attivati dal blinatumomab sintetizzano perforina e granzima che vengono rilasciate nella sinapsi immunologica, con conseguente lisi della cellula bersaglio. L'emivita in circolo del blinatumomab è molto breve, quindi i protocolli terapeutici prevedono l'infusione endovenosa continua.

Una nuova frontiera, ancora in via di sperimentazione, potrebbe essere rappresentata da nanoparticelle in grado di stimolare il sistema immunitario e superare le barriere immunosoppressive presenti nel microambiente tumorale. Le cosiddette nanoparticelle *immunoswitch* sono rivestite da due diversi anticorpi uno dei quali blocca PD-L1 mentre l'altro attiva i linfociti T mediante il *pathway* co-stimolatorio 4-1BB. La terapia con le nanoparticelle *immunoswitch* ha rallentato lo sviluppo tumorale in diversi modelli murini di melanoma e di tumore del colon, con maggiore efficacia rispetto agli anticorpi solubili, aprendo così la via ad un nuovo promettente filone di ricerca per la cura dei tumori <sup>(52)</sup>.

## Vaccini anti-tumorali e citochine immunostimolatorie

La vaccinazione può essere profilattica o terapeutica. La vaccinazione profilattica si è dimostrata di grande efficacia nella prevenzione dei tumori di origine virale, mentre al contrario lo sviluppo dei vaccini terapeutici ha incontrato maggiori difficoltà. La logica retrostante lo sviluppo dei vaccini terapeutici è fondata sull'osservazione che nei pazienti oncologici è comune il riscontro di linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> tumore-specifici <sup>(53)</sup>. Pertanto, la vaccinazione potrebbe aumentare la frequenza di questi cloni linfocitari ed aumentarne l'efficienza anti-tumorale. I primi approcci nel campo dei vaccini anti-tumorali sono stati rappresentati dalla somministrazione, per via intramuscolare, sottocutanea o intradermica, di peptidi TAA-derivati, comunemente di piccole dimensioni ed in assenza di concomitante somministrazione di adiuvanti, con risultati non sorprendentemente abbastanza deludenti <sup>(6)</sup>. Infatti, i piccoli peptidi antigenici sono in generale rapidamente eliminati, ed inoltre la stimolazione delle cellule dendritiche in assenza di adiuvanti può addirittura innescare una risposta tolerogena. In alcuni casi la somministrazione combinata di IL-2 ha migliorato la risposta anti-tumorale. Attualmente, si preferisce l'uso di peptidi antigenici di maggiori dimensioni (20-mer) in presenza di un idoneo adiuvante <sup>(54,55)</sup>. Lo scopo dei vaccini è quello di facilitare la presentazione degli antigeni ai linfociti T da parte delle cellule dendritiche durante la loro fase maturativa, così da attivare

una efficace risposta TAA specifica. L'attività terapeutica dei peptidi di maggiori dimensioni è più elevata, soprattutto se includono epitopi riconosciuti sia dai linfociti T helper che citotossici. A questo fine, sono utilizzati anche antigeni tumorali interi (*full length proteins*) che possono rendere disponibili per la presentazione da parte delle cellule dendritiche molteplici epitopi antigenici. Il tipo di adiuvante utilizzato ha inoltre un ruolo determinante nel permettere un'efficace stimolazione della risposta immunitaria. Un'altra strategia per la vaccinazione anti-tumorale prevede l'uso di cellule tumorali, sotto forma di lisati cellulari (complessati con *chaperones* immunostimolatori quali per esempio le *heat-shock proteins*, HSP), o di cellule intere. In generale, la frequenza di una risposta clinica obiettivabile è più alta nei pazienti che ricevono una vaccinazione con antigeni tumorali complessi rispetto ai pazienti vaccinati con specifici antigeni. La fonte migliore di antigeni sono le cellule tumorali autologhe, però sono state utilizzate anche linee cellulari allogeniche. In alternativa, sono stati messi a punto protocolli che prevedono la somministrazione di cellule dendritiche autologhe pulstate con gli antigeni tumorali<sup>(4)</sup>. Un serio inconveniente di molti di questi approcci è rappresentato dai costi elevati di una terapia altamente personalizzata.

Considerato il ruolo determinante delle diverse citochine nella regolazione delle funzioni del sistema immunitario, è stato ragionevole pensare di utilizzarle nel potenziamento delle risposte immuni contro i tumori. Benchè trascenda lo scopo della presente rassegna, citeremo brevemente alcuni impieghi delle principali citochine in terapia oncologica. Le citochine immunostimolatorie vengono impiegate principalmente come adiuvanti per altre immunoterapie anti-tumorali. La citochina più utilizzata in questa funzione è il fattore stimolante la formazione di colonie di granulociti e macrofagi (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF) che potenzia l'efficacia clinica di diversi immunoterapici<sup>(56)</sup>. Viceversa, due citochine in particolare vengono impiegate come agenti immunoterapici singoli. Queste sono l'interferon (IFN)- $\alpha$ 2b, che è stato approvato per la terapia della *hairy cell leukemia*, del linfoma follicolare, del mieloma multiplo e del melanoma, e la IL-2, che viene attualmente utilizzata in forme metastatiche di melanoma e di carcinoma renale<sup>(57)</sup>. Sebbene sia atteso che l'attività anti-tumorale di queste citochine dipenda in buona parte dalla sistema immunitario dell'ospite, il loro esatto meccanismo di azione rimane per lo più inesplorato ed incompreso.

## Effetti collaterali

È inevitabile che qualsiasi immunoterapia, per il fatto stesso di essere finalizzata a modificare l'immunoreattività dell'ospite, provochi fenomeni di immuno-tossicità<sup>(58)</sup>. Nel caso degli anticorpi che inibiscono i *check-points* è inevitabile che la loro somministrazione possa scatenare reazioni immunitarie auto-aggressive. È comune il riscontro di un accentuato infiltrato infiammatorio nei tessuti sani in se-

guito a terapia con ipilimumab. L'inibizione del CTLA-4 è responsabile della rottura della tolleranza immunologica nei confronti sia degli antigeni tumorali sia degli antigeni self espressi dai tessuti sani. La propensione a sviluppare fenomeni autoaggressivi in seguito al blocco di CTLA-4 è dimostrata anche da studi preclinici in animali da esperimento, dove sono state riscontrate reazioni avverse di diverso tipo: morte precoce in seguito a disordini linfoproliferativi, diabete, lesioni demielinizzanti, encefalomielite, colite, depigmentazioni. In confronto ai bloccanti CTLA-4, gli anticorpi anti-PD-1/PD-L1 hanno meno effetti collaterali, forse grazie al diverso sito anatomico d'azione (centrale per gli anti-CTLA-4, periferico per gli anti-PD-1/PD-L1). La principale, ed al momento unica, reazione collaterale acuta di rilievo riportata in seguito al trattamento con inibitori PD-1/PD-L1 è la polmonite. Altre reazioni riscontrate sono astenia, prurito, eritemi, ipotiroidismo, epatite, sarcoidosi, diabete mellito e miastenia gravis<sup>(43,45)</sup>.

I fenomeni di tossicità dovuti alla somministrazione di cellule CAR-T sono dovuti alla persistenza in circolo delle cellule ingegnerizzate ed in gran parte dovuti al rilascio sistemico di citochine nel contesto di una sindrome da rilascio di citochine (CRS, *cytokine release syndrome*), encefalopatia o aplasia B-cellulare<sup>(59,60)</sup>. La CRS è dovuta alla stimolazione della secrezione di citochine nel microambiente tumorale che poi innesca una cascata sistemica di amplificazione che porta al rilascio soprattutto di IL-6, IFN $\gamma$  e IL-10. La patogenesi dell'encefalopatia è meno chiara, ma probabilmente è in parte dovuta alla tempesta citochinica sistemica, ed in parte alla penetrazione di cellule CAR-T nel sistema nervoso centrale. L'aplasia B-cellulare, fenomeno tipico di tutte le terapie direzionate contro i linfociti B, è dovuta alla deplezione dei linfociti CD19<sup>+</sup>.

La somministrazione di anticorpi bispecifici (blinatumomab) ha causato effetti avversi a carico del sistema nervoso (tremore, afasia, atassia), ed aumento della suscettibilità a contrarre infezioni, associate a leucopenia<sup>(61)</sup>.

## Resistenza

A dispetto degli incoraggianti successi, anche nel corso della terapia con i *check-point inhibitors* si sviluppano fenomeni di resistenza, al momento non ben compresi. Si ritiene che in parte possano esser dovuti a modulazione nell'espressione di molecole MHC-I, mutazioni o delezioni nella  $\beta$ 2microglobulina, alterazioni nell'espressione di CD58 (molecola di segnale espressa dalle cellule T ed NK)<sup>(45)</sup>. Sono stati suggeriti anche altri meccanismi quali l'esaurimento funzionale dei linfociti T e l'accumulo di adenosina oIDO nel microambiente tumorale<sup>(62,63)</sup>.

Le ricadute in seguito a terapia con cellule CAR-T sono prevalentemente dovute ad esaurimento delle cellule T ingegnerizzate o alla comparsa di cloni tumorali negativi per l'antigene (nei trials clinici finora eseguiti il CD19)<sup>(64)</sup>.

## Conclusioni

L'immunoterapia dei tumori apre delle prospettive affascinanti per un approccio terapeutico per quanto possibile rispettoso della fisiologia dell'ospite. Sfruttare le difese intrinseche dell'organismo per combattere il tumore è stato il sogno che ogni oncologo ha coltivato per decenni, e che sembra possa divenire realtà. Tuttavia, molteplici variabili condizionano il successo dell'immunoterapia,

molte delle quali proprie di ogni singolo paziente, tra le quali non sono di minor importanza il microbioma, la dieta, le infezioni correnti o pregresse, il background genetico, l'età ed altri fattori ancora poco conosciuti<sup>(4)</sup>. Pur considerando tutti questi fattori limitanti, potrebbe non essere lontano il momento in cui, così come è possibile suscitare un'efficiente risposta immunitaria contro le infezioni, sarà anche possibile indurre una efficiente e duratura risposta immunitaria contro i tumori.

## Bibliografia

1. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, et al. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood*. 1994;84(8):2457-2466.
2. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90(6):2188-2195.
3. Klement GL. Eco-evolution of cancer resistance. *Sci Transl Med*. 2016;8(327):327fs5.
4. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
5. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321-330.
6. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-489.
7. Sylvester RJ. Bacillus Calmette-Guerin treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Urol*. 2011;18(2):113-120.
8. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2008;359(6):613-626.
9. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555-562.
10. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol*. 2016;37(12):855-865.
11. Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):262-275.
12. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:51-72.
13. Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(2):97-111.
14. Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:445-474.
15. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-264.
16. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004;10(9):942-949.
17. Senovilla L, Aranda F, Galluzzi L, Kroemer G. Impact of myeloid cells on the efficacy of anticancer chemotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014;30:24-31.
18. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219-242.
19. Gravelle P, Burroni B, Pericart S, Rossi C, Bezombes C, Tosolini M, et al. Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. *Oncotarget*. 2017.
20. Mondanelli G, Ugel S, Grohmann U, Bronte V. The immune regulation in cancer by the amino acid metabolizing enzymes ARG and IDO. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;35:30-39.
21. Allard B, Beavis PA, Darcy PK, Stagg J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;29:7-16.
22. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(1):3-8.
23. Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy--revisited. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(8):591-600.
24. Maus MV, Fraietta JA, Levine BL, Kalos M, Zhao Y, June CH. Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:189-225.
25. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):265-277.
26. Zitvogel L, Kroemer G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2012;1(8):1223-1225.
27. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):135-146.
28. Kaplan-Lefko PJ, Graves JD, Zoog SJ, Pan Y, Wall J, Branstetter DG, et al. Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biol Ther*. 2010;9(8):618-631.
29. Michielsens AJ, Ryan EJ, O'Sullivan JN. Dendritic cell inhibition correlates with survival of colorectal cancer patients on bevacizumab treatment. *Oncoimmunology*. 2012;1(8):1445-1447.
30. de La Motte RT, Galluzzi L, Olausson KA, Zermati Y, Tasdemir E, Robert T, et al. A novel epidermal growth factor receptor inhibitor promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells resistant to erlotinib. *Cancer Res*. 2007;67(13):6253-6262.
31. Forero-Torres A, Infante JR, Waterhouse D, Wong L, Vickers S, Arrowsmith E, et al. Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Cancer Med*. 2013;2(6):925-932.
32. Leal M, Sapra P, Hurvitz SA, Senter P, Wahl A, Schutten M, et al. Antibody-drug conjugates: an emerging modality for the treatment of cancer. *Ann NY Acad Sci*. 2014;1321:41-54.
33. Blanc V, Bousseau A, Caron A, Carrez C, Lutz RJ, Lambert JM. SAR3419: an anti-CD19-Maytansinoid Immunoconjugate for the treatment of B-cell malignancies. *Clin Cancer Res*. 2011;17(20):6448-6458.
34. Coiffier B, Thieblemont C, de Guibert S, Dupuis J, Ribrag V, Bouabdallah R, et al. A phase II, single-arm, multicentre study of coltuximab ravtansine (SAR3419) and rituximab in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2016;173(5):722-730.
35. Schindler J, Gajavelli S, Ravandi F, Shen Y, Parekh S, Braunschweig I, et al. A phase I study of a combination of anti-CD19 and anti-CD22 immunotoxins (Combotox) in adult patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2011;154(4):471-476.

36. Ai J, Advani A. Current status of antibody therapy in ALL. *Br J Haematol.* 2015;168(4):471-480.
37. Jones B. Haematological cancer: rituximab maintenance improves the outcome of elderly patients with FL. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(11):607.
38. Touzeau C, Moreau P, Dumontet C. Monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017;31(5):1039-1047.
39. Walter RB. Biting back: BiTE antibodies as a promising therapy for acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol.* 2014;7(3):317-319.
40. Hoffman LM, Gore L. Blinatumomab, a Bi-Specific Anti-CD19/CD3 BiTE(®) Antibody for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: Perspectives and Current Pediatric Applications. *Front Oncol.* 2014;4:63.
41. Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho PA, Lord CA, Jie HB, Davidson HC, et al. Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2013;19(7):1858-1872.
42. Terme M, Pernet S, Marcheteau E, Sandoval F, Benhamouda N, Colussi O, et al. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2013;73(2):539-549.
43. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ, Younes A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(1):25-40.
44. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-723.
45. Pianko MJ, Liu Y, Bagchi S, Lesokhin AM. Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investig.* 2017;4:32.
46. Assal A, Kaner J, Pendurti G, Zang X. Emerging targets in cancer immunotherapy: beyond CTLA-4 and PD-1. *Immunotherapy.* 2015;7(11):1169-1186.
47. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell.* 2014;26(6):923-937.
48. Kurtulus S, Sakuishi K, Ngiow SF, Joller N, Tan DJ, Teng MW, et al. TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2015;125(11):4053-4062.
49. Dougall WC, Kurtulus S, Smyth MJ, Anderson AC. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* 2017;276(1):112-120.
50. Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, Sun Z, Wang H, Sander C, et al. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma patients. *J Clin Invest.* 2015;125(5):2046-2058.
51. Galluzzi L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautès-Fridman C, et al. Trial Watch: Adoptive cell transfer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2012;1(3):306-315.
52. Kosmides AK, Sidhom JW, Fraser A, Bessell CA, Schneck JP. Dual Targeting Nanoparticle Stimulates the Immune System To Inhibit Tumor Growth. *ACS Nano.* 2017;11(6):5417-5429.
53. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:175-208.
54. Ricupito A, Grioni M, Calcinotto A, Bellone M. Boosting anticancer vaccines: Too much of a good thing? *Oncoimmunology.* 2013;2(7):e25032.
55. Hailemichael Y, Overwijk WW. Peptide-based anticancer vaccines: The making and unmaking of a T-cell graveyard. *Oncoimmunology.* 2013;2(7):e24743.
56. Hodi FS, Lee S, McDermott DF, Rao UN, Butterfield LH, Tarhini AA, et al. Ipilimumab plus sargramostim vs ipilimumab alone for treatment of metastatic melanoma: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2014;312(17):1744-1753.
57. Sim GC, Martin-Orozco N, Jin L, Yang Y, Wu S, Washington E, et al. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients. *J Clin Invest.* 2014;124(1):99-110.
58. Kobold S, Duewell P, Schnurr M, Subklewe M, Rothenfusser S, Endres S. Immunotherapy in Tumors. *Dtsch Arztebl Int.* 2015;112(48):809-815.
59. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med.* 2011;3(95):95ra73.
60. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet.* 2015;385(9967):517-528.
61. Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R. Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther.* 2012;136(3):334-342.
62. O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, Teng MW, Smyth MJ. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev.* 2017;52:71-81.
63. O'Donnell JS, Smyth MJ, Teng MW. Acquired resistance to anti-PD1 therapy: checkmate to checkpoint blockade? *Genome Med.* 2016;8(1):111.
64. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371(16):1507-1517.

## Parole Chiave

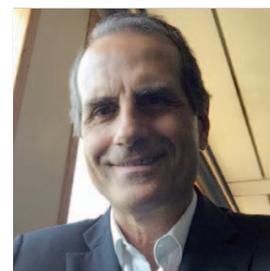
Leucemie; linfomi; anticorpi monoclonali; vaccini antitumorali; *checkpoint inhibitors*.

## Indirizzi per la corrispondenza

*Francesco Di Virgilio*  
Tel: 0532 455353  
Fax: 0532 455351  
E-mail: fdv@unife.it

*Anna Lisa Giuliani*  
E-mail: gla@unife.it

# Linfomi Maligni



Fortunato Morabito<sup>1</sup>, Massimo Gentile<sup>2</sup>, Lucio Morabito<sup>3</sup>, Ernesto Vigna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unità di Ricerca Biotecnologica (URB), Aprigliano, Cosenza; <sup>2</sup>Unità Operativa Complessa di Ematologia, AO di Cosenza;

<sup>3</sup>Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Milano

## Introduzione

L'identificazione di uno speciale antigene B-cellulare, il CD20, ed i progressi nella tecnologia degli anticorpi monoclonali, in particolare lo sviluppo di anticorpi chimerici, ha favorito il primo approccio immunologico alla terapia dei linfomi non Hodgkin (LNH) a cellule B. In particolare, il rituximab, un anticorpo anti-CD20 chimerico [topo (regioni variabili) - uomo (IgG1 kappa)], è stato il primo anticorpo monoclonale approvato specificatamente per uso clinico nel 1997 che ha rivoluzionato la terapia dei LNH a cellule B, rappresentando il primo e forse ancora oggi più fulgido esempio di immunoterapia nei linfomi maligni. I meccanismi che sottendono l'interazione rituximab-CD20 e la conseguente distruzione delle cellule bersaglio sono stati ben descritti nel corso degli anni. In particolare, il legame del rituximab al CD20 attiva la citotossicità complemento-dipendente attraverso il dominio Fc dell'anticorpo monoclonale, e quella anticorpo-dipendente basata sul contatto aggiuntivo dei recettori Fcγ, specialmente il FcγIIIa, espressi sulle cellule effettrici NK, macrofagi e neutrofili. Inoltre, il rituximab influenza direttamente diverse vie di segnale, condizionando così la sopravvivenza, la proliferazione e l'apoptosi delle cellule B neoplastiche ed, eventualmente, anche le risposte immunitarie delle cellule T<sup>(1-7)</sup>.

Infine, è stato suggerito che il rituximab possa aumentare la sensibilità alla terapia radiante<sup>(8)</sup> o alla chemioterapia interferendo con differenti vie di segnalazione cellulare.<sup>(9)</sup>

## Anticorpi monoclonali anti-CD20

Con il successo del rituximab, nei linfomi a cellule B, altri anticorpi monoclonali sono stati utilizzati con successo nei LNH a cellule B e due nuovi anticorpi anti-CD20 (ofatumumab ed obinutuzumab) sono stati approvati in diverse neoplasie a cellule B.

A differenza del rituximab, che ricordiamo essere un anticorpo anti-CD20 chimerico di tipo I che induce morte cellulare primariamente attraverso un meccanismo ADCC (Tabella 1) e CDC, l'ofatumumab è un anticorpo anti-CD20 completamente umanizzato di tipo I che lega un differente epitopo del CD20, ed a causa di ciò e differenzialmente dal rituximab presenta una più alta affinità di legame con relativa aumentata attività CDC.<sup>(10)</sup> L'obinutuzumab è un anticorpo anti-CD20 anch'esso totalmente umanizzato di tipo II, con diversi aspetti che lo distinguono dal rituximab e dall'ofatumumab. Da modelli xenografici, è stata dimostrata una aumentata capacità rispetto al rituximab di indurre morte cellulare diretta, così come una aumentata attività ADCC. I fattori che contribuiscono all'aumentata attività ADCC includono la glico-ingegnerizzazione del

Anticorpo	Struttura	ADCC	CDC	Citotossicità diretta
Rituximab	Anticorpo chimerico (topo/uomo)	Sì	Sì	Minima
Ofatumumab	Completamente umanizzato	Sì	Sì, aumentata	Sì
Obinutuzumab	Completamente umanizzato, Fc glico-ingegnerizzato	Sì, aumentata	Minima	Sì, aumentata

ADCC = citotossicità cellulare anticorpo dipendente; CDC = citotossicità complemento-dipendente

Tabella 1 - Caratteristiche degli anticorpi anti-CD20.

frammento Fc, che induce un aumentato legame al FcγRIIIA, così come una più lunga persistenza sulla superficie della cellula B neoplastica. Al contrario, l'obinutuzumab non induce significativa attività CDC (Tabella 1).<sup>(11)</sup>

La resistenza al rituximab è stata variabilmente definita in letteratura. Nella maggior parte dei casi essa è stata definita come mancata risposta o risposta della durata inferiore o uguale a 6 mesi, e tali parametri sono stati utilizzati come criteri di inclusione nei vari studi che prevedevano l'utilizzo di anticorpi anti-CD20 di seconda e terza generazione.<sup>(12, 13)</sup> L'ofatumumab è approvato solo per la leucemia linfatica cronica (LLC) con specifiche indicazioni per il trattamento di prima linea in combinazione con il chlorambucil nei pazienti ineligibili per terapie più intensive o per pazienti refrattari alla fludarabina o all'alemtuzumab, o pazienti che abbiano effettuato almeno due linee di terapia e che abbiano ottenuto almeno una risposta parziale (PR) o completa (CR) nei loro precedenti trattamenti. Anche l'obinutuzumab è stato approvato in combinazione col chlorambucil nella LLC non trattata, ma nel campo più specifico dei linfomi, l'obinutuzumab è stato approvato in combinazione con bendamustina per i pazienti affetti da linfoma follicolare (LF) refrattario al rituximab in base ai risultati dello studio GADOLIN. In tale studio il braccio di controllo era rappresentato da pazienti che ricevevano bendamustina in monoterapia. Inoltre i pazienti randomizzati a ricevere obinutuzumab lo ricevevano anche in mantenimento. Dopo circa 20 mesi di follow up per entrambi i bracci, la mediana di PFS non era stata raggiunta nel gruppo trattato con obinutuzumab e bendamustina contro i 14,9 mesi per i pazienti trattati in monoterapia (HR, 0,55;  $p < 0,001$ ).<sup>(13)</sup> Questa casistica con un più lungo follow up è stata presentata all'*American Society of Hematology 2016* dimostrando gli autori una differenza statisticamente significativa anche in termini di OS [HR = 0,67 (95% CI, 0,47-0,96;  $p = 0,0269$ )] a favore del gruppo di pazienti trattati con obinutuzumab.<sup>(14)</sup>

L'obinutuzumab è stato indagato anche come terapia di prima linea sia nei LF che nei linfomi diffusi a grandi cellule (DLBCL). Lo studio GALLIUM arruolava pazienti che richiedevano trattamento in accordo ai criteri del *Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires* (GELF) e sono stati randomizzati a chemio-immunoterapia con rituximab o obinutuzumab. La chemioterapia di induzione includeva bendamustina, CVP, e CHOP. Non sono state descritte differenze significative in termini di percentuali di risposte globali (ORR) o CR. È stata comunque dimostrata una significativa riduzione del rischio di morte o progressione per i pazienti che effettuavano chemio-obinutuzumab [HR = 0,66 (95% CI, 0,51-0,85;  $p = 0,001$ )]. Le subanalisi effettuate per le differenti chemioterapie hanno dimostrato che i pazienti trattati con obinutuzumab-CHOP o obinutuzumab-CVP presentavano chiaramente una migliore PFS rispetto ai casi trattati con la con-

troparte contenente rituximab<sup>(15)</sup>. Da notare, però, come le differenze in termini di PFS, così come di malattia minima residua (MMR) fossero particolarmente pronunciate tra obinutuzumab e rituximab quando le chemioterapie utilizzate fossero CHOP o CVP. Inoltre, mentre è risultata chiara la superiorità dell'obinutuzumab nel contesto delle terapie CHOP e CVP, la differenza di beneficio clinico versus il rituximab diventava modesta quando la chemioterapia era rappresentata dalla bendamustina. Sulla base di questi dati non è possibile incorporare l'obinutuzumab in prima linea in maniera assoluta considerando che la bendamustina viene utilizzata in prima linea tipicamente per i pazienti con FL di grado 1 o 2. In ogni caso, altri studi sono necessari per determinare definitivamente se l'obinutuzumab sia superiore al rituximab in quei pazienti che ricevono come *back-bone* chemioterapico il CHOP o il CVP.

Un altro importante studio è il trial denominato GOYA. Questo studio randomizzava pazienti con DLBCL in due bracci, quello standard con R-CHOP versus lo sperimentale obinutuzumab-CHOP. I due bracci erano bilanciati per parametri clinici e biologici. Interessante notare come non sia stata dimostrata nessuna differenza significativa per tutti gli end-points primari (PFS, ORR, CR, e OS).<sup>(16)</sup>

Possiamo concludere che l'obinutuzumab e l'ofatumumab sembrano essere superiori al rituximab in alcuni scenari clinici e più efficaci come singoli agenti. D'altra parte lo studio GOYA è un esempio di come non debba essere generalizzato il successo di un nuovo anticorpo monoclonale anti-CD20 per qualunque sottotipo istologico di LNH. Inoltre, i risultati dello studio GALLIUM sono in qualche modo più difficili da interpretare.

Mentre è chiara la differenza di beneficio clinico nei pazienti trattati con regimi chemioterapici contenenti l'obinutuzumab, la scelta del *back-bone* chemioterapico può influenzare la magnitudo di tale effetto benefico, con piccole differenze quando ad essere utilizzato come regime chemioterapico è la bendamustina. Ciò potrebbe essere, nella pratica clinica, un punto da non sottovalutare considerando che la bendamustina è la chemioterapia di scelta per il trattamento iniziale dei pazienti con LF a basso grado.<sup>(17)</sup> Bisognerà comunque attendere la pubblicazione dello studio per trarre delle conclusioni definitive, anche alla luce delle differenze esistenti sia in termini di costo che di tossicità. A questo proposito, l'obinutuzumab, rispetto al rituximab, può causare più reazioni infusionali di grado  $\geq 3$  così come una maggiore mielosoppressione.<sup>(16)</sup>

## Brentuximab vedotin (BV)

L'utilizzo di coniugati farmaco-anticorpo ad alta capacità di legame su precisi target (ADC) sta rappresentando un'importante acquisizione per rivisitare gli algoritmi terapeutici di alcune neoplasie ematologiche ed in particolare per il linfoma di Hodgkin (LH) e i LNH anaplastici a grandi cellule (ALCL). In particolare, gli ADC sono

stati costruiti per realizzare un *killig* neoplastico altamente selettivo, e nello stesso tempo per determinare minimi effetti collaterali sui tessuti normali. <sup>(18)</sup> Tra gli ADC ricordiamo il BV.

Il BV è un anticorpo monoclonale che lega il recettore di superficie CD30 a sua volta coniugato con la tossina monomethyl auristatin E (MMAE), un potente agente antimitotico che inibisce la divisione cellulare bloccando la polimerizzazione della tubulina. <sup>(19)</sup> Il CD30 è un recettore transmembrana di tipo I appartenente alla superfamiglia del *tumor necrosis factor* ed è universalmente espresso sulle cellule neoplastiche del LH e su quelle del ALCL. Il CD30 diventa un target ideale per una terapia ADC-based, non solo per i suoi alti livelli di espressione sulle specifiche cellule neoplastiche (come le cellule di Stemberg del LH e quelle del ALCL) ma anche perchè tale recettore è consistentemente espresso sulle cellule linfomatose di LH e di ALCL indipendentemente dallo stadio di malattia e dalle linee di trattamento effettuate, compreso il trapianto di midollo. Interessante il dato che il CD30 sia anche espresso su altri LNH quali il DLBCL, il linfoma a cellule T (TCL), il linfoma primitivo del mediastino (PMBL), etc. <sup>(20-22)</sup> Inoltre, il CD30 è espresso su una piccola popolazione di linfociti B e T attivati, e, a più bassi livelli, sui monociti e sugli eosinofili attivati <sup>(23)</sup>.

Il BV possiede un'attività potente ed altamente selettiva nei confronti delle cellule di LH ed ALCL CD30-positive in vitro alla concentrazione di 3-50 pmol/l; le cellule CD30-negative presentano una sensibilità di circa 1.000 volte inferiore al BV rispetto a quelle positive. <sup>(24-26)</sup> In questo sistema di coltura, la massima concentrazione di BV legata al recettore CD30 si ottiene in 24-48 ore di incubazione, con concentrazioni che decrescono dalla 120<sup>a</sup> ora di incubazione, indicando quindi una fase di internalizzazione del complesso ACD <sup>(27)</sup>. Oltre ad un'azione anti-neoplastica diretta legata all'apoptosi indotta nelle cellule CD30-positive, il BV può indurre la morte cellulare anche attraverso meccanismi indiretti <sup>(28, 29)</sup>.

Poichè il MMAE attraversa la membrana cellulare ed è rilasciato nella matrice extracellulare circostante, il BV potenzialmente è in grado anche di esercitare una attività citotossica nei confronti delle cellule neoplastiche adiacenti che non hanno legato l'anticorpo <sup>(28-30)</sup>.

## Linfoma di Hodgkin

Circa il 5% ed il 30-40% dei pazienti con LH recidivano rispettivamente negli stadi precoci ed avanzati di malattia, dopo la prima linea di trattamento <sup>(30, 31)</sup>. Il trattamento standard per i pazienti recidivati o refrattari è una chemioterapia di salvataggio seguita, per i pazienti eleggibili al trapianto, dalle alti dosi di chemioterapia con *rescue* di cellule staminali autologhe (HDC/ASCT) <sup>(30, 31)</sup>. È da sottolineare però come solo il 50% dei pazienti eleggibili a questa modalità di trattamento benefici di questo approccio terapeutico <sup>(32)</sup>. Purtroppo i pazienti che recidivano dopo autotrapianto di cellule staminali (ASCT) presentano una pessima prognosi <sup>(30, 31)</sup>.

## Malattia recidivata/refrattaria

Uno studio di fase I su 45 pazienti affetti da linfoma recidivato/refrattario CD30-positivo ha dimostrato come il BV permettesse di ottenere una risposta di malattia nella maggior parte dei pazienti. Nel 2012, Younes et al. <sup>(33)</sup> pubblicavano i risultati di uno studio pilota di fase II che ha portato all'approvazione del farmaco, su 102 pazienti (range di età 15-77) con LH recidivato/refrattario anche all'ASCT. Gli autori riportavano che i pazienti trattati con BV al dosaggio di 1,8 mg/kg ogni 3 settimane per un massimo di 16 cicli ottenevano un ORR del 75% (95% CI: 65-83%; 34% CR). La mediana di PFS è stata di 5,6 mesi (95% CI: 5-9 mesi) e la durata mediana della risposta, per i pazienti che avevano ottenuto una CR, di 20,5 mesi <sup>(34)</sup>. A tre anni di follow up la percentuale di OS risultava del 73% (95% CI: 57-88%) mentre quella di PFS del 58% (95% CI: 41-76%) <sup>(35)</sup>. Infine, un ulteriore aggiornamento a 5 anni dimostrava un beneficio duraturo per questi pazienti con una percentuale di OS del 41% (95% CI: 31-51%) e di PFS del 22% (95% CI: 13- 31%) (Tabella 2) <sup>(36)</sup>. In particolare, per quei pazienti che raggiungevano la CR, la percentuale di OS a 5 anni era del 64% (95% CI 48-80%) mentre quella di PFS era del 52% (95% CI 34-69%). BV era generalmente ben tollerato; gli effetti collaterali più comuni erano costituiti dall'astenia (67%), l'iperglicemia (64%), il rash (58%), e la neuropatia sensoriale (49%).

## Seconda linea

In uno studio di fase II su 46 pazienti con LH recidivato/refrattario dopo un precedente regime di trattamento contenente doxorubicina, BV induceva una PET-negatività in 12/45 pazienti valutabili (27%, 95% CI: 13-40%). I pazienti con PET positiva ricevevano un ulteriore trattamento con ICE <sup>(37)</sup>. Globalmente, 23 pazienti sono diventati PET-negativi con un vantaggio di 2 anni in termini di *event-free survival* rispetto ai casi PET-positivi. In 37 pazienti con LH recidivato/refrattario Chen et al <sup>(38)</sup> hanno utilizzato il BV come terapia di seconda linea prima dell'ASCT ottenendo un ORR del 68% (13 CR, 12 PR), con un interessante 86% dei pazienti che hanno potuto effettuare l'ASCT di salvataggio.

## Consolidamento

Nel 2015 sono stati riportati i risultati di uno studio di fase III denominato AETHERA che valutava l'attività del BV, iniziato a 1-2 mesi dall'ASCT come terapia di consolidamento per pazienti ad alto rischio di recidiva post-ASCT (primariamente refrattari alla prima linea o recidivati entro 12 mesi dal trattamento di prima linea, o con malattia extranodale al momento della terapia di salvataggio pre-ASCT). <sup>(39)</sup> In questo trial, 329 pazienti venivano randomizzati a ricevere trattamento o placebo per più di 16 cicli. I pazienti randomizzati nel braccio BV miglioravano del 12% la PFS a 2 anni rispetto a quelli che avevano ricevuto il placebo (63% vs. 51%,  $p = 0.001$ ). Da notare, però, che il 32% dei pazienti non ha potuto completare il trattamento a causa degli eventi avversi. Essendo con-

Farmaco/combinazione	Linea di trattamento	Fase	N°	Outcome	Ref
Pivotal BV 16 cicli	Rec/Refr	II	102	ORR 75%, PFS 5.6 m	34
Aggiornamento a 3 anni	Rec/Refr	II	102	OS 73%, PFS 58%	35
Aggiornamento a 5 anni	Rec/Refr	II	102	OS 41%	36
AETHERA	Rec/Refr Consolidamento post-ASCT ad alto rischio	III	329	PFS 43 mesi vs 24 mesi	39
Aggiornamento a 3 anni	Rec/Refr Consolidamento post-ASCT ad alto rischio	III	329	PFS 61% vs 43%	40
PET-adapted BV	Seconda linea	II	46	27% PET-negativi	37
BV pre-ASCT	Seconda linea	II	37	ORR 68% → 86% ASCT	38
BV monoterapia	Prima linea	II	26	ORR 92% (CR 73%) durata della risposta mediana 9.1 mesi Neuropatia periferica sensoriale 78%	41
BV+ABVD/BV+AVD	Prima linea	I	51	Seri eventi avversi 56% ABVDA 27% AVD	43
BV-BEACOPP (like)	Prima linea	II	104	BV-ECADD CR 88% BV-ECAPP CR 86% Scelto ECADD per migliore profilo di tossicità	45
ABVD → BV (sostituzione RT)	Prima linea stadi precoci	II	40	PFS 91% ad 1 anno	44
BV-AVD (→ PET-neg IFRT)	Prima linea, stadi precoci, sfavorevoli	Pilot	30	2 pts PET-pos PFS ad 1 anno 93%	46

Tabella 2 - Studi concernenti il trattamento con brentuximab vedotin in pazienti affetti da LH.

sentito il crossover, la OS è risultata simile nei due gruppi. Un successivo aggiornamento dei risultati dimostrava una PFS a 3 anni del 61% (95% CI: 53-68%) per il braccio BV versus il 43% (95% CI: 36-51%) per il braccio placebo (HR = 0,52) <sup>(40)</sup>. A seguito di questi risultati la FDA estendeva l'approvazione del BV anche come consolidamento post-ASCT per i pazienti a rischio di progressione.

#### Prima linea

BV è stato anche testato come monoterapia in prima linea in un trial di fase II in 26 pazienti anziani (≥60 anni) che presentavano significativa comorbidità (52%) <sup>(41)</sup>. L'ORR fu del 92% (73% CR), con una durata della risposta molto breve (mediana 9 mesi, range 2,8-20,9), facendo chiaramente intravedere la necessità di combinare il BV con altri farmaci. I primi tentativi sono stati effettuati su 22 pazienti anziani a cui è stata somministrata la combinazione BV- dacarbazina ed in ulteriori 11 pazienti in cui BV è stato com-

binato con la bendamustina. In entrambi i gruppi l'ORR fu del 100%. La bendamustina veniva ridotta da 90 a 70 mg/m<sup>2</sup> per tossicità. Nel gruppo trattato con dacarbazina, 18/21 pazienti rimanevano vivi e liberi da progressione; in 6 pazienti (36%) venivano documentati eventi avversi di grado ≥3. <sup>(42)</sup> Il BV è stato anche valutato in uno studio di fase I come terapia di prima linea in associazione AVD o ABVD in 51 pazienti con LH (età mediana 35 anni, range 19-59) <sup>(43)</sup>. La dose massima tollerata per il BV è stata non superiore a 1,2 mg/kg per entrambe le combinazioni. Il 95% dei 22 pazienti trattati con BV associato ad ABVD raggiungeva la CR, rispetto al 96% del gruppo trattato in associazione all'AVD. Comunque, un numero significativo di pazienti (compresi due decessi) hanno presentato una tossicità polmonare nel gruppo BV-ABVD [11 (44%) di 25], superiore alla storica incidenza dell'ABVD da solo, contro nessuno nel gruppo BV-AVD. Ancora,

uno studio pilota multicentrico in pazienti di nuova diagnosi affetti da LH in stadio precoce di malattia ma ad alto rischio ha testato l'efficacia e la tossicità della combinazione BV-AVD (4 cicli) seguito da radioterapia (30 Gy *involved field*) per i pazienti che raggiungevano la PET-negatività. Eventi avversi di grado  $\geq 3$  sono stati documentati in soli 4 pazienti. La PFS ad 1 anno è stata del 93,3% (95% CI, 84-102).<sup>(44)</sup> Inoltre, il BV è stato testato in combinazione con protocolli simil-BEACOPP in uno studio di fase II comprendente 104 pazienti.<sup>(45)</sup> Sia la schedula BV-ECADD (etoposide, ciclofosfamida, doxorubicina, dacarbazina e desametasone) che quella BV-ECAPP (etoposide, ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazine e prednisone) si sono dimostrate molto efficaci; con una percentuale di CR rispettivamente dell'88% (95% CI: 77-96%) e dell'86% (95% CI: 73-94%). Il gruppo tedesco per lo studio dei linfomi di Hodgkin (*German Hodgkin Study Group*), considerando il migliore profilo di tossicità, ha deciso di scegliere la schedula BV-ECADD per uno studio di fase III<sup>(45)</sup>. Di particolare interesse uno studio di fase II in cui 41 pazienti con LH e malattia limitata venivano trattati con ABVD, sostituendo la radioterapia di consolidamento con il BV.

Si è osservato un decesso per sepsi ed insufficienza epatica grave secondario al trattamento con BV. La PFS e l'OS ad un anno sono stati rispettivamente del 91% e 96%.<sup>(46)</sup> Infine, i risultati di studi di prima linea di fase III in corso nel giovane, che prevedono l'impiego di BV in associazione con ABV versus lo standard ADVD (ECHLON-1) o BV-ECADD versus BEACOPP, e di fase II nell'anziano (B-CAP), daranno ulteriori importanti indicazioni sulla futura strategia di trattamento nei LH.

### Tossicità

Il BV è generalmente ben tollerato eccetto che per un'alta frequenza di neuropatia periferica (circa il 42%)<sup>(34)</sup>. Altri effetti collaterali sono la neutropenia, l'astenia, la febbre, la diarrea, la nausea, l'altralgia, l'alopecia e la neuropatia motoria periferica. Come è stato sottolineato in precedenza, è assolutamente da evitare la combinazione di BV con la bleomicina per il rischio di una severa tossicità polmonare.<sup>(43)</sup> Un rarissimo ma grave effetto collaterale che è stato riportato è rappresentato dalla leucoencefalopatia multifocale, un'infezione virus-indotta del sistema nervoso centrale<sup>(47)</sup>, verosimilmente legata alla deplezione delle cellule T-attivate esprimenti il CD30. Infine, sono state anche osservate pancreatiti, come effetto collaterale questa volta legato alla tossicità del MMAE sulle cellule pancreatiche CD30-positivo<sup>(40)</sup>.

### Linfomi non Hodgkin

Due studi di fase II per un totale di 61 pazienti sono stati condotti nel DLBCL recidivato/refrattario. In un primo studio su 49 pazienti (età mediana 62 anni) con livelli variabili di espressione del CD30, Jacobsen ha riportato una ORR del 43% con una durata mediana della risposta di meno di sei mesi, ed una durata massima di 66,4

settimane nel 17% dei casi che avevano ottenuto una CR<sup>(49)</sup>.

In ulteriori 16 pazienti è stata testata l'associazione BV/rituximab che ha dimostrato un favorevole profilo di tossicità<sup>(49)</sup>. Lo studio di Yasenchak et al.<sup>(50)</sup> di fase II che prevedeva l'utilizzo di BV associato ad R-CHOP per pazienti in prima linea con espressione di CD30 intermedia/alta e con DLBCL ad alto rischio ha dimostrato come solo 12 pazienti sui 33 arruolati completavano la terapia. La ORR è stata del 92% (valutata su 11 pazienti di cui 7 ottenevano una CR).<sup>(50)</sup> In uno studio di fase I che valutava l'efficacia di BV nei linfomi a cellule T di cui 32 erano ALCL CD30-positivi (6 ALK-positivi), è stata riportata una ORR del 94% (n = 30) (durata mediana della risposta di 52,8 settimane). Inoltre 24 pazienti (75%) raggiungevano la CR (con durata mediana di 105,2 settimane)<sup>(51)</sup>. In un successivo trial di fase II è stata valutata l'attività di BV in 58 pazienti con ALCL recidivati/refrattari tutti CD30-positivi e 42 ALK-positivi. L'ORR è stata dell'86% con una durata mediana della risposta di 50,4 settimane. Trentatré pazienti ottenevano la CR con una durata mediana della risposta di 52,8 settimane<sup>(52)</sup>.

## Gli inibitori dei checkpoints

### Linfoma di Hodgkin

L'immunosorveglianza e l'attività immunologica anti-tumorale possono giocare un ruolo significativo nel controllo delle neoplasie ematologiche. Un meccanismo chiave con cui le cellule neoplastiche limitano la risposta immune passa attraverso la iper-espressione dei ligandi del *programmed cell death 1* (PD-1), PD-L1 e PD-L2, sulle cellule neoplastiche ed il loro legame con il PD-1 espresso sulle cellule T CD8<sup>+</sup> tumore specifiche. In una serie di 108 biopsie di pazienti con LH classico, 105 (97%) presentavano un'aumentata espressione dei ligandi del PD-1 valutati con tecniche di immunohistochimica.<sup>(53)</sup> In un'altra serie di 246 pazienti, l'espressione di PD-L1 è stata dimostrata in  $\geq 5\%$  delle cellule neoplastiche nel 71% dei casi con LH classico (166/233)<sup>(54)</sup>. L'aumentata espressione di PD-L1 e PDL-2 sulle cellule neoplastiche, oltre che mediata dal  $\gamma$ -interferone prodotto dalle cellule T infiltranti il tumore, può anche riconoscere basi genetiche, come succede nel LH in cui sono state dimostrate le amplificazioni strutturali del cromosoma 9p24.1 dove risiedono i geni CD274 (PD-L1) e PDCD1LG2 (PD-L2) che sembrano aumentare l'espressione dei PD-L1 e PD-L2.<sup>(55)</sup> Inoltre, una maggiore amplificazione della regione 9p24.1 potrebbe anche indurre una iper-espressione della proteina di Janus kinase 2 (JAK2) la cui attività ulteriormente indurrebbe espressione di PD-Ls attraverso la via di segnalazione JAK2/STAT.<sup>(55)</sup> In pazienti con HL classico e normale numero di copie della regione 9p24.1, il PD-L1 potrebbe ancora essere over-espresso a causa dell'infezione del virus di Epstein-Barr, che è stata dimostrata essere una via alternativa e mutualmente esclusiva del meccanismo di induzione dell'espres-

sione di PD-L1<sup>(56)</sup> Infine, l'espressione del PD-L1 nelle cellule neoplastiche può anche essere regolata da meccanismi epigenetici. Questi dati suggeriscono un'evidente dipendenza nei processi di sopravvivenza da parte delle cellule neoplastiche del LH classico dalle vie di segnale PD-1/PD-Ls. In sintesi, l'induzione di un fenotipo T-cellulare esausto da parte delle cellule di Sternberg o di Hodgkin gioca un ruolo nei processi di immuno-evasione nel LH classico, e tale evidenza supporta il razionale per l'utilizzo di farmaci che bloccano il *signalling* di uno dei più importanti *checkpoint* immunologici.<sup>(57)</sup> Il nivolumab, un anticorpo monoclonale IgG completamente umanizzato diretto contro il PD-1, è stato recentemente introdotto in terapia per i LH recidivati/refrattari (Tabella 3).<sup>(58)</sup> Il farmaco è stato somministrato a 23 pazienti alla dose di 3 mg/kg ogni due settimane per un massimo di due anni. Venti pazienti hanno ottenuto una risposta obiettiva e in 10 di questi la risposta è stata duratura (7 casi >1,5 anni).<sup>(59)</sup> Più recentemente, pazienti con LH in progressione o recidivati che fossero già stati esposti a BV ed avessero fallito l'ASCT sono entrati in un trial di fase II con nivolumab. La ORR è stata del 66% (95% CI: 55-76%), con un 9% di CR. La PFS a 6 mesi è stata del 77%<sup>(60)</sup>. Per tali risultati, il nivolumab è stato approvato dall'FDA per il trattamento dei LH recidivati o progrediti dopo BV e ASCT. Simili rilevanti risultati sono stati descritti in 16 pazienti giapponesi precedentemente trattati con BV, confermando l'elevata ORR (75%)<sup>(61)</sup>. Tra gli otto trials con il nivolumab correntemente registrati su ClinicalTrials.gov, quattro includono i LH, a futura garanzia di curabilità anche per una consistente percentuale di pazienti recidivati o in progressione. Gli effetti collaterali non sono stati importanti ed includevano la linfopenia, la piastrinopenia, l'iperlipidemia; gli effetti collaterali meno comuni sono state le pancreatiti, le polmoniti, le stomatiti e le coliti immuno-mediate.<sup>(62)</sup> In uno studio di

fase I, che includeva anche pazienti con LH, 12 pazienti (15%) avevano sospeso il trattamento per eventi avversi mentre una polmonite fatale è stata descritta in un paziente che aveva ricevuto nove linee di trattamento.<sup>(63)</sup> Pazienti recidivati dopo trapianto allogenico in precedenza erano stati esclusi per problemi associati alla *graft versus host disease* (GvHD). Successivamente sono stati trattati con nivolumab 8 LH recidivati dopo trapianto allogenico (tempo mediano dal trapianto 11 mesi, range 3-122 mesi). Segni di GvHD acuta sono stati documentati in 2 pazienti, mentre 7/8 hanno ottenuto un beneficio clinico. Considerando la casistica limitata non si possono trarre conclusioni per questa tipologia di pazienti.<sup>(64)</sup>

Il pembrolizumab, un altro anticorpo monoclonale IgG4 completamente umanizzato anti-PD-1, è stato somministrato in uno studio di fase Ib (KEYNOTE-013) a 31 pazienti alla dose di 10mg/kg ogni 2 settimane. L'ORR è stata del 65% (range 48-79%) con un 16% di CR, il 70% delle quali sostenute per più di 24 settimane<sup>(65)</sup>. In un trial di fase II il pembrolizumab è stato somministrato a 3 diverse coorti di pazienti:

- 1) pazienti recidivati o refrattari dopo ASCT e BV;
- 2) pazienti non eleggibili ad ASCT per chemioresistenza (nessuna risposta alla chemioterapia di salvataggio) e che non avevano risposto a BV;
- 3) pazienti recidivati o refrattari all'ASCT e non trattati con BV.

I risultati ad *interim* in 30 pazienti appartenenti alla prima coorte dimostrava un'ORR del 70% (95% CI: 51-85%), mentre tra i 30 pazienti della coorte 2, l'ORR era dell'80% (95% CI: 61-92%); non sono stati ancora presentati risultati sulla terza coorte.<sup>(66)</sup>

Quattro trials per pazienti con LH sono ancora in corso o hanno appena terminato l'arruolamento, sottolineando quanto questo trattamento sia percepito come estremamente efficace, parimenti a quello con nivolumab. Da notare come il pembrolizumab è stato te-

Farmaco/combinazione	Linea di trattamento	Fase	N°	Outcome	Ref
Nivolumab	Rec/Refr	I	23	ORR 87%, PFS 56 settimane	58, 59
Nivolumab	Rec/Refr	II	80	ORR 66.3%, PFS 77% a 6 mesi	60
Nivolumab	Rec/Refr	II	8	ORR 87.5%, PFS non riportata	64
Pembrolizumab	Rec post alloSCT	Ib	31	ORR 65%, PFS non riportata	65
Pembrolizumab	1) Rec/Refr dopo ASCT e BV	II	30	ORR 70%, PFS non riportata	66
	2) Refr al BV		30	ORR 80%, PFS non riportata	
	3) Rec/Refr all'ASCT non trattati con BV		Non riportata	ORR non riporta PFS non riportata	

Tabella 3 - Studi di fase I e II concernenti il trattamento con inibitori dei checkpoints in pazienti affetti da LH.

stato in due pazienti dopo trapianto allogenico ed è risultato essere ben tollerato senza riattivazione della GvHD <sup>(67)</sup>.

## Linfomi non Hodgkin

Differentemente dal LH, solo il 25% dei DLBCL esprimono PD-1/PD-L1. <sup>(68)</sup> Esiste però un'eccezione rappresentata non a caso dal PMBL che, similmente al LH, frequentemente presenta l'amplificazione del cromosoma 9p22 con conseguente iperespressione di PD-L1 e PD-L2. <sup>(69)</sup> Non è sorprendente quindi che le risposte agli inibitori di *checkpoints* nei LNH siano generalmente più basse rispetto a quelle ottenute nei LH (Tabella 4). Infatti, uno studio di fase I in pazienti con vari sottotipi di LNH (n=54) trattati con nivolumab ha dimostrato la più alta percentuale di ORR nei casi con LNH follicolare (40%) seguita dal DLBCL (36%). <sup>(70)</sup> I pazienti con LNH a cellule T (n = 23) erano anche inclusi, ma con risposte oscillanti tra il 15% per le micosi fungoide al 40% per i LNH a cellule T periferiche. Studi simili sono in corso con il pembrolizumab. Sebbene un precedente studio avesse dimostrato l'assenza di espressione di PD-L1 sulle cellule linfomatose nel LF <sup>(68)</sup>, gli istiociti del tessuto del microambiente neoplastico esprimono PD-L1, supportando il razionale per i discreti risultati clinici ottenuti in questo sottotipo istologico ed il razionale per un suo futuro impiego. <sup>(71)</sup>

Infatti, i dati clinici provenienti da un altro studio di fase II, che prevedeva l'utilizzo di pidilizumab, in combinazione con rituximab in 32 pazienti con LF sensibile al rituximab, dimostrava importanti risposte cliniche. <sup>(72)</sup> Dei 29 pazienti valutabili per la risposta, 19 (66%) ottenevano una risposta obiettiva, 15 (52%) una CR e 4 (14%) una PR. Dopo una mediana di osservazione di 15,4 mesi, la PFS mediana fu di 18,8 mesi per tutti i pazienti ed ancora non raggiunta per la coorte dei pazienti responsivi; la durata della risposta era di 20,2 mesi. Il pidilizumab è stato somministrato endovena alla dose di 3 mg/kg ogni 4 settimane per 4 cicli, con ulteriori 8 infusioni per i pazienti che avessero raggiunto almeno una stabilità di malattia. Il rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>) è stato invece somministrato settimanalmente ogni 4 settimane a partire dal 17° giorno dopo la prima infusione di pidilizumab.

Il fatto che i casi con PMBL frequentemente presentino l'amplificazione del cromosoma 9p22 è indicativo per un potenziale tratta-

mento con anti-PD-1. <sup>(69)</sup> Al momento però i dati sono molto limitati, considerato anche la relativa rarità della patologia rispetto ai LH classici. In uno studio di fase I che prevedeva il trattamento con nivolumab in pazienti con varie patologie linfomatose recidivate/refrattarie, i due pazienti inclusi nello studio con PMBL hanno ottenuto una malattia stabile ma nessuno è progredito a 24 settimane del trattamento. <sup>(69)</sup> Uno studio con pembrolizumab che include pazienti con stadi avanzati di PMBL o sindrome di Richter (KEYNOTE-170) sta reclutando pazienti.

In tutti questi trials, il profilo di tossicità dell'anti-PD-1 è stato moderato, si sono osservate maggiormente problematiche cliniche immuno-mediate quali la colite, la polmonite, l'ipertiroidismo.

Sebbene un certo numero di pazienti con LH classico e, in maggior misura, di pazienti con LNH non beneficiano del trattamento con inibitori dei *checkpoints*, i meccanismi di resistenza a questa terapia rimangono ancora non completamente chiariti. Esistono dati emergenti che suggeriscono alterazioni negli antigeni di istocompatibilità maggiore (MHC) di classe I nel microambiente neoplastico che potrebbero limitare la risposta a tali terapie. Da notare che un recente studio ha dimostrato come il 75% (40/53) dei pazienti con DLBCL comunemente non esprime antigeni HLA di classe I <sup>(73)</sup>, presenta mutazioni o delezioni della beta-2 microglobulina ( $\beta$ 2M), ed anomalie del CD58, una molecola che è coinvolta nel segnale delle cellule T ed NK, che porta a perdita di espressione di membrana degli antigeni HLA di classe I <sup>(73)</sup>. Le cellule T effettrici richiedono un MHC intatto per legare il TCR e conseguentemente attivare i processi di citotossicità anti-tumorale. È logico considerare che le mutazioni che inducono riduzione di espressione di antigeni MHC di classe I sulla superficie della cellule neoplastica riducano l'efficacia del blocco dei *checkpoints* immunologici. La  $\beta$ 2M è una componente richiesta per l'assemblaggio e l'espressione di MHC di classe I, ed uno studio retrospettivo ha dimostrato come la ridotta espressione di  $\beta$ 2M e di MHC di classe I nei pazienti con LH classico fosse associata con un peggiore comportamento clinico indipendentemente dallo stato di amplificazione del cromosoma 9p24.1. <sup>(74)</sup>

Al momento, però, non è stato ancora riportato se esista un'associazione negativa tra la risposta al blocco dei *checkpoints* e le mutazioni della  $\beta$ 2M e MHC di classe I, nel LH classico. Comunque, dati pro-

Farmaco/combinazione	Linea di trattamento	Fase	N°	Outcome	Ref
Nivolumab	Rec/Refr	Ib	31 LNH-B 23 LNH-T 27 MM	ORR 26%, ORR 17%, ORR 4%, PFS non riportata	70
Pidilizumab-rituximab	Rec (sensibile al rituximab)	II	29 LNH follicolare	ORR 66%, PFS 18.8 mesi	72

Tabella 4 - Studi di fase I e II concernenti il trattamento con inibitori dei *checkpoints* in pazienti affetti da LNH.

venienti da pazienti con melanoma trattati con inibitori della via del segnale del PD-1 dimostrano come alterazioni della  $\beta 2M$  e la perdita degli antigeni MHC di classe I portano a progressione di malattia e resistenza a tale immunoterapia<sup>(75)</sup>, suggerendo anche che l'efficacia del blocco di PD-1 nel LH classico è indipendente dalla presentazione dell'antigene da parte delle cellule neoplastiche. Altri meccanismi di resistenza quali fattori inibitori presenti nel microambiente neoplastico, quali ADO ed IDO, e nuove mutazioni, rimangono aree di investigazione.<sup>(76,77)</sup>

È evidente che il futuro della sperimentazione clinica nei LNH sia legato all'utilizzo di combinazioni biologicamente note, quali gli inibitori dei *checkpoints* e gli agenti immunomodulanti piuttosto che le molecole che interferiscono con vie oncogeniche di segnale, quali quella del *B-cell receptor*. Nello specifico, è da ricordare che l'ibrutinib è in grado di indurre iper-espressione di PD-1 e soppressione delle chinasi T-cellulari IL2-inducibili, che alla fine porterebbe ad una più efficace attivazione delle cellule Th1 e quindi ad una più efficiente risposta immune.<sup>(78)</sup>

## Anticorpi bi-specifici

Un anticorpo monoclonale bispecifico è una proteina artificiale che è composta da frammenti di due diversi anticorpi monoclonali che le permettono di legarsi contemporaneamente a due diversi tipi di antigene. Nel caso degli anticorpi BITE (*Bispecific cell T Engager*), il blinatumomab ha due possibilità di legame, una con le cellule T CD3<sup>+</sup> e l'altra sulle cellule neoplastiche CD19<sup>+</sup>.<sup>(79)</sup> Considerata la sua elevata capacità di attivare le cellule T, vengono utilizzati bassi dosaggi del farmaco, che però, a causa della sua breve emivita (2-3 ore), necessita dell'infusione continua endovenosa per lunghi periodi (4-8 settimane per ciclo).<sup>(80)</sup> Mentre il blinatumomab è entrato prepotentemente nella pratica clinica ematologica per i pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta<sup>(81)</sup>, ad oggi, pochi studi hanno valutato questo interessante anticorpo nei pazienti con LNH. I primi studi riportano i risultati di 21 pazienti con LNH recidivati-refrattari<sup>(82)</sup>. Dosi tra 0,75 o 13  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  sono state somministrate due o tre volte a settimana. Queste fasi I sono state sospese prematuramente per gli effetti collaterali soprattutto di tipo neurologico ed infettivo senza evidenti risultati clinici. La discrepanza tra l'attività in vitro ed i primi risultati in vivo è stata attribuita alla schedula utilizzata. Uno studio successivo di fase I, che includeva 76 pazienti con LNH recidivati-refrattari (28 follicolari, 24 mantellari, 10 indolenti, 14 DLBCL), prevedeva la somministrazione di blinatumomab in infusione continua.<sup>(83)</sup> I pazienti sono stati trattati con dosi di 0,5, 1,5, 5, 15, 30, 60 o 90  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{giorno}$  per 4-8 settimane. Le risposte cliniche furono evidenziate a partire da 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{giorno}$ , mentre la massima dose tollerata fu di 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{giorno}$ . Le ORR globali sono state del 69%, con una percentuale di CR del

37%. Le risposte migliori sono state osservate nel linfoma follicolare (CR = 40%, ORR 80%). La durata mediana della risposta per tutti i pazienti è stata di 404 giorni, mentre quella per i pazienti che avevano raggiunto la CR è stata di 508 giorni.

Un trial multicentrico di fase II per pazienti recidivati-refrattari con DLBCL è stato condotto in 25 pazienti per valutare l'efficacia e la tossicità del blinatumomab, o a dosi che incrementavano settimanalmente o a dose fissa.<sup>(84)</sup> La dose fissa scelta fu di 112  $\mu\text{g}/\text{die}$  per infusione continua fino a 8 settimane, e per successive 4 settimane per i pazienti che avessero ottenuto una malattia stabile, dopo un intervallo libero da terapia di 4 settimane. Gli altri pazienti ricevevano una schedula a dosaggio che incrementava gradualmente (9  $\mu\text{g}/\text{die}$  settimana 1, 28  $\mu\text{g}/\text{die}$  settimana 2, poi 112  $\mu\text{g}/\text{die}$ ) e premedicazione con desametasone. Nonostante questi accorgimenti, il 22% dei pazienti ha sospeso il trattamento per eventi avversi soprattutto di tipo neurologico. Dei 21 pazienti valutabili (per raggiungimento della dose target) 9 avevano risposto, 4 dei quali raggiungendo la CR; la PFS complessiva è stata di 3,7 mesi.

In sintesi, si può ritenere che l'aumentata esperienza clinica con l'uso di queste molecole abbia permesso di ridurre gli importanti effetti collaterali inizialmente osservati. Inoltre, si stanno sviluppando formulazioni sottocutanee di blinatumomab che dovrebbero migliorare la compliance sia per i pazienti che per le strutture che li ospitano.

## CAR-T

La terapia cosiddetta *chimeric antigen receptor (CAR) T-cell (CAR-T)* è una forma innovativa di immunoterapia in cui i linfociti T autologhi vengono geneticamente modificati per esprimere recettori chimerici codificanti un frammento di una singola catena antigene-specifica e varie molecole co-stimolatorie. I CARs, composti primariamente da un dominio che lega l'antigene e da un dominio intracellulare che serve all'attivazione dei linfociti T, ridirigono i linfociti T-autologhi modificati ad identificare specificatamente ed ad eradicare le cellule neoplastiche riconosciute con modalità HLA-indipendenti. La terapia CAR-T ha avuto rilevante successo nel trattamento delle leucemie linfoblastiche B esprimenti l'antigene CD19 (CD19-CAR-T).<sup>(85)</sup> Inoltre, trials clinici con la specifica terapia CD19-CAR-T hanno evidenziato grande efficacia nei pazienti con LNH a cellule B recidivati-refrattari.<sup>(86)</sup>

Recentemente, risultati preliminari su 43 pazienti con LNH-B recidivati-refrattari, di cui 26 con DLBCL, 14 con linfoma follicolare, e 3 con linfoma mantellare, di vari studi di fase II sono stati presentati all'ASH nel 2015.<sup>(87)</sup> Solo 30 dei 43 pazienti hanno ricevuto l'infusione delle CAR-T.

Tredici pazienti non hanno potuto essere trattati a causa della progressione di malattia (n = 4), del fallimento del processo di produzione delle CAR-T (n = 6), o per ritiro del consenso (n = 3).

Per i 28 pazienti valutabili (DLBCL, n = 15; LF, n = 12; linfomi mantellari, n = 1), l'ORR dei singoli sottotipi istologici a 3 mesi dall'infusione è stata rispettivamente del 47% nel DLBCL (CR, n = 3; PR, n = 4), e 73% nel LF (CR, n = 4; PR, n = 4). Da notare che 6 pazienti che avevano ottenuto una PR a 3 mesi, hanno raggiunto la CR a 6 mesi dall'infusione, dimostrando come le migliori risposte si possano documentare più tardivamente rispetto alla tempistica attesa dalla chemioterapia. Inoltre, i pazienti che raggiungono la CR la mantengono a lungo.<sup>(88-89)</sup> La sindrome da rilascio di citochine (CRS), caratteristico effetto collaterale associato alla somministrazione di CAR-T è stata osservata in 16 pazienti (53%), e la maggior parte di esse erano di grado 2 (grado 2, n=14; grado 3, n=1; grado 4, n=1). È interessante notare come la prevalenza di CRS severa sia relativamente più bassa rispetto a quella documentata nei pazienti con leucemia acuta linfoblastica.<sup>(85)</sup>

Un gruppo del *National Cancer Institute* (NCI) ha riportato i risultati di un paziente con LF refrattario che ha raggiunto una PR duratura dopo aver ricevuto l'infusione di CD19-CAR-T costruita da un nuovo costruito ora sviluppato da Kite Pharma e denominato KTE-C19.<sup>(90)</sup> Successivamente, gli investigatori hanno disegnato uno studio di fase I che prevedeva la somministrazione di CD19-CAR-T in pazienti con LNH recidivati/refrattari.<sup>(91)</sup> Quattro dei sette pazienti valutabili (57%) hanno raggiunto la CR, e due (28%) la PR.

Al momento la Kite Pharma sta conducendo un trial clinico multicentrico di fase I-II utilizzando questo costruito, KTE-C19, in pazienti recidivati/refrattari con DLBCL (ZUMA-1 trial). Per quanto riguarda la fase I, sette pazienti avevano ricevuto KTE-C19 ad una dose target di  $2 \times 10^6$  cellule/kg.<sup>(92)</sup> Cinque di questi sette pazienti (71%) raggiungevano una risposta obiettiva nel primo mese dopo l'infusione e 4/7 (57%) la CR. Sei su sette pazienti hanno presentato come effetto collaterale una CRS (71%, 5 di grado 1-2, ed 1 di grado 4). La tossicità neurologica è stata documentata in tutti i pazienti (di cui 3 di grado 3 e 1 di grado 4). La mediana della durata della CRS e della tossicità neurologica è stata di 7-8 giorni. Sulla base dei risultati della fase I, gli investigatori hanno proceduto alla fase II, i cui risultati preliminari sono stati presentati all'ASH 2016.<sup>(93)</sup> In totale, 101 pazienti avevano ricevuto KTE-C19, e 51 risultavano allora eleggibili per l'analisi. Interessante il dato che nel 99% dei pazienti si è riusciti a preparare un prodotto KTE-C19 da infondere, con un tempo medio intercorso tra il prelievo aferetico e l'infusione delle CAR-T di soli 17,4 giorni, tempo molto più breve se comparato ai precedenti trials grazie anche allo sviluppo di procedure di espansione, che ha reso possibile compiere il processo di produzione KTE-C19 in 6-8 giorni.<sup>(94)</sup> La ORR è stata del 76% (47% CR and 29% PR)<sup>(95)</sup>. Le PFSs a 1 e 3 mesi sono state rispettivamente del 92% e del 56%. La neurotossicità e la CRS di grado >3 si sono sviluppate rispettivamente nel 20% e nel 29% dei pazienti. Il gruppo del *Fred*

*Hutchinson Cancer Research Center* (FHCRC) ha condotto uno studio di fase I con l'utilizzo di peculiari CAR-T (JCAR014, prodotto con sottopopolazioni CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) nei LNH recidivati e refrattari.<sup>(96)</sup> Proprio per le specificità del prodotto infuso, questo studio ha evidenziato una significativa correlazione tra la chemioterapia induce la linfopenia, la dose cellulare, le risposte nonché gli effetti collaterali. In particolare, tra i 30 pazienti valutabili, i 18 che ricevevano ciclofosfamide e fludarabina come chemioterapia per la linfodeplezione ottenevano un percentuale di CR significativamente più elevata rispetto ai 12 casi trattati con ciclofosfamide ed etoposide (CR 50% vs. 8%, p = 0,02). Inoltre, i pazienti erano stati divisi in 3 coorti che hanno rispettivamente ricevuto tre differenti dosi di cellule ( $2 \times 10^5$ /kg,  $2 \times 10^6$ /kg e  $2 \times 10^7$ /kg).

Nel gruppo di pazienti che erano stati linfodepleti con ciclofosfamide e fludarabina, la ORR più elevata è stata documentata nella coorte che aveva ricevuto la dose cellulare intermedia [ORR: 1 di 3 (33%), 9 di 11 (82%) e 3 di 4 (75%), rispettivamente per le coorti  $2 \times 10^5$ /kg,  $2 \times 10^6$ /kg e  $2 \times 10^7$ /kg]. Infine, la coorte di pazienti a cui è stata somministrata la dose cellulare più elevata ha sviluppato più frequentemente CRS di grado più severo [0 di 3 (0%), 1 di 11 (9%) e 3 di 6 (50%), rispettivamente per la coorte  $2 \times 10^5$ /kg,  $2 \times 10^6$ /kg e  $2 \times 10^7$ /kg]. In uno studio successivo di fase I (JCAR017, in cui le CD19-CAR-T avevano un rapporto delle sottopopolazioni CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> di 1:1) 26 pazienti con LNH a cellule B, di cui 22 con istologia aggressiva, furono trattati con ciclofosfamide e fludarabina seguito dall'infusione di  $2 \times 10^6$ /kg CAR-T. La percentuale di ORR fu del 73%, con il 46% di CR. Dodici pazienti presentarono CRS di grado 3-4 e neurotossicità di grado 3<sup>(97)</sup>.

A fronte di una promettente efficacia, la terapia con CD19-CAR-T presenta ancora molteplici problemi che devono essere risolti prima di una realistica introduzione nella pratica clinica, come ad esempio il controllo della malattia durante la fase di preparazione, i fallimenti nella fase di produzione, e non ultimo il management degli importanti effetti collaterali.

## Conclusioni

L'orizzonte terapeutico per i pazienti con linfoma, soprattutto per quelli che rispondono poco o male alle terapie standard, si arricchisce sempre di più di novità anche molto innovative. Ma è anche importante sottolineare che la vera sfida nel prossimo futuro sarà come ottimizzare e integrare nella pratica clinica tali farmaci con l'obiettivo di conseguire la cura nei pazienti con linfoma. Un'ulteriore sfida, la cui discussione va al di là dello scopo di questa review, sarà come ottimizzare i trattamenti anche da una prospettiva economica. Dati i costi elevati di tutti i nuovi agenti nonché delle complesse procedure terapeutiche descritte, la sostenibilità di ogni programma di trattamento basato sul loro uso è probabile che diventi altrettanto importante quanto la loro efficacia.

## Bibliografia

1. Bello C, Sotomayor EM. Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: rituximab and beyond. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;233-42.
2. Bezombes C, Fournie JJ, Laurent G. Direct effect of rituximab in B-cell-derived lymphoid neoplasias: mechanism, regulation, and perspectives. *Mol Cancer Res*. 2011;9(11):1435-42.
3. Lee SC, Srivastava RM, Lopez-Albaitero A, Ferrone S, Ferris RL. Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunol Res* 2011;50(2-3):248-54.
4. Maloney DG. Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2012;366(21):2008-16.
5. Oldham RK, Dillman RO. Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *J Clin Oncol*. 2008;26(11):1774-1777.
6. Safdari Y, Ahmadzadeh V, Farajnia S. CD20-targeting in B-cell malignancies: novel prospects for antibodies and combination therapies. *Invest New Drugs*. 2016;34(4):497-512.
7. Solimando AG, Ribatti D, Vacca A, Einsele H. Targeting B-cell non Hodgkin lymphoma: New and old tricks. *Leuk Res*. 2016;42:93-104.
8. Skvortsova I, Popper BA, Skvortsov S, Saurer M, Auer T, Moser R, et al. Pretreatment with rituximab enhances radiosensitivity of non-Hodgkin's lymphoma cells. *J Radiat Res*. 2005;46(2):241-48.
9. Vega MI, Huerta-Yepez S, Martínez-Paniagua M, Martínez-Miguel B, Hernández-Pando R, González-Bonilla CR, et al. Rituximab-mediated cell signaling and chemo/immunosensitization of drug-resistant B-NHL is independent of its Fc functions. *Clin Cancer Res*. 2009;15(21):6582-94.
10. Teeling JL, French RR, Cragg MS, van den Brakel J, Pluyter M, Huang H, et al. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2004;104(6):1793-800.
11. Mossner E, Brunker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(22):4393-402.
12. Wierda WG, Padmanabhan S, Chan GW, Gupta IV, Lisby S, Osterborg A, et al. Ofatumumab is active in patients with fludarabine-refractory CLL irrespective of prior rituximab: results from the phase 2 international study. *Blood*. 2011;118(19):5126-9.
13. Sehn LH, Chua N, Mayer J, Dueck G, Trněný M, Bouabdallah K, et al. Obinutuzumab plus bendamustine versus bendamustine monotherapy in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN): a randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):1081-93.
14. Cheson BD, Trněný M, Bouabdallah K, Dueck G, Gribben J, Lugtenburg PJ, et al. Obinutuzumab plus bendamustine followed by obinutuzumab maintenance prolongs overall survival compared with bendamustine alone in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma: updated results of the GADOLIN study. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2016;128(22):615.
15. Marcus RE, Davies AJ, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen CJ, et al. Obinutuzumab-based induction and maintenance prolongs progression-free survival (PFS) in patients with previously untreated follicular lymphoma: primary results of the randomized phase 3 GALLIUM study. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2016;128(22):6.
16. Vitolo U, Trněný M, Belada D, Carella AM, Chua N, Abrisqueta P, et al. Obinutuzumab or rituximab plus CHOP in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma: final results from an open-label, randomized phase 3 study (GOYA). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2016;128(22):470.
17. Zelenetz AD, Gordon LI, Wierda WG, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology. B-cell lymphomas. Version 3.2017. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/b-cell.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/b-cell.pdf). April 13, 2017.
18. Jagadeesh D, Smith MR. Antibody drug conjugates: changing the treatment landscape of lymphoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2016;17(10):55.
19. Ansell SM. Brentuximab vedotin. *Blood*. 2014;124(22):3197-200.
20. Stein H, Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Mason DY, Ziegler A, et al. Identification of Hodgkin and Sternberg-reed cells as a unique cell type derived from a newly-detected small-cell population. *Int J Cancer*. 1982;30(4):445-59.
21. Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, Advani RH, Winter JN, Bello CM, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood* 2015;125(9):1394-402.
22. Kim YH, Tavallaei M, Rozati S, Sundram U, Salva K, Wood GS, et al. Phase II investigator-initiated study of brentuximab vedotin in mycosis fungoides or sezary syndrome: final results show significant clinical activity and suggest correlation with CD30 expression. *J Clin Oncol*. 2015;33(32):3750-8.
23. Argrawal B, Reddish M, Longenecker BM. CD30 expression on human CD8+ T cells isolated from peripheral blood lymphocytes of normal donors. *J Immunol*. 1996; 157(8):3229-34.
24. Senter PD, Sievers EL. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotechnol*. 2012;30(7):631-7.
25. Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, Sun MM, Lenox J, Cerveny CG, et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):7063-70.
26. Kim KM, McDonagh CF, Westendorf L, Brown LL, Sussman D, Feist T, et al. Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity. *Mol Cancer Res*. 2008;7(8):2486-97.
27. Fromm JR, McEarchern JA, Kennedy D, Thomas A, Shustov AR, Gopal AK. Clinical binding properties, internalization kinetics, and clinicopathologic activity of brentuximab vedotin: an antibody-drug conjugate for CD30-positive lymphoid neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012;12(4):280-3.
28. Okeley NM, Miyamoto JB, Zhang X, Sanderson RJ, Benjamin DR, Sievers EL, et al. Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. *Clin Cancer Res*. 2010;16(3):888-97.
29. Gardai SJ, Heiser R, Cao A, Li F, Leung-Law C. Immune systems engagement results in non-classical antibody-drug conjugate antitumor activity of brentuximab vedotin. *ISHL International Symposium on Hodgkin Lymphoma Abstracts*. 2016;101(5):53.
30. Deng C, Pan B, O'Connor OA. Brentuximab vedotin. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(1):22-7.
31. Siddiqi T, Thomas SH, Chen R. Role of brentuximab vedotin in the treatment of relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Pharmacogenom Pers Med*. 2014;7:79-85.
32. Montanari F, Diefenbach C. Relapsed Hodgkin lymphoma: management strategies. *Curr Hematol Malig Rep*. 2014;9(3):284-93.
33. Younes A, Bartlett NL, Leonard JP, Kennedy DA, Lynch CM, Sievers EL, et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *N Eng J Med*. 2010;363(19):1812-21.
34. Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(18):2183-9.
35. Gopal AK, Chen R, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, et al. Durable remissions in a pivotal phase 2 study of brentuximab vedotin in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2015;125(9):1236-43.
36. Chen R, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, et al. Five-year survival and durability results of brentuximab vedotin in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2016;128(12):1562-6.
37. Moskowitz AJ, Schoder H, Yahalom J, McCall SJ, Fox SY, 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.
38. Chen R, Palmer JM, Martin P, Tsai N, Kim Y, Chen BT, et al. Results of a multi-center phase II Trial of Brentuximab Vedotin as Second-Line Therapy before Autologous transplantation in relapsed/refractory Hodgkin Lymphoma. *Biology Blood*

- Marrow Transplant 2015;21(12):2136-40.
39. Moskowitz CH, Nademanee A, Masszi T, Agura E, Holowiecki J, Abidi MH, et al. Brentuximab vedotin as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with Hodgkin's lymphoma at risk of relapse or progression (AETHERA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2015;385(9980):1853-62.
  40. Sweetenham J, Walewski J, Nadamane A, Masszi T, Agura E, Holowiecki J, et al. Updated Efficacy and Safety Data from the AETHERA Trial of Consolidation with Brentuximab Vedotin after Autologous Stem Cell Transplant (ASCT) in Hodgkin Lymphoma Patients at High Risk of Relapse. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126 (23):3162.
  41. Forero-Torres A, Holkova B, Goldschmidt J, Chen R, Olsen G, Boccia RV, et al. Phase 2 study of frontline brentuximab vedotin monotherapy in Hodgkin lymphoma patients aged 60 years and older. *Blood*. 2015;126(26):2798-804.
  42. Yasenchak CA, Forero-Torres A, Cline-Burkhardt VJM, Cline-Burkhardt VJM, Bordoni RE, Patel-Donnelly D, Flynn PJ, et al. Brentuximab Vedotin in Combination with Dacarbazine or Bendamustine for Frontline Treatment of Hodgkin Lymphoma in Patients Aged 60 Years and Above: Interim Results of a Multi-Cohort Phase 2 Study. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;128(22):587.
  43. Younes A, Connors JM, Park SI, Fanale M, O'Meara MM, Hunder NN, et al. Brentuximab vedotin combined with ABVD or AVD for patients with newly diagnosed Hodgkin's lymphoma: a phase 1, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncol*. 2013;14(13):1348-56.
  44. Kumar A, Casulo C, Yahalom J, Schöder H, Barr PM, Caron P, et al. Brentuximab vedotin and AVD followed by involved-site radiotherapy in early stage, unfavorable risk Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2016;128(11):1458-64.
  45. Borchmann P, Eichenauer DA, Plutschow A, Haverkamp H, Kreissl S, Fuchs M, et al. Targeted Beacopp Variants in Patients with Newly Diagnosed Advanced Stage Classical Hodgkin Lymphoma: Final Analysis of a Randomized Phase II Study. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):580.
  46. Park SI, Olajide OA, Reddy NM, Budde LE, Ghosh N, Richards KL, et al. A phase 2 trial of ABVD followed by brentuximab vedotin consolidation in limited stage non-bulky Hodgkin lymphoma. *ASCO Annual Meeting Abstracts*. 2016;34(15):7508.
  47. Carson KR, Newsome SD, Kim EJ, Wagner-Johnston ND, von Geldern G, Moskowitz CH, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with brentuximab vedotin therapy: a report of 5 cases from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR) project. *Cancer*. 2014;120(16):2464-71.
  48. Gandhi MD, Evens AM, Fenske TS, Hamlin P, Coiffier B, Engert A, et al. Pancreatitis in patients treated with brentuximab vedotin: a previously unrecognized serious adverse event. *Blood*. 2014;123(18):2895-7.
  49. Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, Advani RH, Winter JN, Bello CM, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood*. 2015;125(9):1394-1402.
  50. Yasenchak CA, Farber CM, Budde LE, Ansell SM, Advani R, Holkova B, et al. Brentuximab vedotin in combination with RCHOP as front-line therapy in patients with DLBCL: interim results from a phase 2 study. *Blood*. 2014;124(21):1745.
  51. Fanale MA, Horwitz SM, Forero-Torres A, Bartlett NL, Advani RH, Pro B, et al. Brentuximab vedotin in the front-line treatment of patients with CD30+ peripheral T-cell lymphomas: results of a phase I study. *J Clin Oncol*. 2014;32(28):3137-143.
  52. Pro B, Advani R, Brice P, Bartlett NL, Rosenblatt JD, Illidge T, et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol*. 2012;30(18):2190-196.
  53. Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, Natkunam Y, Redd RA, Homer H et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2690-7.
  54. Menter T, Bodmer-Haeckl A, Dirnhöfer S, Tzankov A. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. *Hum Pathol*. 2016;54:17-24.
  55. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010;116(17):3268-77.
  56. Green MR, Rodig S, Juszczynski P, Ouyang J, Sinha P, O'Donnell E, et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2012;18(6):1611-18.
  57. Bryan L and Gordon L. Blocking tumor escape in hematologic malignancies: the anti-PD-1 strategy. *Blood Rev*. 2015;29(1):25-32.
  58. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Eng J Med*. 2015;372(4):311-9.
  59. Ansell A, Armand P, Timmerman JM, Shipp MA, Garelak BMB, Zhu L, et al. Nivolumab in patients (Pts) with relapsed or refractory classical Hodgkin Lymphoma (R/R cHL): Clinical Outcomes from Extended Follow-up of a Phase 1 Study (CA209-039). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):583.
  60. Younes A, Santoro A, Shipp M, Zinzani PL, Timmerman JM, Ansell S, et al. Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(9):1283-94.
  61. Hatake K, Kinoshita T, Fukuhara N, Choi I, Taniwaki M, Ando K, et al. Phase II study of nivolumab in Japanese patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma previously treated with brentuximab vedotin (ONO-4538-15): An interim analysis. *ASCO Annual Meeting Abstracts*. 2016;34(15):e19018.
  62. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Eng J Med*. 2012;366(26):2443-54.
  63. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, et al. Nivolumab in patients with relapsed or refractory hematologic malignancy: preliminary results of a phase Ib study. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2698-704.
  64. Herbaux C, Gauthier J, Brice P, Fornecker L, Bouabdallah K, Manson G, et al. Nivolumab Is Effective and Reasonably Safe in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Study from the Lysa and SFGM-TC. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):3979.
  65. Armand P, Shipp MA, Ribrag V, Michot JM, Zinzani PL, Kuruvilla J, et al. Programmed death-1 blockade with pembrolizumab in patients with classical Hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure. *J Clin Oncol* 2016;34(31):3733-3739.
  66. Chen R, Zinzani PL, Fanale MA, Armand P, Johnson NA, Brice P, et al. Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(19):2125-32.
  67. Villasboas JC, Ansell SM, Witzig TE. Targeting the PD-1 pathway in patients with relapsed classic Hodgkin lymphoma following allogeneic stem cell transplant is safe and effective. *Oncotarget*. 2016;7(11):13260-4.
  68. Andorsky D, Yamada R, Said J, Pinkus G, Betting D, and Timmerman J. Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4232-44.
  69. Shi M, Roemer M, Chapuy B, Liao X, Sun H, Pinkus G, et al. Expression of programmed cell death 1 ligand 2 (PD-L2) is a distinguishing feature of primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma and associated with PDCD1LG2 copy gain. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(12):1715-1723.
  70. Lesokhin A, Ansell S, Armand P, Scott E, Halwani A, Gutierrez M, et al. Nivolumab in patients with relapsed or refractory hematologic malignancy: preliminary results of a phase Ib study. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2698-704.
  71. Myklebust JH, Irish JM, Brody J, Czerwinski DK, Houot R, Kohrt HE, et al. High PD-1 expression and suppressed cytokine signaling distinguish T cells infiltrating follicular lymphoma tumors from peripheral T cells. *Blood*. 2013;121(8):1367-76.
  72. Westin J, Chu F, Zhang M, Fayad L, Kwak L, Fowler N, et al. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase II trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):69-77.
  73. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, Holmes AB, Bhagat G, Murty VV, et al. Combined genetic inactivation of beta2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2011;20(6):728-40.
  74. Roemer MG, Advani RH, Redd RA, Pinkus GS, Natkunam Y, Ligon AH, et al.

- Classical Hodgkin Lymphoma with Reduced beta2M/MHC Class I Expression is Associated with Inferior Outcome Independent of 9p24.1 Status. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(11):910-6.
75. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskova S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med.* 2016;375(9):819-29.
  76. O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, Teng MW, Smyth MJ. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev.* 2017;52:71-81.
  77. O'Donnell JS, Smyth MJ, Teng MW. Acquired resistance to anti-PD1 therapy: checkmate to checkpoint blockade? *Genome Med.* 2016;8:111.
  78. Ansell S. Where do programmed death-1 inhibitors fit in the management of malignant lymphoma? *J Oncol Pract.* 2016;12(2):101-06.
  79. Loffler A, Kufer P, Lutterbuse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19-CD3 induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood.* 2000;95(6):2098-103.
  80. Newman MJ, Benani DJ. A review of blinatumomab, a novel immunotherapy. *J Oncol Pharm Practice.* 2016;22(4):639-45.
  81. Kantarjian H, Stein A, Gökbuğet N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, et al. Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2017;376(9):836-47.
  82. Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R. Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther.* 2012;136(3):334-42.
  83. Goebeler ME, Knop S, Viardot A, Kufer P, Topp MS, Einsele H, et al. Bispecific T-Cell Engager (BiTE) Antibody Construct Blinatumomab for the Treatment of Patients With Relapsed/Refractory Non-Hodgkin Lymphoma: Final Results From a Phase I Study. *J Clin Oncol.* 2016;34(10):1104-11.
  84. Viardot A, Goebeler ME, Hess G, Neumann S, Pfreundschuh M, Adrian N, et al. Phase 2 study of the bispecific T-cell engager (BiTE) antibody blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2016;127(11):1410-16.
  85. Wang M. CAR T-cell therapy effective in B acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):e314.
  86. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ, Younes A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(1):25-40.
  87. Schuster SJ, Svoboda J, Nasta SD, Porter DL, Chong EA, Landsburg DJ, et al. Sustained remissions following chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) in patients with relapsed or refractory CD19+ lymphomas. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2015;126(23):183.
  88. Schuster SJ, Svoboda J, Nasta SD, Chong EA, Winchell N, Landsburg DJ, et al. Treatment with chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) results in durable remissions in patients with relapsed or refractory diffuse large B cell lymphomas of germinal center and non-germinal center origin, "double hit" diffuse large B cell lymphomas, and transformed follicular to diffuse large B cell lymphomas. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2016;128:3026.
  89. Chong EA, Svoboda J, Nasta SD, Porter DL, Winchell N et al. Chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) in patients with poor prognosis, relapsed or refractory CD19+ follicular lymphoma: prolonged remissions relative to antecedent therapy. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2016;128:1100.
  90. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood.* 2010;116(20):4099-102.
  91. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol.* 2015;33:540-9.
  92. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, Siddiqui T, Chavez JC, Hosing CM, et al. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CART Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Mol Ther.* 2017;25:285-95.
  93. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis L, Miklos D, Jacobson CA, MD6, et al. Kte-C19 (anti-CD19 CAR T Cells) induces complete remissions in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): results from the pivotal phase 2 ZUMA-1. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2016;128:LBA-6
  94. Lu TL, Pugach O, Somerville RP, Rosenberg SA, Kochenderfer JN, Better M, et al. A rapid cell expansion process for production of engineered autologous CAR-T cell therapies. *Hum Gene Ther Methods.* 2016;27(6):209-18.
  95. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Ahmed MA, et al. Outcomes in refractory aggressive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): results from the international SCHOLAR-1 study. *ASCO Annual Meeting Abstracts.* 2016;34(15):16.
  96. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8 + and CD4 + CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med* 2016;8(355):355ra116.
  97. Turtle CJ, Hay KA, Juliane G, Hanafi LA, Li D, Chaney C, et al. Biomarkers of cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19 CAR-T cells and mitigation of toxicity by cell dose. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2016;128:1852.

## Parole Chiave

Linfomi, immunoterapia, brentuximab vedotin, inibitori dei checkpoint, CAR-T.

## Ringraziamenti

Gli autori ringraziano l'AIL-CS-Fondazione Amelia Scorza.

## Indirizzi per la corrispondenza

*Fortunato Morabito*

Direttore Tecnico Scientifico "AIL Cosenza Fondazione Amelia Scorza ONLUS e dell'Unità di Ricerca Biotecnologica, URB" via SS178 C. da San Nicola, 87051 Aprigliano (CS), Tel. 0984 015863, cell 3929785568 E-mail: fortunato\_morabito@tiscali.it

# Mieloma Multiplo



Alessandra Larocca, Mario Boccadoro

Divisione di Ematologia U, Azienda Ospedaliero-Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino.

## Introduzione

Il mieloma multiplo (MM) è una patologia neoplastica caratterizzata dalla proliferazione di plasmacellule monoclonali nel midollo osseo e da sovrapproduzione di immunoglobuline o catene leggere, che possono causare danno d'organo.

Il trattamento per il MM è nettamente migliorato nell'ultimo decennio grazie ai notevoli progressi nella comprensione della patogenesi della malattia e all'introduzione di nuovi farmaci e combinazioni. Prima del 2000, la sopravvivenza media dei pazienti con MM alla diagnosi era di circa 2,5 anni. I nuovi farmaci di prima generazione, come l'inibitore del proteasoma (bortezomib) e gli immunomodulanti IMiDs® (talidomide e lenalidomide), e l'utilizzo del trapianto di cellule staminali autologhe (ASCT) hanno sostanzialmente migliorato la sopravvivenza globale dei pazienti affetti da MM, che attualmente varia da 5 a 7 anni.

Nonostante lo sviluppo di nuovi agenti che agiscono non solo sulle cellule neoplastiche ma anche sul microambiente midollare, il MM rimane una patologia incurabile nella maggior parte dei pazienti e la prognosi per coloro che hanno una ricaduta precoce o che diventano refrattari alle terapie è tuttora sfavorevole <sup>(1)</sup>.

Durante il decorso della malattia, i pazienti con MM possono avere una recidiva della malattia o possono diventare refrattari alle terapie esistenti, e i periodi di remissione diventano sempre più brevi. Inoltre, i pazienti affetti da una malattia diventata refrattaria a entrambi i farmaci immunomodulanti e al bortezomib hanno una sopravvivenza libera da malattia e una sopravvivenza globale di soli 5 e 9 mesi, rispettivamente <sup>(2)</sup>.

Pertanto, la ricerca di nuovi agenti con diversi meccanismi di azione per superare la resistenza ai farmaci ha portato allo sviluppo di IMiD e inibitori del proteasoma di seconda generazione, inibitori dell'istone deacetilasi (HDACs), inibitori di Akt e mTOR. Inoltre, sono stati recentemente proposti diversi tipi di immunoterapia che includono anticorpi monoclonali, inibitori del *checkpoint*, cellule T geneticamente modificate per esprimere recettori sintetici di an-

tigeni chimerici (CAR - *chimeric antigen receptors*) e vaccini.

In questo articolo prenderemo in esame l'immunoterapia, fornendo una visione approfondita riguardo alla recente introduzione degli anticorpi monoclonali e del loro ruolo in combinazione con altri farmaci. Sarà inoltre fornita una breve panoramica delle nuove terapie cellulari attualmente in fase di sviluppo.

## Anticorpi monoclonali

### Elotuzumab

L'elotuzumab è un anticorpo IgG1 monoclonale umanizzato diretto contro il CS1 (noto anche come SLAMF7), una glicoproteina di superficie altamente espressa sulle cellule di mieloma e presente a livelli inferiori sulle plasmacellule normali, sulle cellule NK e sulle altre cellule T <sup>(3)</sup>. CS1 media l'adesione delle cellule mielomatose alle cellule stromali del midollo osseo, promuovendo la loro proliferazione e prevenendo l'apoptosi <sup>(4)</sup>.

Con il legame al CS1, elotuzumab inibisce gli effetti stimolatori del midollo osseo sulle cellule di mieloma; inoltre, esercita l'attività anti-mieloma tramite citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) esercitata dalle cellule NK <sup>(3)</sup>.

Il primo studio sull'uomo con elotuzumab come agente singolo è stato condotto in 35 pazienti affetti da MM recidivato-refrattario <sup>(5)</sup>. In questo studio elotuzumab si è dimostrato ben tollerato e la massima dose tollerata non è stata raggiunta alla dose più alta testata di 20 mg/kg ogni due settimane. Gli eventi avversi principali includevano reazioni correlate all'infusione del farmaco, generalmente lievi o moderate, che si sono verificate durante la prima dose di elotuzumab. Introducendo la premedicazione prima dell'infusione del farmaco, non sono stati riportati eventi avversi di grado 3-4, né gravi reazioni infusionali. Nonostante il buon profilo di sicurezza riportato, elotuzumab in monosomministrazione non ha indotto risposte oggettive, ma solo una stabilizzazione della malattia nel 26,5% dei pazienti. Questi risultati hanno favorito la sperimentazione di elotuzumab in combinazione con altri nuovi farmaci in studi di fase II e III.

## Anticorpi monoclonali anti-CD38

Il CD38 è una glicoproteina transmembrana di tipo II che esercita funzioni di adesione e di segnale mediate dal recettore<sup>(6,7)</sup>. Viene espresso a livelli relativamente bassi sulle cellule linfoidi e mieloidi, nonché su altri tessuti non ematologici, mentre è altamente espresso sulle plasmacellule neoplastiche, diventando così un potenziale target terapeutico.<sup>(8)</sup> Recentemente sono stati sviluppati tre anticorpi monoclonali anti-CD38: il chimerico isatuximab (SAR650984) e gli anticorpi completamente umanizzati daratumumab (DARA) e MOR202 (MOR).<sup>(9)</sup> Ogni anticorpo è diretto contro un epitopo distinto di CD38 e agisce con diversi meccanismi d'azione.

### Daratumumab

Daratumumab è un anticorpo monoclonale IgG1 completamente umano diretto contro un epitopo specifico di CD38 sulla superficie delle cellule di mieloma.<sup>(9)</sup> Esercita il suo effetto anti-mieloma attraverso l'attivazione della citotossicità complemento-dipendente (CDC), mediante ADCC e tramite fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente (ADCP). Inoltre, daratumumab è in grado di indurre l'apoptosi diretta delle cellule del mieloma e modula l'attività enzimatica di CD38<sup>(9-13)</sup> Nel primo studio sull'uomo con daratumumab (GEN501) la massima dose tollerata non è stata raggiunta, valutando livelli di dose fino a 24 mg/kg. In questo studio è stato riportato un tasso di risposte del 36% in pazienti fortemente pre-trattati alla dose di 16 mg/kg di daratumumab. L'efficacia sembrava essere correlata alla dose, e infatti la risposta globale era del 10% con la dose di 8 mg/kg e 35% con la dose di 16 mg/kg.<sup>(14,15)</sup>

Nello studio di fase II SIRIUS, daratumumab alla dose di 16 mg/kg è stato testato in 106 pazienti dopo una mediana di 5 terapie precedenti. La maggior parte dei pazienti aveva fallito una precedente terapia con lenalidomide e bortezomib, e molti erano refrattari a pomalidomide e carfilzomib. La terapia con daratumumab ha indotto una risposta nel 29% dei pazienti, una sopravvivenza libera da progressione (PFS) mediana di 3,7 mesi e una sopravvivenza mediana di 17,5 mesi. Da sottolineare il tasso di risposta del 21% osservato nei pazienti refrattari a 4 farmaci (bortezomib, lenalidomide, pomalidomide e carfilzomib).<sup>(16)</sup> Nell'analisi aggregata degli studi GEN501 e SIRIUS circa un terzo dei pazienti trattati con daratumumab alla dose di 16 mg/kg ha raggiunto una risposta superiore alla risposta parziale ( $\geq$ PR). Le risposte si sono dimostrate durature (durata mediana: 7,6 mesi) e indipendenti dal numero di terapie precedenti e della funzionalità renale del paziente<sup>(17)</sup>. La PFS e OS mediani sono rispettivamente di 4 e 20 mesi. Una differenza notevole di PFS è stata osservata tra i pazienti rispondenti ( $\geq$ PR) e quelli non rispondenti (mediana, 15 vs 1 mese). È interessante notare che un vantaggio di sopravvivenza è stato riportato non solo nei pazienti rispondenti a DARA (sopravvivenza mediana non raggiunta), ma anche nei pazienti con una malattia stabile o una risposta minima (sopravvivenza mediana di 19 mesi) rispetto ai pazienti non respon-

di (sopravvivenza mediana di 4 mesi). Le reazioni infusionali si sono verificate nel 48% dei pazienti; tuttavia, solo nel 3% dei casi si sono dimostrate severe ( $\geq$  grado 3-4). Tali reazioni sono avvenute principalmente durante la prima infusione di DARA (96%), e in misura nettamente inferiore durante le infusioni successive (7%).

Pertanto daratumumab in monosomministrazione è stato approvato negli Stati Uniti nel novembre 2015 dalla Food and Drug Administration (FDA), e successivamente in Europa da parte dell'Agenzia Europea del farmaco (EMA), per i pazienti con MM che hanno ricevuto almeno 3 linee precedenti di terapia tra cui un inibitore del proteasoma e un IMiD o che sono refrattari a un inibitore del proteasoma e ad un IMiD.

### Isatuximab (SAR650984)

Isatuximab (SAR650984) è un anticorpo chimerico anti-CD38 generato dall'immunizzazione con cellule murine 300-19 transfettate per esprimere il CD38 umano<sup>(18)</sup>. Isatuximab induce la morte cellulare tramite ADCC in tutte le linee CD38<sup>+</sup> testate, e ADCP e CDC in modelli in vitro, ed esercita anche un effetto pro-apoptotico. Isatuximab è stato valutato in uno studio di *dose escalation* (0,3-20 mg/kg) per determinare la massima dose tollerata e il profilo di sicurezza in pazienti con diverse malattie ematologiche recidivate/refrattarie. In 18 pazienti affetti da MM recidivato/refrattario pesantemente pre-trattati (numero mediano di terapie precedenti 6), trattati con dose  $\geq$  10 mg/kg di isatuximab, è stata documentata almeno una PR nel 33% dei pazienti, compresa una risposta completa (CR) nell'11%. Le reazioni infusionali si sono verificate principalmente durante la prima infusione e non erano gravi (grado 1-2). Le tossicità più comuni correlate al trattamento includevano astenia (53%) e nausea (35%), e l'evento più frequente di grado 3-4 correlato al farmaco è stato la polmonite (8%).

## Inibitori del checkpoint

Recentemente, l'interazione tra il tumore e il sistema immunitario è diventata una questione di grande rilevanza nelle patologie tumorali. È stato evidenziato che le cellule tumorali possono compromettere il sistema immunitario di controllo dell'ospite attraverso percorsi diversi, quali la proteina 4 associata ai T-linfociti (CTLA-4) e *programmed-death 1* (PD-1), bloccando l'attività immunitaria con l'espressione di ligandi dei recettori immunitari checkpoint. Anticorpi monoclonali diretti contro i ligandi e i recettori coinvolti permettono di revertire la down-regolazione delle cellule T indotta dal tumore e di aumentare la risposta immune contro le cellule neoplastiche<sup>(46)</sup>. Due anticorpi monoclonali anti-PD1, nivolumab e pembrolizumab, e un anticorpo monoclonale contro il ligando (anti-PDL1) durvalumab, sono attualmente in sperimentazione in pazienti affetti da MM<sup>(19)</sup>.

Nivolumab come agente singolo (alla dose di 3 mg/kg) è stato testato in 27 pazienti con mieloma recidivato/refrattario. Con questo farmaco non sono state osservate risposte oggettive, tuttavia il 63% dei

pazienti ha ottenuto una stabilizzazione della malattia <sup>(20)</sup>. Pembrolizumab è un anticorpo monoclonale IgG4 umanizzato, diretto contro PD-1, che blocca l'interazione tra PD-1 e PD-L1/PD-L2. Pembrolizumab ha dimostrato un'efficace attività antitumorale e una tossicità gestibile in vari tipi di tumore <sup>(21)</sup>.

## Strategie terapeutiche di combinazione con anticorpi monoclonali

### Elotuzumab

I dati provenienti da modelli preclinici suggeriscono un'attività sinergica di elotuzumab con bortezomib e lenalidomide, probabilmente mediata dall'aumento dell'attività ADCC dell'elotuzumab e dalla stimolazione dell'attività cellulare NK <sup>(4,22)</sup>

In uno studio di fase II in pazienti lenalidomide-naive con mieloma recidivato dopo una mediana di 2 terapie precedenti, la combinazione di elotuzumab-lenalidomide-dexametasone (EloRd) si è dimostrata fattibile ed efficace, con l'85% di risposte parziali o migliori ( $\geq$ PR) <sup>(23)</sup>. In un altro studio, EloRd ha indotto l'82% di  $\geq$ PR e il 32% di risposte parziali molto buone (VGPR) o remissioni complete. L'esposizione precedente a nuovi agenti o il numero di terapie precedenti non sembra influenzare il tasso di risposta <sup>(24)</sup>. Non si è verificata nessuna tossicità limitante la dose (DLT) e la massima dose tollerata non è stata raggiunta.

Sulla base di questi risultati incoraggianti, è stato condotto uno studio randomizzato di fase III che ha confrontato la combinazione EloRd con lenalidomide-desametasone (Rd) (ELOQUENT-2) <sup>(25, 26)</sup>. Nel complesso, 321 pazienti sono stati assegnati al gruppo elotuzumab e

325 al gruppo di controllo. Dopo un follow up mediano di 24,5 mesi, il PFS mediano nel gruppo elotuzumab è stato pari a 19 mesi rispetto ai 15 mesi del gruppo di controllo, con una riduzione relativa del 30% del rischio di progressione di malattia o di morte ( $p < 0,001$ ). Il tasso di risposte ( $\geq$ PR) nel gruppo elotuzumab è stato pari al 79% rispetto al 66% nel gruppo di controllo ( $p < 0,001$ ). Gli eventi avversi più comuni di grado 3-4 nei due gruppi sono stati: linfocitopenia, neutropenia, astenia e polmonite. Le reazioni infusionali si sono verificate nel 10% dei pazienti trattati con elotuzumab e sono state per lo più di grado 1 o 2 (Tabella 1).

Elotuzumab è stato anche valutato in combinazione con bortezomib in uno studio di fase I. <sup>(27)</sup> Non si è verificata nessuna tossicità limitante la dose e la massima dose tollerata non è stata raggiunta. Rispettivamente il 48% e il 63% dei pazienti valutati hanno raggiunto almeno una risposta parziale e una risposta minima. Gli eventi avversi sono stati principalmente reazioni infusionali di grado 1-2, osservati nel 71% dei pazienti. Un confronto formale tra elotuzumab-bortezomib-desametasone (EloVd) e bortezomib-desametasone (Vd) è stato condotto in 150 pazienti affetti da MM recidivato/refrattario di cui la metà aveva precedentemente ricevuto bortezomib. <sup>(28)</sup> Nonostante un tasso di risposta sovrapponibile (66% vs 63%), è stata riportata una tendenza verso un migliore PFS a favore dei pazienti che hanno ricevuto EloVd rispetto a quelli trattati con Vd (PFS mediano, 10 vs 7 mesi, HR 0,72,  $p = 0,09$ ). In un'analisi preliminare di sopravvivenza, l'OS di 2 anni era del 73% con EloVd e 66% con Vd. L'associazione di elotuzumab a Vd non ha aggiunto tossicità significative: gli eventi avversi seri di grado 3-4 si sono verificati nel 71% dei pazienti che hanno ricevuto EloVd e nel 60% di quelli trat-

Studi	CASTOR (daratumumab-bortezomib-desametasone vs. bortezomib-desametasone)	POLLUX (daratumumab-lenalidomide-desametasone vs. lenalidomide-desametasone)	ELOQUENT-2 (elotuzumab-lenalidomide-desametasone vs. lenalidomide-desametasone)
Tasso di risposta ( $\geq$ PR) (%)	83% vs 63%	93% vs 76%	79% vs 66%
Sopravvivenza libera da progressione, mediana (mesi)	Non raggiunta vs 7,2 HR 0,39 (95% CI, 0,28-0,53)	Non disponibile HR 0,37 (95% CI, 0,27-0,52)	19,4 vs 14,9 HR 0,70 (95% CI, 0,57-0,85)
Eventi avversi ematologici Grado 3-4	Anemia 14% vs 16% Neutropenia 13% vs 4% Trombocitopenia 45% vs 33% Linfopenia 10% vs 3%	Anemia 12% vs 20% Neutropenia 52% vs 37% Trombocitopenia 13% vs 13% Linfopenia 5% vs 4%	Anemia 19% vs 21% Neutropenia 34% vs 44% Trombocitopenia 19% vs 20% Linfopenia 77% vs 49%
Eventi avversi non ematologici Grado 3-4	Polmonite 8% vs 10% Neuropatia periferica 5% vs 7% Diarrea 4% vs 1% Ipertensione 7% vs 1% Reazioni infusionali 9% vs 0	Polmonite 8% vs 8% Fatigue 6% vs 3% Dispnea 3% vs 1% Reazioni infusionali 5% vs 0	Fatigue 8% vs 8% Diarrea 5% vs 4% Reazioni infusionali 1% vs 0

Tabella 1 - Risultati (efficacia e principali tossicità) degli studi di fase III con anticorpi monoclonali (daratumumab e elotuzumab) nel MM recidivato/refrattario.

tati con Vd. Le tossicità principali includono infezioni (21% vs 13%) e piastrinopenia (9% vs 17%).

I dati preliminari di uno studio spagnolo di fase II hanno mostrato un profilo di tossicità favorevole e un'efficacia promettente con elotuzumab combinato a talidomide e basse dosi di desametasone (EloTd) in 44 pazienti affetti da MM recidivato/refrattario fortemente pretrattati (3 terapie precedenti) <sup>(29)</sup>. Da protocollo, è stata aggiunta la ciclofosfamide nel 28% dei pazienti a causa di mancata risposta o per progressione. I principali eventi avversi riportati erano astenia (qualsunque grado, 35%) e edemi periferici (qualsiasi grado, 25%). La combinazione EloTd ha determinato una risposta oggettiva nel 38% dei pazienti, con un PFS e OS mediani di 4 e 13 mesi, rispettivamente. Sulla base dei dati suddetti, EMPLICITI® (elotuzumab) è stato approvato negli Stati Uniti dalla FDA, e successivamente in Europa da parte dell'EMA, in combinazione con lenalidomide e desametasone per il trattamento del MM in pazienti adulti che hanno ricevuto almeno una linea di terapia precedente.

### Anticorpi monoclonali anti-CD38

Lenalidomide migliora l'efficacia degli anticorpi monoclonali grazie alla capacità di valorizzare l'ADCC e l'attività delle cellule effettrici (ad esempio, le cellule NK) e di up-regolare l'espressione del CD38 sulle cellule di MM <sup>(30,31)</sup>. La combinazione di daratumumab con lenalidomide e desametasone (DaraRd) è stata inizialmente valutata in uno studio di fase I/II per pazienti affetti da MM recidivato/refrattario. Nella fase di espansione dello studio che ha incluso 32 pazienti, non refrattari a lenalidomide e con una mediana di 2 linee di terapia precedenti, daratumumab è stato somministrato alla dose di 20 mg/kg. Il tasso di risposta è stato dell'88%, incluso il 25% di CR <sup>(32)</sup>.

Sulla base di questi risultati, DaraRd (DARA 16 mg/kg) è stato formalmente confrontato con lo standard Rd in uno studio di fase III (POLLUX), arruolando 569 affetti da MM recidivato/refrattario dopo avere ricevuto almeno una precedente terapia <sup>(33)</sup>. I pazienti nel braccio sperimentale hanno mostrato un rischio significativamente più basso di progressione della malattia o di morte rispetto ai pazienti nel braccio di terapia standard (HR 0,32;  $p < 0,001$ ), indipendentemente dal numero di terapie precedenti ricevute o dall'esposizione precedente a lenalidomide. Inoltre, una percentuale significativamente maggiore di pazienti trattati con DaraRd ha raggiunto una malattia minima residua negativa (MMR, soglia di 1 cellula tumorale per  $10^5$  cellule) rispetto a quelli del gruppo Rd (22% vs 5%,  $p < 0,001$ ). L'aggiunta di daratumumab a Rd non ha influenzato la tollerabilità della combinazione: gli eventi avversi che hanno portato alla sospensione del trattamento sono stati infatti simili nei 2 gruppi (7% vs 8%) (Tabella 1).

Un altro studio randomizzato di fase III (CASTOR), ha valutato il beneficio dell'aggiunta del daratumumab a bortezomib-desametasone (Vd) in confronto con la terapia standard Vd sempre in pazienti in recidiva. Daratumumab-Vd ha significativamente migliorato il PFS mediano, con una riduzione del rischio di progressione del 61%

( $p < 0,001$ ) e ha indotto un notevole aumento del tasso di risposta globale (83% vs 63%,  $p < 0,001$ ) e di risposte di elevata qualità  $\geq$ VGPR (59% vs 29%,  $p < 0,001$ ). Analogamente a quanto riportato nello studio POLLUX, l'aggiunta di daratumumab ha significativamente aumentato il tasso di MMR negativa a tutte le soglie esaminate (1 cellula tumorale per  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  cellule,  $p < 0,001$ ) <sup>(34,35)</sup> (Tabella 1). Il daratumumab è stato anche testato in combinazione con altri farmaci di nuova generazione come carfilzomib e pomalidomide. Uno studio in corso di fase Ib sta valutando la tripletta daratumumab-carfilzomib-dexametasone. Un altro studio ha valutato il ruolo di daratumumab associato a pomalidomide (DaraPd) in 77 pazienti affetti da MM recidivato/refrattario dopo 3,5 precedenti linee di trattamento. I risultati preliminari sono promettenti: daratumumab non ha aggiunto tossicità significative a quelle riportate con pomalidomide, ad eccezione delle reazioni infusionali, che si sono verificate nel 61% dei pazienti. In 53 pazienti valutabili per efficacia, il tasso di risposta è stato del 58,5%, con risultati simili nella popolazione doppia refrattaria sia a lenalidomide che a bortezomib ( $\geq$ PR 57,5%) <sup>(36)</sup>. Un altro interessante anticorpo monoclonale anti-CD38 è isatuximab (SAR650984), che ha dimostrato effetti antitumorali sinergici o additivi in combinazione con lenalidomide, bortezomib, carfilzomib e melphalan in modelli tumorali murini. Isatuximab in combinazione con Rd in pazienti fortemente pre-trattati (con un mediana di 7 trattamenti precedenti) ha ottenuto un tasso di risposta del 63% alla dose di 10 mg/kg e una riduzione della paraproteina  $>90\%$  in circa un terzo dei pazienti. La maggioranza dei pazienti in questo studio era ricaduta o refrattaria a lenalidomide, tuttavia il tasso di risposta riportato in questo sottogruppo è stato del 48%. Inoltre il PFS mediano è stato complessivamente di 6,2 mesi, mentre nei pazienti che avevano ricevuto solo 1-2 linee di terapie precedenti ( $n=7$ ), il PFS mediano non era stato ancora raggiunto al momento dell'aggiornamento dei dati. In particolare, la risposta al trattamento è stata osservata anche nei pazienti refrattari a bortezomib, carfilzomib o pomalidomide <sup>(37)</sup>.

### Inibitori del checkpoint

Negli studi preclinici, lenalidomide ha dimostrato di aumentare l'efficacia del blocco del checkpoint nel contrastare la crescita tumorale <sup>(38)</sup>. Questo dato ha fornito il razionale scientifico per la combinazione degli inibitori del *checkpoint* (pembrolizumab, anti-PD1 e durvalumab, anti-PD-L1) con gli immunomodulanti.

In uno studio di fase I di *dose escalation*, il pembrolizumab combinato con Rd (PembroRd) è stato testato in pazienti recidivati/refrattari, dopo almeno due regimi precedenti di terapia. Da sottolineare che il 76% dei pazienti erano refrattari a lenalidomide mentre il 30% erano doppi refrattari. Gli eventi avversi più comuni sono stati trombocitopenia (28%) e neutropenia (24%). Inoltre, il 76% dei pazienti ha raggiunto almeno una risposta parziale, con una durata mediana di 10 mesi <sup>(39)</sup> (Tabella 2). Un altro studio di fase II sta valutando la sicurezza e l'efficacia di pembrolizumab associato a pomalidomide-

Target	Farmaco	Combinazioni	Fase dello studio	Popolazione di pazienti (Numero di pazienti affetti da mieloma)	Disponibilità risultati clinici (SI/NO)	Risposta (%) (≥PR)	Referenza o NCT
PD-1	Nivolumab	Braccio 1: nivolumab monoterapia Braccio 2: nivolumab + ipilimumab / Lirilumab Braccio 3: daratumumab + nivolumab ± pomalidomide- dexametasone	1	MM recidivato/ refrattario ≥ 2 precedenti terapie (375*)	N	-	NCT01592370
		Braccio 1: nivolumab + pomalidomide- desametasone Braccio 2: pomalidomide- desametasone Braccio 3: nivolumab + elotuzumab + pomalidomide- desametasone	3	MM recidivato/ refrattario ≥ 2 precedenti terapie (406*)	N	-	NCT02726581
PD-1	Pembrolizumab	-	1	MM <i>smoldering</i> (16)	N	-	NCT02603887
		Lenalidomide-desametasone	1	MM recidivato/ refrattario ≥ 2 precedenti terapie (40)	S	50%	Mateos et al. <sup>(39)</sup>
		Lenalidomide-desametasone ± pembrolizumab	3	MM alla diagnosi non elegibile al trapianto (640*)	N	-	NCT02579863
		Pomalidomide-desametasone	1/2	MM recidivato/ refrattario, refrattario a lenalidomide ≥ 2 precedenti terapie (48)	S	65%	Badros et al. <sup>(40)</sup>
		Pomalidomide-desametasone ± pembrolizumab	3	MM recidivato/refrattario ≥ 2 precedenti terapie (300*)	N	-	NCT02576977
PD-L1	Durvalumab	Braccio 1: durvalumab + lenalidomide-desametasone in pazienti ad alto rischio non elegibili al trapianto, alla diagnosi Braccio 2: durvalumab + lenalidomide-desametasone in pazienti a rischio standard alla diagnosi non elegibili al trapianto Braccio 3: durvalumab + lenalidomide in mantenimento per pazienti ad alto rischio post trapianto alla diagnosi	1b	MM alla diagnosi (138*)	N	-	NCT02685826
		Braccio 1: durvalumab Braccio 2: durvalumab + pomalidomide Braccio 3: durvalumab + pomalidomide-desametasone	1b	MM recidivato/refrattario ≥ 2 precedenti terapie (138*)	N	-	NCT02616640
* Numero atteso di pazienti affetti da MM arruolati							

Tabella 2 - Dati clinici degli studi con inibitori del check point in pazienti affetti da mieloma multiplo recidivato/refrattario.

dexametasone (PembroPd) in pazienti con MM recidivato/refrattario <sup>(40)</sup>. Un'analisi preliminare di 24 pazienti valutabili, in precedenza esposti a immunomodulanti e inibitori del proteasoma, ha mostrato che la combinazione PembroPd è stata ben tollerata: la maggior parte degli eventi avversi di grado 3-4 sono stati ematologici, e non sono state riportate reazioni infusionali.

Sono state riportate tossicità di tipo autoimmune come ipotiroidismo (8%) transaminite (8%) e polmoniti (4%). Questa combinazione ha anche mostrato una buona efficacia, con un tasso di risposta ( $\geq$ PR) del 50% (Tabella 2).

## Combinazioni farmaci e immunoterapia

Nei prossimi anni i pazienti affetti da MM avranno a disposizione diverse opzioni terapeutiche nella fase di ricaduta della malattia (Tabella 3). La scelta del trattamento più appropriato deve tener

conto delle condizioni del paziente, dell'aggressività della malattia, delle precedenti linee di terapia e della sensibilità o refrattarietà a diversi farmaci. Pertanto, quando è possibile, sarebbe preferibile un approccio di combinazione di diversi farmaci con differenti meccanismi di azione antitumorale.

Le combinazioni di quattro farmaci potrebbero diventare la strategia terapeutica futura, che potrebbe prevedere anche l'incorporazione di anticorpi monoclonali nella terapia di prima linea e di mantenimento per migliorare ulteriormente la profondità (raggiungimento della MMR negatività) e la durata della risposta, sia nei pazienti giovani che in quelli anziani.

Nonostante sia attivo anche come agente singolo, l'anticorpo monoclonale anti-CD38 combinato con altri farmaci, come lenalidomide e bortezomib, ha portato a risultati senza precedenti <sup>(33,34)</sup>.

Per questo motivo daratumumab in futuro potrebbe diventare parte

Classe	Farmaco	Target	Combinazione testata
Inibitori del proteasoma	Carfilzomib		KTd KRd KPd K-filanesib
	Ixazomib		Ixazomib-Rd Ixazomib-Pd
Immunomodulanti	Pomalidomide		PVD KPd Ixazomib-Pd Dara-Pd Pembrolizumab-Pd Durvalumab-Pd Elo-Pd
Anticorpi monoclonali	Elotuzumab	CS1	Elo-Rd Elo-Vd Elo-Pd
	Daratumumab	CD38	Dara-Rd Dara-Vd Dara-Pd
	Isatuximab	CD38	Isatuximab-Rd Isatuximab-VCD
Inibitori del checkpoint	Pembrolizumab	PD-1	Pembrolizumab-Rd
	Pembrolizumab-Pd Durvalumab	PDL-1	Durvalumab-Rd Durvalumab-Pd

K carfilzomib, T thalidomide, d desametasone, P pomalidomide, V bortezomib, Dara daratumumab, C ciclofosfamide

Tabella 3 - Nuovi farmaci e combinazioni in corso di sperimentazione.

integrante del trattamento iniziale sia di pazienti giovani che di pazienti anziani, anche considerando il buon profilo di tollerabilità.

Alla ricaduta del MM, l'aggiunta di elotuzumab ai regimi standard di terapia, in particolare alla combinazione Rd, ha significativamente migliorato il PFS e il tempo alla terapia successiva<sup>(24, 25)</sup>. Al momento, elotuzumab potrebbe essere considerato un valido trattamento per i pazienti che non ricevono una terapia continuativa con lenalidomide. In futuro elotuzumab potrebbe essere valutato come opzione nella terapia di mantenimento o in combinazione con i trattamenti standard in fase di recidiva, in particolare in caso di recidiva non aggressiva.

Pomalidomide può essere combinata con gli anticorpi monoclonali considerata l'attività immunologica sinergica e la potenza di questa combinazione<sup>(36)</sup>, in particolare quando i pazienti diventano refrattari. Gli agenti di nuova generazione inclusi gli anticorpi monoclonali sembrano superare la prognosi infausta determinata dalla presenza di anomalie cromosomiche ad alto rischio, ma la maggior parte dei dati è stata ottenuta in studi non randomizzati e pertanto è necessario un ulteriore follow up.

Gli anticorpi monoclonali, soprattutto se combinati con IMiD e inibitori del proteasoma, possono superare la resistenza ai farmaci, migliorare l'efficacia delle terapie ed essere una strategia preziosa per combattere l'eterogeneità clonale del MM.

Inoltre, sono state sviluppati una serie di nuovi farmaci (come gli inibitori di mTOR, di MEK1/2, di BRAF, di AKT e anti-IL-6), con diversi target e meccanismi di azione, che sono attualmente in fase di indagine in studi di fase precoce. Alcuni di questi composti hanno già mostrato un'attività anti-mieloma nel contesto delle sperimentazioni cliniche. È quindi probabile che le combinazioni di diversi farmaci diventeranno un approccio terapeutico standard sia per il mieloma alla diagnosi che per il paziente recidivato/refrattario.

## Nuove terapie cellulari

Impressionanti risultati preliminari sono stati osservati in pazienti con neoplasie ematologiche delle cellule B trattati con l'infusione di cellule T geneticamente modificate per esprimere recettori sintetici di antigeni chimerici (CAR) diretti contro l'antigene di superficie linea-specifico CD19. Le cellule T progettate con un CAR anti-CD19 hanno indotto una risposta completa anche in un paziente con MM<sup>(41)</sup>.

Recentemente, sono state progettate altre cellule CAR-T per colpire antigeni superficiali espressi dalle cellule di MM che comprendono CD38, CD138, CD269, l'antigene di maturazione delle cellule B (BCMA), le catene leggere  $\kappa$ , CS1 (CD319) e CD44v6. Tuttavia, nonostante la loro efficacia, l'infusione delle cellule CAR-T è gravata da alcune tossicità a breve e a lungo termine, in particolare la sindrome da rilascio di citochine e casi di aplasia prolungata<sup>(42)</sup>. Sono in studio anche cellule modificate geneticamente che appartengono all'immunità innata come le cellule NK. La modificazione delle linee

cellulari umane NKL e NK-92 con un vettore lentivirale codificante per CS1 e CD138 CAR sembra fattibile.

Tuttavia, sono ancora necessari diversi passaggi per ottimizzare e convalidare l'utilizzo di cellule NK modificate con CAR, e questi risultati saranno indispensabili prima che il loro uso clinico più ampio diventi fattibile.

## Immunoterapia cellulare adottiva e cellule CAR-T

Le cellule CAR-T sono cellule T autologhe o allogeniche progettate geneticamente per esprimere un recettore chimerico specifico per un antigene associato al tumore espresso sulla superficie cellulare neoplastica. CAR sono inoltre dotati di domini co-stimolatori, che aumentano l'attivazione e la funzione delle cellule CAR-T e promuovono la loro proliferazione e il rilascio di citochine. Le cellule CAR-T presentano sia vantaggi che limitazioni. Non sono limitati dall'HLA del paziente. Tuttavia, l'appropriata selezione degli antigeni è fondamentale per prevenire eventuali tossicità sulle cellule e tessuti non tumorali. Infatti, molti potenziali target hanno un'ampia espressione sulle cellule e sui tessuti normali<sup>(43)</sup>.

Le cellule CAR-T dirette contro il CD19 hanno mostrato un'importante attività nella leucemia linfoblastica acuta e nella leucemia linfocitica cronica<sup>(44-47)</sup>. Anche se l'espressione di CD19 non è di solito associata al MM, alcuni studi hanno identificato la sua espressione su un piccolo sottogruppo di cellule staminali di MM che in parte può essere responsabile della recidiva della malattia<sup>(48)</sup>. Garfall et al. hanno descritto un paziente trattato con cellule anti-CD19 CAR-T (CTL019)<sup>(41)</sup>. Il paziente è stato sottoposto ad infusione CTL019 dopo un trapianto standard. Dopo l'infusione delle cellule, non sono stati osservati febbre o altri sintomi della sindrome da rilascio di citochine. Le cellule CTL019 sono state rilevate sia nel sangue che nel midollo osseo fino a diversi giorni dopo l'infusione. Il paziente ha iniziato la terapia di mantenimento con lenalidomide 3 mesi dopo. La risposta completa (CR) è stata ancora osservata ad un anno di follow up. Da sottolineare che la risposta è stata raggiunta nonostante l'assenza di espressione di CD19 sul 99,95% delle plasmacellule.

Un aggiornamento di questo studio è stato recentemente riportato al meeting dell'*American Society of Hematology* nel dicembre 2016 su una serie di 12 pazienti<sup>(49)</sup>. Complessivamente, a 10 su 12 pazienti sono state infuse cellule CTL019 12-14 giorni dopo l'infusione di melphalan con successiva reinfusione di cellule staminali. Sei pazienti hanno ottenuto una risposta parziale molto buona (VGPR), 2 pazienti una risposta parziale (PR), 2 pazienti sono progrediti; sono stati riportati solo eventi avversi minori.

Più recentemente, è stato identificato l'antigene di maturazione delle cellule B (BCMA) come target di CAR nel MM. BCMA è una proteina di superficie coinvolta nella differenziazione e maturazione delle cellule B in plasmacellule. Inoltre, BCMA è altamente espresso anche sulle cellule di MM. Ali et al. hanno riportato uno

studio di fase I con un anti-BCMA-CAR con una molecola co-stimolante CD28<sup>(50)</sup>. Dodici pazienti hanno ricevuto dosi crescenti di cellule CAR-T a 0,3, 1, 3 o 9 × 10<sup>6</sup>/kg.

Tutti i pazienti sono stati trattati con ciclofosfamida e fludarabina prima dell'infusione di cellule CAR-T. Le risposte includono: remissione completa stringente (sCR, n=1), *Very Good Partial Response* (VGPR) (n=2), PR (n=1) e SD (n=8). Sia le risposte migliori e sia gli effetti collaterali più rilevanti si sono verificati nei pazienti trattati a dosi più alte. Un solo paziente è recidivato con cloni BCMA negativi nel midollo.

Sono attualmente in corso altri studi su BCMA e alcuni risultati preliminari sono stati presentati all'ASH del 2016 dal gruppo dell'Università della Pennsylvania<sup>(50)</sup>. Nella fase I dello studio di escalation della dose, è stata sperimentata una seconda generazione di 4-1BB-CD3 $\zeta$  cellule anti-BCMA-CAR-T; 6 pazienti hanno ricevuto infusioni così suddivise: 10% il giorno 0, 30% il giorno 1 e 60% il giorno 2. Nel complesso, 5 pazienti hanno sviluppato una sindrome da rilascio di citochine; 2 pazienti hanno richiesto il trattamento anti IL-6 con tocilizumab.

È interessante notare che, anche se questi 2 pazienti avevano ricevuto solo il 40% della dose di cellule CAR-T prevista, hanno ottenuto una stringente CR e una VGPR, rispettivamente. Cinque mesi dopo l'ultima infusione, il paziente che aveva raggiunto la VGPR ha avuto una progressione della malattia ed è stata osservata una concomitante riduzione delle cellule circolanti CAR-T. In particolare, l'espressione di BCMA è stata persa sulle cellule del MM, e questo potrebbe essere un "antigen escape". Nel complesso, gli altri 4 pazienti hanno mostrato una malattia stabile, una risposta minima o una PD con una bassa espansione delle cellule CAR-T.

Berdeja et al. hanno riportato i risultati su una coorte di 9 pazienti con MM recidivato/refrattario infusi con cellule anti-BCMA-CAR-T di seconda generazione (bb2121) con 4-1BB co-stimolazione<sup>(51)</sup>. I pazienti hanno ricevuto infusioni singole a diverse dosi (5, 15, o 45 × 10<sup>7</sup>) dopo condizionamento con ciclofosfamida e fludarabina. Le risposte migliori sono state ottenute dopo l'infusione di 15 × 10<sup>7</sup> cellule CAR-T: 2 pazienti hanno mostrato una stringente CR e 1 VGPR. CD138 (noto anche come Sindecin 1) è una proteina di superficie espressa sulle plasmacellule normali e maligne, che lega molecole di collagene e fibronectina della matrice extracellulare<sup>(52)</sup>. Data la sua elevata espressione sulle cellule di MM, è stato considerato un bersaglio interessante. Un gruppo cinese ha riportato risultati preliminari utilizzando un anti CD138 CAR su 5 pazienti refrattari<sup>(53)</sup>.

Le infusioni sono state ben tollerate, ed è stata segnalata solo febbre di lieve entità. Per quanto riguarda le risposte, è stata ottenuta una malattia stabile in 4 su 5 pazienti. Tuttavia, questi sono solo risultati preliminari di cui si attende un'ulteriore conferma. Da sottolineare che CD138 non è specificatamente espresso dalle cellule MM ma è anche espresso da cellule epiteliali, pertanto questo po-

trebbe essere un problema per eventuali tossicità *off-tumor*.

Altri studi clinici e preclinici con cellule CAR-T dirette contro altri target specifici del MM sono in corso. Le cellule CAR-T sono una forma promettente di immunoterapia nel MM, tuttavia potrebbero esserci delle limitazioni. Innanzitutto è da tenere in considerazione il fenomeno di *antigen escape* delle cellule CAR-T mirate contro un singolo antigene presente sulle cellule di MM. Per superare questo problema, colpire due diversi antigeni potrebbe migliorare la specificità e l'efficacia delle cellule CAR-T.

Sono state sollevate altre preoccupazioni riguardo l'efficacia, come la profondità e la durata degli effetti antitumorali e il profilo di tossicità, e le potenziali tossicità sistemiche gravi incluso il rischio di sindrome da rilascio di citochine<sup>(42)</sup>. Infatti, la presenza di un'alta massa tumorale potrebbe essere associata con un rischio più elevato di sindrome da rilascio di citochine. Inoltre, sono state segnalate anche tossicità specifiche in modo aneddótico. È recentemente stato pubblicato un caso di sindrome da encefalopatia reversibile posteriore (PRES) avvenuta dopo l'infusione di cellule anti-BCMA CAR-T con peggioramento dei sintomi neurologici nonostante il trattamento con tocilizumab e gli steroidi ad alto dosaggio. Tuttavia, la somministrazione di ciclofosfamida ha revertito la sindrome<sup>(54)</sup>.

## Conclusioni

I continui progressi nella comprensione della biologia del MM e della sua gestione clinica hanno determinato un miglioramento della prognosi e della sopravvivenza. Nuovi farmaci, con differenti meccanismi di azione e target, hanno significativamente aumentato l'armamentario terapeutico contro una malattia così complessa. Questi agenti comprendono farmaci immunomodulanti e inibitori del proteasoma, che sono attualmente considerati i trattamenti standard nel MM. Altri agenti recentemente introdotti includono gli anticorpi monoclonali, gli inibitori del *checkpoint* e la più recente immunoterapia cellulare adottiva.

Gli anticorpi monoclonali, in particolare gli anti-CD38, hanno dimostrato un'elevata efficacia nei pazienti in recidiva con una tossicità molto limitata e pertanto avranno un ruolo fondamentale nel trattamento del mieloma nel prossimo decennio.

Agire sul sistema immunitario è una nuova strategia di trattamento estremamente interessante, in cui gli inibitori del checkpoint e l'immunoterapia cellulare sono i principali attori. I risultati degli inibitori del *checkpoint* sembrano promettenti, ma non ancora buoni come nei tumori solidi. Una delle ragioni potrebbe essere la funzione immune compromessa che caratterizza il sistema immunitario dei pazienti con MM. I risultati più promettenti nel MM sono stati finora conseguiti in combinazione con farmaci immunomodulanti, per il potenziale effetto sinergico sul sistema immunitario.

I primi risultati favorevoli delle cellule CAR-T nella leucemia linfoblastica hanno riaperto l'interesse per l'immunoterapia cellulare

nel MM e questo ambito di ricerca sta progredendo molto rapidamente. Tuttavia, nonostante le risposte durevoli in pazienti fortemente pretrattati, i risultati sono molto preliminari e molte domande restano aperte, tra cui la definizione del miglior target, e una migliore comprensione delle tossicità (come la sindrome da rilascio di citochine) e l'efficacia di tali terapie (profondità di risposta

e durata). Attualmente sono disponibili molte terapie per il MM e molti nuovi agenti saranno probabilmente disponibili nel prossimo futuro. Pertanto saranno fondamentali i risultati degli studi in corso nonché la programmazione di studi futuri per valutare il ruolo degli inibitori del *checkpoint* e delle cellule CAR-T in uno scenario di trattamento in continua evoluzione.

## Bibliografia

- van de Donk NWCJ, Lokhorst HM. New developments in the management and treatment of newly diagnosed and relapsed/refractory multiple myeloma patients. *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(12):1569-73.
- Kumar SK, Lee JH, Lahuerta JJ, Morgan G, Richardson PG, Crowley J, Haessler J, et al. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study. *Leukemia*. 2012;26(1):149-57.
- Hsi ED, Steinle R, Balasa B, Szmania S, Draksharapu A, Shum BP, et al. CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2775-84.
- Tai Y-T, Dillon M, Song W, Leiba M, Li X-F, Burger P, et al. Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. *Blood*. 2008;112(4):1329-37.
- Zonder JA, Mohrbacher AF, Singhal S, van Rhee F, Bensinger WI, Ding H, et al. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(3):552-9.
- Konopleva M, Estrov Z, Zhao S, Andreeff M, Mehta K. Ligation of cell surface CD38 protein with agonistic monoclonal antibody induces a cell growth signal in myeloid leukemia cells. *J Immunol*. 1998;161(9):4702-8.
- Deaglio S, Vaisitti T, Billington R, Bergui L, Omede' P, Genazzani AA, et al. CD38/CD19: a lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood*. 2007;109(12):5390-8.
- Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(4):482-8.
- de Weers M, Tai Y-T, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol*. 2011;186(3):1840-8.
- Beum P V, Lindorfer MA, Peek EM, Stukenberg PT, de Weers M, Beurskens FJ, et al. Penetration of antibody-opsonized cells by the membrane attack complex of complement promotes Ca(2+) influx and induces streamers. *Eur J Immunol*. 2011;41(8):2436-46.
- Overdijk MB, Verploegen S, Marijn B, van Egmond M, Groen RWJ, Martens ACM, et al. Phagocytosis Is A Mechanism of Action for Daratumumab. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012;120(21):4054.
- Groen RW, van der Veer M, Hofhuis FM, van Kessel B, de Weers M, Parren PWHI, et al. In Vitro and In Vivo Efficacy of CD38 Directed Therapy with Daratumumab In the Treatment of Multiple Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2011;118(21):3058.
- Jansen JHM, Boross P, Overdijk MB, van Bueren JJL, Parren PWHI LJ. Daratumumab, a Human CD38 Antibody Induces Apoptosis of Myeloma Tumor Cells Via Fc Receptor-Mediated Crosslinking. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012;120(21):2974.
- Lokhorst H, Laubach J, Nahi H, Plesner T, Gimsing P, Hansson M, et al. Dose-dependent efficacy of daratumumab (DARA) as monotherapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (RR MM). *ASCO Annual Meeting Abstracts*. 2014;32(5s):8513.
- Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, Nahi H, Gimsing P, Hansson M, et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(13):1207-19.
- Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, Singhal S, Chari A, Bahlis NJ, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1551-60.
- Usmani SZ, Weiss BM, Plesner T, Bahlis NJ, Belch A, Lonial S, et al. Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(1):37-44.
- Deckert J, Wetzel M-C, Bartle LM, Skaletskaya A, Goldmacher VS, Vallée F, et al. SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2014;20(17):4574-83.
- Armand P. Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. *Blood*. 2015;125(22):3393-400.
- Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J Clin Oncol*. 2016; 34(23):2698-704.
- Homet Moreno B, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *Br J Cancer*. 2015;112(9):1421-7.
- van Rhee F, Szmania SM, Dillon M, van Abbema AM, Li X, Stone MK, et al. Combinatorial efficacy of anti-CS1 monoclonal antibody elotuzumab (HuLuc63) and bortezomib against multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(9):2616-24.
- Richardson PG, Jagannath S, Moreau P, Jakubowiak AJ, Raab MS, Facon T, et al. Elotuzumab in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with relapsed multiple myeloma: final phase 2 results from the randomised, open-label, phase 1b-2 dose-escalation study. *Lancet Haematol*. 2015;2(12):e516-27.
- Lonial S, Vij R, Harousseau J-L, Facon T, Moreau P, Mazumder A, et al. Elotuzumab in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2012;30(16):1953-9.
- Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(7):621-31.
- Dimopoulos MA, Lonial S, White D, Moreau P, Palumbo A, San Miguel J, et al. Eloquent-2 Update: A Phase 3, Randomized, Open-Label Study of Elotuzumab in Combination with Lenalidomide/Dexamethasone in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma - 3-Year Safety and Efficacy Follow-up. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):28.
- Jakubowiak AJ, Benson DM, Bensinger W, Siegel DSD, Zimmerman TM, Mohrbacher A, et al. Phase I trial of anti-CS1 monoclonal antibody elotuzumab in combination with bortezomib in the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2012;30(16):1960-5.
- Jakubowiak A, Offidani M, Pégourie B, De La Rubia J, Garderet L, Laribi K, et al. Randomized phase 2 study of elotuzumab plus bortezomib/dexamethasone (Bd) versus Bd for relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*. 2016;127(23):2833-40.
- Mateos M-V, Granell M, Oriol A, Martinez-Lopez J, Blade J, Hernandez MT, et al. Elotuzumab in combination with thalidomide and low-dose dexamethasone: a phase 2 single-arm safety study in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2016;175(3):448-56.
- van der Veer MS, de Weers M, van Kessel B, Bakker JM, Wittebol S, Parren PWHI,

- et al. Towards effective immunotherapy of myeloma: enhanced elimination of myeloma cells by combination of lenalidomide with the human CD38 monoclonal antibody daratumumab. *Haematologica*. 2011;96(2):284-90.
31. van der Veer MS, de Weers M, van Kessel B, Bakker JM, Wittebol S, Parren PWHI, et al. The therapeutic human CD38 antibody daratumumab improves the anti-myeloma effect of newly emerging multi-drug therapies. *Blood Cancer J*. 2011;1(10):e41.
  32. Plesner T, Arkenau H-T, Lokhorst HM, Gimsing P, Krejcik J, Lemech C, et al. Safety and Efficacy of Daratumumab with Lenalidomide and Dexamethasone in Relapsed or Relapsed, Refractory Multiple Myeloma. *Blood*. 2014;124(21):84.
  33. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis NJ, Usmani SZ, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1319-31.
  34. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(8):754-66.
  35. Avet-Loiseau H, Casneuf T, Chiu C, Laubach JB, Lee J-J, Moreau P, et al. Evaluation of Minimal Residual Disease (MRD) in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM) Patients Treated with Daratumumab in Combination with Lenalidomide Plus Dexamethasone or Bortezomib Plus Dexamethasone. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2016;128(22):246.
  36. Chari A, Lonial S, Suvannasankha A, Fay JW, Arnulf B, Iftikharuddin JJ, et al. Open-Label, Multicenter, Phase 1b Study of Daratumumab in Combination with Pomalidomide and Dexamethasone in Patients with at Least 2 Lines of Prior Therapy and Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):508.
  37. Martin TG, Baz R, Benson DM, Lendvai N, Campana F, Charpentier E, et al. A Phase Ib Dose Escalation Trial of SAR650984 (Anti-CD-38 mAb) in Combination with Lenalidomide and Dexamethasone in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood*. 2014;124(21):83.
  38. Görgün G, Samur MK, Cowens KB, Paula S, Bianchi G, Anderson JE, et al. Lenalidomide Enhances Immune Checkpoint Blockade-Induced Immune Response in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(20):4607-18.
  39. Mateos M-V, Orłowski RZ, Siegel DSD, Reece DE, Moreau P, Ocio EM, et al. Pembrolizumab in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma (RRMM): Final efficacy and safety analysis. *ASCO Annual Meeting* 2016;34(15):8010.
  40. Badros AZ, Kocoglu MH, Ma N, Rapoport AP, Lederer E, Philip S, et al. A Phase II Study of Anti PD-1 Antibody Pembrolizumab, Pomalidomide and Dexamethasone in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2015;126(23):506.
  41. Garfall AL, Maus M V, Hwang W-T, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(11):1040-7.
  42. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*. 2016;127(26):3321-30.
  43. Gschwend E, De Oliveira S, Kohn DB. Hematopoietic stem cells for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev*. 2014;257(1):237-49.
  44. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-18.
  45. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2013;5(177):177ra38.
  46. Porter DL, Hwang W-T, Frey N V, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*. 2015;7(303):303ra139
  47. Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, Braylan R, Korde N, Manasanch E, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leuk Res*. 2014;38(3):371-6.
  48. Hajek R, Okubote SA, Svachova H. Myeloma stem cell concepts, heterogeneity and plasticity of multiple myeloma. *Br. J. Haematol*. 2013;163(5):551-564.
  49. Garfall AL, Stadtmauer EA, Maus M V, Hwang W-T, Vogl DT, Cohen AD, et al. Pilot Study of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells (CTL019) in Conjunction with Salvage Autologous Stem Cell Transplantation for Advanced Multiple Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2016;128(22):974.
  50. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell-maturation-antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(13):1688-700.
  51. Berdeja JG, Lin Y, Raje N, Siegel D, Munshi N, Turka A, et al. Clinical remissions and limited toxicity in a first-in-human multicenter study of bb2121, a novel anti-BCMA CART cell therapy for relapsed/refractory multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2016;69 (supplement 1):S5.
  52. Wijdenes J, Vooijs WC, Clément C, Post J, Morard F, Vita N, et al. A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol*. 1996;94(2):318-23.
  53. Heffner LT, Jagannath S, Zimmerman TM, Lee KP, Rosenblatt J, Lonial S, et al. BT062, an Antibody-Drug Conjugate Directed Against CD138, Given Weekly for 3 Weeks in Each 4 Week Cycle: Safety and Further Evidence of Clinical Activity. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012;120(21):4042.
  54. Garfall AL, Lancaster E, Stadtmauer EA, Lacey SF, Dengel K, Ambrose DE, et al. Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome (PRES) after Infusion of Anti-Bcma CAR T Cells (CART-BCMA) for Multiple Myeloma: Successful Treatment with Cyclophosphamide. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2016;128(22):5702.

## Parole Chiave

Mieloma multiplo, anticorpi monoclonali, CD38, immunoterapia cellulare adottiva e cellule CAR-T.

## Indirizzi per la corrispondenza

*Alessandra Larocca*

Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino, Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, Università di Torino, Via Genova, 3 - 10126 Torino, Italy.

# Leucemie acute infantili refrattarie



Andrea Biondi, Chiara F. Magnani, Sarah Tettamanti, Ettore Biagi

Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca, Fondazione MBBM / Osp. San Gerardo, Monza, Italy

## Introduzione

La leucemia è un disordine ematologico maligno che origina dall'anomala proliferazione di un singolo progenitore linfoide o mieloide. I blasti leucemici si accumulano nel midollo, nel sangue periferico, competendo con la normale ematopoiesi, e si disseminano in siti extra-midollari. La leucemia linfoblastica acuta (LLA) è una malattia relativamente rara: nei paesi sviluppati si registrano circa 2-4 nuovi casi ogni 100.000 persone. Rappresenta tuttavia la più frequente neoplasia in età pediatrica, infatti nel 60% dei casi viene diagnosticata prima dei 20 anni, con un picco di incidenza intorno ai 2-5 anni. Nonostante la sopravvivenza a 5 anni oggi superi l'85%, la LLA rimane la più frequente causa di morte nei bambini. La LLA è una malattia eterogenea e negli ultimi anni il miglioramento significativo dei tassi di cura deriva da una combinazione di:

- programmi di terapia efficace;
- scoperta delle lesioni genetiche sottostanti;
- valutazione puntuale della risposta clinica precoce;
- approccio che colloca i pazienti in differenti bracci di rischio con l'aumento progressivo dell'intensità della chemioterapia e del trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) <sup>(1,2)</sup>.

Il nostro gruppo ed i nostri collaboratori hanno dimostrato il ruolo prognostico del monitoraggio della malattia residua minima (MMR) nella LLA infantile <sup>(3-6)</sup>. Tuttavia, ancora il 15% dei pazienti ricade, con diminuita probabilità di cura.

Per quello che concerne la leucemia acuta mieloide (LAM), essa rappresenta circa l'80% di tutte le leucemie acute dell'adulto con un'incidenza media di 3,6 nuovi casi ogni 100.000 abitanti all'anno

in Europa e negli Stati Uniti. L'incidenza aumenta con l'età: pari a 1,7 nei soggetti con meno di 65 anni e raggiunge il 16,2 nei pazienti sopra i 65 anni. Nel bambino, la LMA conta circa 1/5 delle leucemie acute con un'incidenza di 2 nuovi casi ogni 1.000.000 bambini all'anno <sup>(7)</sup>. Nonostante l'utilizzo di approcci di chemioterapia più ponderati, dati dall'identificazione di nuove mutazioni molecolari che hanno quindi garantito una migliore stratificazione del rischio prognostico e nonostante i miglioramenti sul monitoraggio della MMR e nel HSCT, la sopravvivenza complessiva (*overall survival*, OS) della LMA rimane insoddisfacente. La OS a 5 anni risulta infatti pari al 26% negli adulti e del 65% in pazienti pediatrici di età inferiore ai 15 anni.

All'attuale stato dell'arte, un ulteriore aumento del tasso di cura della leucemia infantile non è concepibile semplicemente attraverso un aumento della dose di chemioterapia senza incorrere nell'aumentare della comorbilità e mortalità dovuta alla tossicità e senza il rischio di effetti dannosi a lungo termine. Pertanto, esiste una urgente necessità di migliorare ulteriormente la stratificazione dei pazienti, individuando alterazioni genetiche specifiche del paziente (profilo genomico) che possano essere utilizzate sia come nuovi biomarker per quantificare il rischio di recidiva, sia come target per nuove terapie <sup>(8)</sup>. Oltre ai nuovi *small molecules inhibitors* <sup>(9)</sup>, l'immunoterapia basata su anticorpi monoclonali (mAb) e strategie basate su cellule linfocitarie antitumorali potenziate tramite la terapia genica <sup>(10-12)</sup> hanno dimostrato di essere riusciti a migliorare la sopravvivenza globale dei pazienti con leucemia e linfoma. In questo lavoro, l'attenzione sarà focalizzata sui linfociti ingegnerizzati mediante recettori chimerici antigenici o artificiali (CAR).

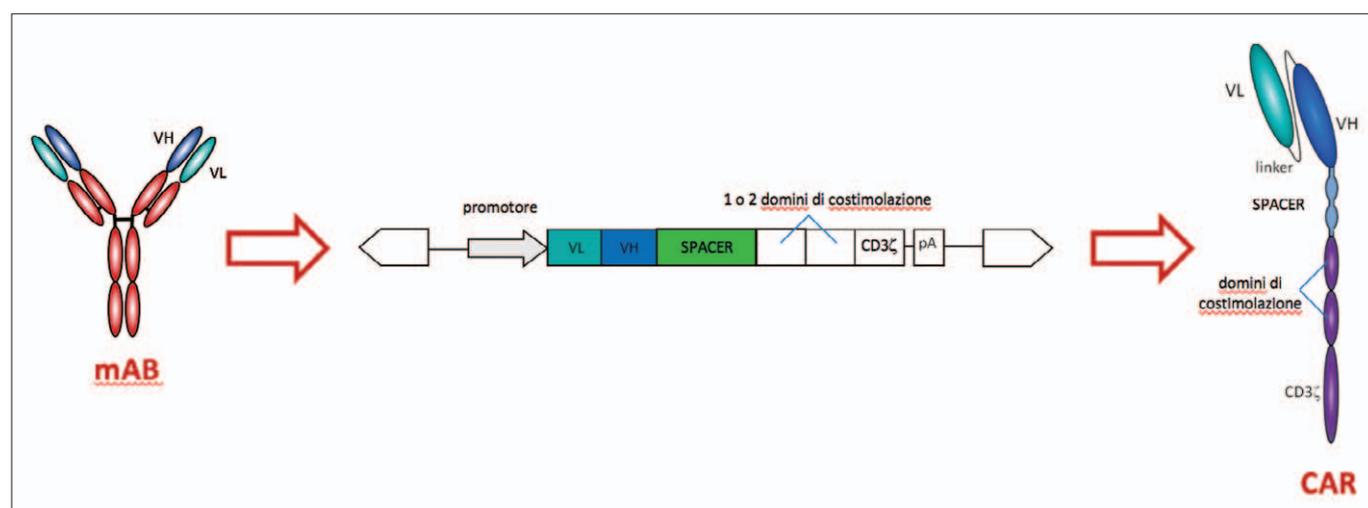
Le molecole CAR sono state progettate fondendo in un unico recettore artificiale il dominio legante dell'antigene di un anticorpo monoclonale sotto forma di un frammento di *single-chain variable* (scFv) con un dominio di trasduzione del segnale, di solito la catena zeta del TCR e di altre molecole costimolatorie <sup>(13)</sup>. Il principale vantaggio dell'utilizzo di CAR si basa sulla possibilità di creare un recettore universale diretto contro una molecola specifica riconosciuta in maniera non ristretta dal concomitante legame delle molecole MHC, superando pertanto uno dei più comuni sistemi di evasione immunitaria nel cancro, rappresentato proprio dalla ridotta o mancata espressione delle molecole MHC. In secondo luogo, contrariamente al TCR transgenico per il quale il riconoscimento è limitato ad un singolo aptotipo MHC, le cellule CAR possono essere potenzialmente utilizzate per il trattamento di tutti i pazienti. Inoltre, la gamma di antigeni riconoscibili da CAR non è limitata agli antigeni proteici, ma anche agli antigeni derivanti da glicolipidi e carboidrati. Pertanto, tutti gli antigeni associati a tumori espressi sulla superficie cellulare possono rappresentare virtualmente un bersaglio potenziale per i CAR <sup>(14)</sup> (Figura 1).

## Immunoterapia anti LLA attraverso i CAR

I pazienti con LLA a precursori B (BCP-LLA) refrattari/recidivati (r/r) sono ancora difficili da curare con le chemioterapie standard, rappresentando una domanda clinica non ancora risolta sia nei bambini che in particolare negli adulti che hanno mostrato la prognosi più severa. In questo contesto, l'immunoterapia ha rappresentato una fonte di trattamenti innovativi, a partire dai primi tentativi di generare vaccini contro il cancro (immunoterapia attiva) e linee cellulari autologhe o allogene (CTL), fino agli ultimi sviluppi dei mAb e delle cellule linfocitarie geneticamente modificate.

Gli approcci più efficaci nell'immunoterapia delle LLA sono rappresentati da mAbs di ultima generazione e da cellule T modificate da recettori chimerici. L'uso di mAbs per il trattamento della LLA di tipo B è diventato recentemente una strategia altamente promettente. Allo stesso tempo, i progressi nella tecnologia di trasferimento genico hanno offerto nuovi strumenti per migliorare le risposte antitumorali delle cellule immunitarie in vivo, dopo modificazione con recettori cellulari T artificiali (TCR) e CAR.

Le cellule T ingegnerizzate con molecole CAR possono essere generate per trattare una malattia come la B-LLA che esprime un ampio spettro di antigeni potenzialmente bersagliabili. I CAR di prima generazione sono stati concepiti per conferire un'unica unità di segnale, fornendo il segnale 1 per l'attivazione delle cellule T, di solito derivato dalla catena zeta del CD3 <sup>(15)</sup>. Una volta introdotte nelle cellule T, i CAR di prima generazione sono quindi in grado di produrre risposte citotossiche antitumorali iniziali, associate tuttavia ad una sola transitoria divisione delle cellule T e ad una secrezione di citochine subottimale, in modo da non consentire una espansione cellulare prolungata ed una risposta antitumorale sostenuta *in vivo*. Le stesse limitazioni sono state recentemente riportate nel primo studio europeo di fase I del CAR anti-CD19 del Consorzio Europeo *Childhope* <sup>(16)</sup>, utilizzando cellule T-virus specifiche contro il virus Epstein-Barr (EBV CTL) trasdotte con un CD19-CAR di prima generazione in pazienti pediatriche affetti da BCP-LLA. Lo studio ha voluto dimostrare che la vaccinazione diretta contro il virus EBV poteva migliorare l'espansione e la persistenza cellulare. L'espansione delle CTL CD19-CAR-positive è stata scarsa e la persistenza è stata incrementata solo dalla vaccinazione. Questo studio ha dimostrato la fattibilità di eseguire uno studio multicentrico utilizzando la terapia con cellule T CAR-positive e la possibi-



**Figura 1** - Recettori chimerici artificiali (CAR): i CAR sono molecole sviluppate a partire dalla sequenza di un anticorpo monoclonale, fondendo il dominio variabile della catena leggera (VL) e il dominio variabile della catena pesante (VH) dell'anticorpo stesso con un dominio di trasduzione del segnale, solitamente la catena  $\zeta$  del CD3 e 1/2 molecole costimolatorie, attraverso tecniche di biologia molecolare. mAB: anticorpo monoclonale; Spacer: dominio spaziatore; pA: sequenza di poliadenilazione; linker: linker flessibile che fonde VL e VH in un frammento di *single-chain variable* (scFv).

lità di aumentare la persistenza tramite vaccinazione virus-specifica. Gli studi successivi hanno definito che la piena attivazione e proliferazione delle cellule T richiede la presenza del segnale 2, che viene fornito da un segnale co-stimolatorio, come l'interazione CD28-B7. L'aggiunta di CD28 in un CAR di seconda generazione determina una proliferazione persistente ed una maggiore secrezione di citochine IL-2 e IFN- $\gamma$  <sup>(17)</sup>. I CAR di seconda generazione sono ad oggi utilizzati come trattamento avanzato per la leucemia linfatica cronica (LLC) recidivata e refrattaria, la B-LLA, linfomi CD19-positivi e mieloma multiplo <sup>(18-20)</sup>. A questo proposito, il trattamento dei pazienti con CD19-CAR ha portato alla regressione del tumore e, nella maggior parte dei pazienti, alla remissione completa che è stata associata con la persistenza di cellule T modificate circolanti, *trafficking* verso i siti tumorali ed attività antitumorale non HLA-ristretta. Attualmente, l'eradicazione osservata delle neoplasie delle cellule B dipende innanzitutto dal *targeting* specifico delle molecole CD19, essendo altamente espresse sulla grande maggioranza dei cloni leucemici e limitate alla popolazione delle cellule B. L'assenza di espressione di CD19 su altri tessuti garantisce la sicurezza di questo approccio, con l'unico effetto collaterale *on-target* di determinare aplasia della linea B normale, facilmente gestibile attraverso la somministrazione endovenosa di immunoglobuline <sup>(21)</sup>.

Nello studio dell'NCI sull'uso di CAR-T anti-CD19 [*ClinicalTrials.gov identifier*: NCT01593696], bambini, adolescenti e giovani adulti con malattie r/r CD19 B-positive sono stati trattati con CAR-T anti-CD19 usando un classico schema di *dose escalation* <sup>(20)</sup>. Un totale di 19 dei 21 pazienti arruolati ha ricevuto la dose cellulare prescritta. La dose massima tollerata (MTD) è stata definita come  $1 \times 10^6$  CD19-CAR-T/kg di peso corporeo. Sono state anche riportate diverse tossicità legate al trattamento, compatibili con una sindrome da rilascio di citochine (CRS) che si è verificata nel 14% dei pazienti. L'analisi *intent-to-treat* ha dimostrato risposta completa in 14 dei 21 pazienti (67%) a 28 giorni dopo l'infusione di cellule CD19-CAR. Un totale di 12 dei 20 pazienti BCP-LLA (60%) ha ottenuto remissione molecolare MMR-negativa. Di questi 12 pazienti, 10 sono stati quindi sottoposti a HSCT allogenico e sono rimasti in remissione MMR-negativa ad un anno dopo il trattamento cellulare. Gli altri 2 pazienti, che non hanno subito HSCT, sono ricaduti con BCP-LLA con perdita del target di superficie CD19 (*antigen loss*). Gli studi clinici del gruppo dell'università di Pennsylvania con uso di CAR-T anti-CD19 (CTL019) [*ClinicalTrials.gov identificativo* NCT01626495, NCT01029366] hanno pubblicato i risultati di studi di fase I di cellule T trasdotte con vettori lentivirali con CD3 $\zeta$  e 4-1BB (CD137) in 30 bambini e adulti con malattie r/r a cellule B <sup>(18, 22)</sup>. In questo studio, 27 dei 30 pazienti (90%) hanno ottenuto una remissione morfologica completa (RC) ad un mese dal trattamento con un tasso di RC dell' 82% in bambini e adulti con elevati livelli di malattia. Lo stato di remissione

è stato riesaminato in tutti i pazienti a 6 mesi dopo l'infusione delle cellule T con una sopravvivenza senza eventi (EFS) del 67% e sopravvivenza globale del 78%. Tutti i pazienti trattati hanno presentato segni clinici di CRS (ad esempio, febbre e ipotensione). Gli stessi autori ed altri hanno proposto che forme di CRS gravi possano essere gestite in sicurezza in alcuni pazienti con il trattamento a base di tocilizumab, un anticorpo monoclonale contro il recettore anti-IL-6 <sup>(22, 23)</sup>. Un totale di 13 pazienti ha anche presentato una disfunzione neurologica transitoria. Attualmente Novartis ha concluso uno studio internazionale di fase 2 i cui risultati preliminari sono stati presentati al congresso americano ASH 2016: su un totale di 62 pazienti trattati (età media di 12 anni), è stata calcolata una sopravvivenza senza recidiva del 60% a 6 mesi <sup>(24)</sup>.

I gruppi della *University of Washington/Seattle Children's Hospital* e del *Fred Hutchinson Cancer Research Center* [*ClinicalTrials.gov identifier*: NCT0202845 e NCT01475058] hanno realizzato due altri interessanti studi. La fase I di sperimentazione del *Seattle Children's Hospital* ha cercato di determinare la fattibilità dei prodotti CD19-CAR-T di composizione CD4:CD8 definita e con espressione definita del trasgene CAR-CD19 in bambini e in giovani adulti con recidiva di BCP-LLA <sup>(25)</sup>. Un totale di 45 pazienti è stato arruolato, di cui l'89% ha ottenuto una remissione molecolare con MMR <0,01%. Una fase di sperimentazione di fase I/II di cellule CD19-CAR-T in adulti con malattie a cellule B, incluse le BCP-LLA, ricadute dopo l'HSCT, è in corso anche presso il *Fred Hutchinson Cancer Research Center* <sup>(26)</sup>. Un totale di 27 su 29 di questi pazienti (93%) ha raggiunto una RC morfologica e molecolare.

## Immunoterapia anti-LMA attraverso i CAR

Nell'ultimo decennio, nuove scoperte nella biologia della LMA hanno suggerito che le alte percentuali di ricaduta (intorno al 50-60%) siano da correlare alla presenza di cellule leucemiche staminali (*leukemic stem cells*, LSCs) residue post-remissione. Le LSCs infatti, avendo caratteristiche di quiescenza e *self-renewal*, sarebbero resistenti ai farmaci chemioterapici, funzionali solo in cellule in attiva proliferazione, determinando quindi una rigenerazione della malattia <sup>(27)</sup>. In questo scenario, lo sviluppo di terapie innovative vede come sfida principale la capacità di eradicare la malattia, tramite *targeting* specifico delle LSCs al fine di prevenire un'evoluzione clonale e/o la sopravvivenza delle cellule leucemiche. L'identificazione di un antigene di superficie ideale, altamente espresso sulle cellule tumorali ma minimamente espresso dai tessuti sani, rappresenta uno dei requisiti fondamentali nella progettazione di una strategia immunoterapeutica sicura ed efficace per la LMA. I principali antigeni LMA associati identificati negli ultimi anni e oggetto di *targeting* specifico, anche delle LSCs, tramite diversi approcci immunoterapeutici sono rappresentati da: CD33, CD123, CD44v6, LeY, CD47, CD96, TIM-3, MUC-1, WT-1, CD32, CD25, CD64 <sup>(28)</sup>.

Per alcuni di questi bersagli sono stati sviluppati CARs ed alcuni hanno già raggiunto la clinica. Dal momento che non sono stati descritti fino ad oggi degli antigeni LMA-specifici, è stata riposta molta attenzione nell'identificazione di antigeni LMA-associati (*tumor-associated antigens*, TAA) che fossero altamente espressi dalle cellule leucemiche mieloidi e poco espressi dai tessuti sani. Pertanto, dato il rischio di autoreattività contro i tessuti normali esprimenti l'antigene bersaglio, risulta imperante la necessità di effettuare degli adeguati studi di preclinica, volti non solo alla caratterizzazione del profilo di efficacia, ma anche del profilo di sicurezza delle cellule CAR-T anti-LMA. Ad oggi, solo per alcuni di questi TAA sono stati avviati degli studi clinici al fine di valutare la fattibilità e l'efficacia di cellule T ingegnerizzate tramite CAR, in particolare contro gli antigeni Lewis Y (LeY) e CD33. Tuttavia, dati preliminari hanno evidenziato problemi di efficacia e sicurezza, evidenziando la necessità di un'ulteriore valutazione per una corretta applicazione clinica di questa strategia <sup>(29, 30)</sup>.

L'antigene LeY (CD174) è un antigene difucosilato oligosaccaridico del sangue con funzione sconosciuta, la cui espressione è stata documentata su una vasta gamma di malattie, tra cui la LMA. Tuttavia, l'espressione di LeY sul normale compartimento cellulare è stata riportata sui neutrofili maturi, ma su cellule CD34<sup>+</sup>, pur essendo assente nei normali linfociti T circolanti e nelle cellule B e T maligne. Quattro pazienti con LMA r/r LeY-positiva sono stati trattati in uno studio di fase I con cellule T modificate con un LeY-CAR di seconda generazione dopo un regime di condizionamento con fludarabina. Anche se due dei quattro pazienti hanno sperimentato una temporanea riduzione della MMR, tutti i pazienti sono ricaduti. Sono state osservate una leggera espansione e persistenza di cellule LeY-CAR-T, unitamente a livelli di espressione limitata di CAR (dal 14 al 38%). Per quanto riguarda la tossicità del trattamento LeY-CAR-T, si sono verificati modesti eventi avversi, riportati come neutropenia lieve, risolti spontaneamente in un solo paziente. Non è stata rilevata una down-modulazione dell'antigene LeY dopo l'infusione delle cellule LeY-CAR-T, suggerendo che questo antigene potrebbe anche essere adatto per un controllo a lungo termine della malattia. Inoltre, le cellule LeY-CAR-T sono state individuate sia all'interno del midollo osseo che in altri siti di malattia, evidenziando la possibilità da parte di queste cellule di colpire la malattia sia a livello centrale che periferico. Tuttavia, la buona tolleranza osservata nei confronti delle cellule LeY-CAR-T può essere attribuibile alla modesta espansione e persistenza delle cellule, suggerendo una valutazione più attenta dei potenziali effetti secondari derivanti dal *targeting* di LeY su cellule sane. Questo problema è particolarmente importante, dal momento che eventi avversi gravi (*serious adverse events*, SAE) sono stati segnalati in passato utilizzando i CARs. Un SAE estremamente dannoso è rappresentato dal riconoscimento di linfociti CAR-T da parte di cellule normali espi-

menti bassi livelli dell'antigene target, attraverso il noto effetto *on target-off tumor*. La sua gravità dipende dal fatto che il *targeting* dell'antigene scelto possa essere tollerato o meno dall'organismo, con risultati completamente diversi, come nel caso di aplasia delle cellule B dopo l'infusione di cellule T anti-CD19 CAR o la morte dei pazienti trattati con i CAR anti-ErbB2 e -CAIX <sup>(31, 32)</sup>. Infatti, le cellule T reindirizzate con i CAR hanno un effetto superiore rispetto ai mAbs da cui sono stati ricavati gli stessi CAR, indicando che il confronto tra mAbs già utilizzati in clinica e i CAR non è predittivo rispetto ai potenziali effetti dannosi che possono derivare dall'infusione di cellule CAR-T nei pazienti <sup>(33)</sup>.

Questo concetto è particolarmente importante quando si tratta di antigeni LMA-associati la cui espressione è condivisa da cellule mieloidi normali, come nel caso dell'antigene CD33 (SIGLEC-3), un recettore transmembrana appartenente alla famiglia SIGLEC, espresso da progenitori ematopoietici, precursori mielomonocitici e monociti del sangue, ma anche su alcune cellule linfoidi e macrofagi tissutali, come le cellule di Kupffer <sup>(34)</sup>. Tuttavia, l'overespressione di CD33 sui blasti di LMA e sulle LSCs lo ha reso un buon candidato per il *targeting* CAR-mediato, come è stato dimostrato pre-clinicamente dal nostro gruppo e da altri, sia *in vitro* che *in vivo* <sup>(35, 36)</sup>. Inoltre, è stato di recente descritto un caso di un paziente di 41 anni con LMA refrattaria trattato con cellule killer indotte da citochine (*Cytokine Induced Killer cells* - CIK) autologhe reindirizzate per l'anti-CD33 CAR. Dopo un periodo di coltura di 13 giorni, le cellule CAR-CIK anti-CD33 sono state infuse in un numero totale di  $1.12 \times 10^9$ , senza alcun regime di condizionamento e con una percentuale di CAR intorno al 40%. Nella fase iniziale del trattamento è stata osservata una marcata riduzione della malattia, suggerendo quindi una potente attività citotossica delle cellule CAR-CIK anti-CD33 contro i blasti di LMA anche se, in assenza di una franca risposta clinica, non sono stati registrati eventi di tossicità gravi in seguito all'infusione delle cellule CAR-T, incoraggiando quindi ulteriormente il proseguimento dell'applicazione di questo approccio per il trattamento della LMA. L'unico effetto di tossicità documentato è stato rappresentato da un CRS caratterizzato da febbre alta, a causa del rilascio di livelli elevati di IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  nella fase iniziale dopo l'infusione delle cellule. Nonostante nel primo paziente trattato non siano stati riportati effetti di *on target-off tumor*, la possibilità di provocare una mielotossicità significativa non può ancora ad oggi essere esclusa. Pertanto, tra le strategie più attuali disponibili per limitare e/o gestire gli effetti collaterali correlati alle cellule CAR-T, il gruppo di Kenderian et al. <sup>(34)</sup> ha sviluppato un sistema di espressione transiente del CAR sulle cellule T, tramite elettroporazione di mRNA CAR anti-CD33-41BB, al fine di minimizzare il rischio di mieloablazione a lungo termine.

Un altro antigene adatto per il *targeting* della LMA è rappresentato

dal CD123, la subunità  $\alpha$  del recettore dell'interleuchina-3 (IL-3R), che lega l'IL-3 a bassa affinità e insieme alla subunità  $\beta$  (CD131) forma il complesso eterodimerico funzionale ad alta affinità. Il CD123 è overespresso sia sui blasti leucemici che sulle LSCs nel 75-89% dei pazienti con LMA, ma anche in altre malattie ematologiche quali la LLA<sup>(36)</sup>, risultando così un attraente antigene bersaglio da considerare per strategie immunoterapeutiche tramite CAR-T. Inoltre, è stata osservata una correlazione significativa tra i livelli di CD123 e il numero di blasti leucemici alla diagnosi, associandosi così ad una prognosi negativa<sup>(37)</sup>. Per quanto riguarda l'espressione di CD123 sui tessuti sani, la molecola risulta espressa ad alti livelli dalle cellule dendritiche plasmacitoidi, mentre è espressa a bassi livelli da monociti, eosinofili, cellule endoteliali e cellule dendritiche mieloidi. Negli ultimi anni il nostro gruppo e altri ricercatori hanno dimostrato l'effettiva funzionalità antileucemica sia *in vitro* che *in vivo* di cellule T reindirizzate con CARs anti-CD123 di seconda e terza generazione<sup>(38, 39)</sup>. Tuttavia, in alcuni modelli sono stati segnalati effetti citotossici da parte di cellule CAR-T anti-CD123 anche nei confronti del compartimento ematopoietico normale, come nel caso della grave compromissione dell'ematopoiesi normale nei topi NSG, impiegando cellule epatiche fetali CD34<sup>+</sup> come fonte di HSC umane<sup>(40)</sup>.

Questi dati preclinici hanno evidenziato la necessità di adottare adeguate strategie di salvataggio per poter utilizzare in clinica cellule CAR-T anti-CD123. A questo proposito, il gruppo di Lihua Budde (*City of Hope*) sta attualmente reclutando pazienti in uno studio di fase I che prevede l'uso di cellule T autologhe modificate con un CAR anti-CD123 in seguito a trattamento linfodepletante in pazienti con LMA refrattaria o in ricaduta (NCT02159495). In questo studio, le cellule CAR-T anti-CD123 saranno utilizzate come terapia di salvataggio, concepite come strategia di *bridge to transplant*. Sono recentemente emerse varie sfide nel settore dei CAR, come la necessità di un rispetto più rigoroso ma meno oneroso dal punto di vista dei costi, delle norme sulle buone pratiche di fabbricazione GMP (principalmente usando metodi di trasduzione non virali), l'urgente necessità di affrontare meccanismi di *immune evasion* quali *antigen loss*, e più ampiamente il concetto di down-modulazione immunitaria associata al cancro, che può compromettere l'efficacia a lungo termine delle cellule T che esprimono CAR.

## Nuovi sviluppi clinici

L'esperienza clinica descritta nei capitoli precedenti, seppur di difficile generalizzazione a causa dell'uso di protocolli diversi, del ristretto numero di pazienti e del breve follow up, ha chiaramente dimostrato l'efficacia di queste terapie contro i tumori ematologici soprattutto nel contesto delle LLA a cellule B.

Ci sono però ancora molti aspetti da implementare e da chiarire prima che queste terapie possano entrare a far parte dell'armamen-

tario contro i tumori ematologici, e magari anche contro altri tumori. Prima di tutto bisogna ridurre la tossicità, che è correlata all'efficacia della terapia ed è dovuta alla lisi delle cellule leucemiche ed al massiccio rilascio da parte delle cellule CAR-T e dei monociti/macrofagi di citochine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6). Questo fenomeno causa la CRS, che nei casi più gravi porta ad insufficienza multiorgano, vasculopatie, e morte, e che necessita di terapia intensiva. Al momento il blocco del recettore per l'IL-6 tramite la somministrazione degli anticorpi monoclonali tocilizumab e siltuximab è uno dei trattamenti di scelta per la CRS severa; inoltre molti team di ricerca hanno stabilito degli algoritmi di trattamento della CRS<sup>(41)</sup>. L'altro grave effetto collaterale è la neurotossicità, dovuta forse all'infiltrazione del cervello da parte delle cellule CAR-T, che porta ad encefalopatia, confusione e delirio. Considerando in particolare la CRS e la neurotossicità, essendo fortemente correlate all'efficacia, il bilancio delle variabili di efficacia e sicurezza non è sempre praticabile visto che la riduzione di tali effetti collaterali può fortemente impattare sul raggiungimento della remissione<sup>(23)</sup>. Inoltre, per rendere la terapia mediata da cellule CAR-T accessibile a una popolazione più ampia, è necessario affrontare ulteriori sfide. Il processo di manifattura risulta essere eccessivamente complesso, non sempre completamente automatizzato, e composto da un numero elevato di passaggi che impattano anche sulla tempistica di ottenimento del prodotto cellulare finale. A questo si aggiunge il fatto che le cellule CAR-T appartengono alla categoria dei prodotti medicinali di terapia genica, con criteri di adeguamento a regimi GMP molto stringenti<sup>(42)</sup>. In questo contesto, gli aspetti regolatori spesso differiscono da un paese all'altro, rendendo necessario un processo di armonizzazione delle linee guida<sup>(43)</sup>.

Gli aspetti di qualità da considerare durante il processo di produzione di medicinali contenenti cellule geneticamente modificate e volti all'uso clinico sono definiti nelle linee guida EMA ed FDA. Tale processo include principalmente quattro fasi:

- produzione del vettore;
- raccolta ed isolamento delle cellule;
- trasduzione delle cellule;
- espansione delle cellule trasdotte.

Ognuna di queste fasi deve soddisfare i rispettivi requisiti di qualità di una terapia cellulare somatica, di una terapia genica, e di una terapia con cellule geneticamente modificate, e deve essere descritta in dettaglio, inclusi i materiali di partenza. L'intero processo di produzione deve essere poi validato, bisogna cioè dimostrare la riproducibilità del processo e la consistenza fra i diversi lotti di produzione tramite una serie di saggi molecolari, biologici ed immunologici volti a caratterizzare e controllare i prodotti intermedi ed il prodotto finale (Tabella 1). Devono essere quindi descritti i criteri di rilascio del prodotto finale per l'impiego clinico, cioè quali caratteristiche (ed i relativi test per quantificarle) sono necessarie per dimostrare l'assenza di

contaminanti (sicurezza) e la presenza, in percentuale consistente, delle cellule geneticamente modificate (identità e purezza) e della loro attività biologica (potenza). I risultati di questi test faranno parte del certificato di analisi del prodotto finale. Un esempio di test di rilascio per le cellule CAR-T è riportato in Tabella 2.

Infine, devono essere descritte le condizioni di conservazione del prodotto, che essenzialmente riguardano la criopreservazione, prima dell'uso clinico.

Sterilità
Identità, potenza, purezza e vitalità delle cellule trasdotte
Stabilità del prodotto finale a determinate modalità di conservazione (tempo, temperatura, etc)
Presenza di virus ed altri agenti avventizi
Presenza di vettori virali, virus replicazione-competenti o di trasposoni
Rilascio del vettore da parte delle cellule trasdotte
Efficienza della trasduzione e qualità delle molecole espresse dal transgene
Integrità del transgene
Numero di copie del vettore/plasmide per cellula

**Tabella 1** - Aspetti da valutare nella validazione del processo di produzione di un prodotto medicinale contenente cellule geneticamente modificate, come indicato nelle linee guida EMA.

<b>Identità</b> - Fenotipo: $\geq 80-90\%$ CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> al citofluorimetro
<b>Purezza</b> - Vitalità: $\geq 70-80\%$ cellule vitali - Fenotipo: $\leq 2-5\%$ CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> al citofluorimetro
<b>Potenza</b> - Citotossicità/rilascio di citochine verso le cellule presentanti l'antigene bersaglio del CAR - Espressione del CAR: $\geq 2-20\%$ cellule CAR <sup>+</sup> al citofluorimetro
<b>Sicurezza</b> - Sterilità - Endotossine: $< 0.5-2.5$ EU/ml - Negatività al micoplasma - Corrispondenza HLA fra donatore e prodotto finale (per evitare cross-contaminazione) - Assenza di virus replicazione-competenti - Vector Copy Number: $\leq 2-5$ copie per cellula

**Tabella 2** - Test di rilascio standard per le cellule CAR-T richiesto dall'FDA. L'FDA potrebbe richiedere test aggiuntivi in casi particolari.

La maggior parte degli studi clinici condotti finora ha utilizzato come materiale di partenza, soggetto a ingegnerizzazione genica, linfociti autologhi collezionati attraverso leucoferesi. Tale possibilità permette di poter preparare cellule CAR-T sia in fase pre-trapianto per pazienti refrattari che per pazienti recidivati post-HSCT. Tuttavia, il processamento delle aferesi può risultare in un processo lungo e costoso e, inoltre, la qualità dei linfociti collezionati può essere influenzata dai precedenti trattamenti chemioterapici e dall'ambiente immunosoppressivo associato alla crescita tumorale. Un'alternativa alle cellule derivate dal paziente può essere rappresentata da sangue periferico derivato dal donatore del trapianto che viene fornito dal centro di origine del donatore, vale a dire il centro trapianto per donatori familiari o il registro per donatori non correlati. In tal caso la procedura di leucoferesi non è essenziale per ottenere un numero sufficiente di cellule. Tuttavia, i prodotti allogeni hanno come maggiore limite il rischio di risposta immunitaria contro le cellule e i tessuti del destinatario, che determina la malattia del trapianto contro l'ospite (*Graft versus Host Disease*, GvHD), mediata soprattutto dal riconoscimento degli antigeni del destinatario da parte dei recettori delle cellule T (*T Cell Receptor*, TCR). Pertanto, la preoccupazione di indurre GvHD acuta ha indotto la maggior parte degli investigatori a preferire l'approccio autologo. Preliminari studi clinici con cellule CAR-T derivate da donatore post-trapianto hanno mostrato una insorgenza limitata di GvHD. Tuttavia tali sperimentazioni sono state condotte in assenza della pratica di linfodeplezione pre-infusione, che negli studi clinici con cellule derivate da pazienti favorisce l'attecchimento e l'attività delle cellule ingegnerizzate, e hanno mostrato una limitata persistenza delle cellule CAR-T<sup>(44-46)</sup>. Per ridurre ulteriormente il rischio di alloreattività, sono state recentemente ipotizzate l'eliminazione del TCR attraverso *nucleasi Zn-finger* in cellule CAR-T sviluppate con trasposone *Sleeping Beauty* (SB)<sup>(47)</sup>, l'inserimento del gene CAR all'interno del *locus TCR alpha chain* usando una nucleasi ingegnerizzata e un vettore adenovirale<sup>(48)</sup>, il *targeting* del gene CAR nel *locus TRAC* attraverso CRISPR/Cas9 *gene editing*<sup>(49)</sup>.

Tuttavia, lo sviluppo e la traslazione clinica di cellule CAR-T universali da utilizzare in destinatari completamente incompatibili richiedono un processo accurato e complesso per rimuovere strettamente le cellule TCR<sup>+</sup> residue, in quanto meno dell'1% di cellule TCR<sup>+</sup> residue costituisce comunque un rischio di insorgenza di eventuali GvHD<sup>(50)</sup>.

Un ulteriore approccio in questo senso può essere la scelta di popolazioni di cellule T alternative. Esemplicativo è l'utilizzo di CIK alternativamente a cellule CAR-T standard, il cui razionale deriva da svariate esperienze cliniche che dimostrano chiaramente come infusioni ripetute di cellule CIK allogene in pazienti siano sicure e ben tollerate con GvHD minima e gestibile<sup>(51)</sup>. L'uso di cellule CIK come popolazione T effettrice è supportato dalla loro potente

attività citotossica e dalla fattibilità di un protocollo validato di grado clinico che promuove un'espansione cellulare rapida *ex vivo* in condizioni GMP, incoraggiando una rapida trasferibilità di tale popolazione all'intervento clinico. Il nostro gruppo è stato tra i primi a esplorare le proprietà *in vitro* e *in vivo* di cellule CIK reindirizzate dai CAR nei contesti sia della LLA che della LMA, sfruttando sia la manipolazione virale che non virale con CAR di terza generazione contro gli antigeni CD19, CD123 e CD33<sup>(11, 12, 39, 52, 53)</sup>. Attualmente, le cellule CAR-T utilizzate in studi clinici sono principalmente trasdotte con vettori lentivirali (LV) o retrovirali (RV). Pur essendo un processo laborioso, la costruzione di vettori RV è altamente standardizzata<sup>(54, 55)</sup>. Al contrario, l'uso di vettori LV, che hanno il vantaggio di infettare anche cellule non proliferanti, sfrutta processi lunghi e non sempre economicamente sostenibili<sup>(56)</sup>. Altri vettori sono di origine non virale, quali i trasposoni, che sono stati recentemente convalidati per il trattamento di malattie oncologiche a cellule B<sup>(57, 58)</sup>. I trasposoni sono elementi mobili presenti naturalmente nel genoma, che comprendono sequenze di DNA che possono muoversi da una posizione all'altra all'interno del genoma di una singola cellula. La maggior parte delle famiglie di trasposoni a DNA ha un elemento che codifica un gene trasposasi fiancheggiato da sequenze terminali invertite ripetute (ITR). La trasposasi riconosce e lega gli elementi incorporati nelle ITR, catalizza l'excisione dell'elemento trasposone dalla sua posizione originale e lo integra in un'altra posizione. La sequenza del DNA viene inserita senza la necessità di omologia di sequenza. Partendo dai genomi salmonidi, il sistema trasposone *Sleeping Beauty* (SB) è stato sviluppato con tecniche di ingegneria inversa<sup>(59)</sup>.

Il sistema vettoriale trasposone SB è costituito da due componenti fondamentali: il plasmide di trasferimento, incluse le sequenze del transgene affiancate da ITR, e la trasposasi sintetica in un sistema con due plasmidi separati. La modifica genetica avviene attraverso un dispositivo elettroporatore. Al fine di fornire un'alternativa valida ai vettori virali e a cellule del CAR-T derivate dal paziente, attualmente limitate a pochi centri specializzati e ad un numero limitato di pazienti, il nostro gruppo ha recentemente sviluppato una piattaforma GMP che utilizza un vettore non virale trasposone per ingegnerizzare cellule CIK anti-LLA (target CD19) e anti-LMA (target CD123) a partire da cellule da donatori<sup>(11)</sup>. Quindi, abbiamo condotto una validazione preclinica del prodotto cellulare CARCIK-CD19, che consiste in cellule CIK da donatore ingegnerizzate con sistema *Sleeping Beauty* per esprimere un CAR anti-CD19, per verificare l'ipotesi che possa aumentare la risposta al tumore in pazienti di LLA post-HSCT. Usando modelli di malattia, abbiamo dimostrato che cellule CARCIK-CD19 esplicano attività antitumorali in modo dose-dipendente e persistono *in vivo*. Inoltre, nessuna tossicità è stata osservata in studi di biodistribuzione e tossicità svolti in GLP<sup>(60)</sup>.

Studi clinici verificheranno se una singola infusione di CARCIK allogeneiche sia un trattamento sicuro ed efficace in pazienti adulti e pediatrici di LLA o LMA post HSCT. Si ipotizza che CARCIK possa offrire un'alternativa valida e sostenibile all'approccio virale con cellule derivate da paziente e una maggiore durata di risposta rispetto alle terapie attuali in questa categoria di pazienti. Potenziali vantaggi in termini di produzione e sicurezza potrebbero essere raggiunti dal nostro approccio. Innanzitutto, il processo di produzione cellulare è semplice, non virale e conveniente. Essendo un prodotto allogeneico, CARCIK può anche essere utilizzato in pazienti linfodepleti. Considerando l'aspetto della sicurezza, non ci aspettiamo di vedere esacerbazione o insorgenza di GvHD a causa delle caratteristiche intrinseche ampiamente descritte delle cellule CIK di essere molto debolmente alloreattive, come dimostrato da noi e da altri gruppi<sup>(61)</sup>. Considerando il profilo di integrazione di SB, più sicuro dei vettori virali e la bassa suscettibilità delle cellule T differenziate alla trasformazione, si prevede massima sicurezza in termini di genotossicità per i CARCIK.

## Nuove prospettive di sviluppo preclinico

Il concetto di bersagliare più di un antigene rappresenta una delle più recenti aree di ricerca preclinica, allo scopo di affrontare la problematica della recidiva di malattia determinata dalla perdita dell'antigene target o *antigen loss*. Infatti, una limitazione emersa nella clinica dei CAR con specificità per un solo antigene è rappresentata da meccanismi di evasione tumorale principalmente dovuti ad una forte pressione selettiva immunologica determinante la perdita dell'antigene target dalla superficie del tumore. Emblematica in questo contesto è l'esperienza riportata nell'ambito del *targeting* del CD19, in cui sono stati riportati più del 30-45% di recidive con perdita di antigene CD19 dovuta a diversi meccanismi fra cui:

- l'emergenza di varianti di *splicing* alternative originanti una proteina CD19 mancante dell'epitopo riconosciuto dalla scFv del CAR<sup>(62)</sup>;
- *switch* della leucemia da linfoide a mieloide in pazienti con LLA riarrangiata per il gene MLL (*mixed lineage leukemia*)<sup>(63)</sup>;
- sopravvento di una rara popolazione leucemica CD19 negativa preesistente<sup>(64)</sup>.

Oltre all'antigene CD19, altri marcatori pan-B sono stati proposti come potenziali bersagli per sviluppare approcci di terapia combinata, fra cui CRLF2<sup>(65)</sup>, CD20 e CD22<sup>(66)</sup>, ROR1 (*inactive tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1*)<sup>(67)</sup>, CD30 e Ig kappa ( $\kappa$ ) light chain (NCT01192464<sup>(68, 69)</sup>). Inoltre, pur essendo la molecola CD123 un target principalmente mieloide, è stata di recente proposta anche nel contesto linfoide, in quanto overespressa in una sottopopolazione di pazienti con LLA<sup>(70)</sup>.

Nello specifico, diverse strategie basate sulla combinazione di singoli CAR o sulla generazione di CAR bi-specifici, noti anche come dual-CAR, sono attualmente oggetto di valutazione preclinica e clinica.

Quest'ultimo approccio è stato concepito principalmente in due modi diversi: la modifica delle cellule T con una molecola CAR contenente due differenti domini di legame in tandem (denominati Tan-CARs) o la generazione di due molecole di CAR distinte con due differenti domini di legame e segnalazione (chiamati *trans-signaling* CARs) <sup>(71)</sup>. Attualmente sono in corso diversi studi clinici che sfruttano TanCARs CD19-CD22 o la combinazione dei singoli CARs (NCT03098355; NCT03125577; NCT02903810).

La strategia *trans-signaling* invece può essere applicata per aumentare l'avidità verso le cellule tumorali preservando la sicurezza contro i tessuti normali. Questo aspetto è di particolare rilevanza per il *targeting* di patologie per le quali è difficile identificare un antigene tumore specifico e la tossicità verso i tessuti normali può essere difficile da controllare, come ad esempio la potenziale mielotossicità associata al *targeting* della LMA. Il modello di *trans-signaling* è concepito in modo tale che dei due recettori artificiali, uno è un CAR specifico per un antigene e contiene solo il dominio di segnalazione intracellulare CD3z, garantendo quindi la funzione di attivazione del segnale 1 della cellula T, mentre la seconda molecola è un recettore costimolatorio chimerico (CCR) che riconosce un altro antigene, fornendo la funzione di co-stimolazione o segnale 2 data per esempio da CD28 e/o CD137. I dati preclinici ottenuti con le cellule T ingegnerizzate con i *trans-signaling* CARs hanno dimostrato che l'attivazione delle cellule T è produttiva solo in presenza di entrambi gli antigeni <sup>(72)</sup>. In questo contesto, è possibile anche modificare l'affinità della scFv del CAR per identificare un giusto bilancio tra l'efficacia e la sicurezza <sup>(73)</sup>. In particolare, *trans-signaling* CAR o TanCAR hanno mostrato una maggiore attività antitumorale rispetto al singolo CAR o alla combinazione di singoli CAR in presenza di entrambi gli an-

tigeni sul tumore <sup>(64,74)</sup>. Infatti, nella combinazione di singoli CARs, le cellule T anti-CD19 CAR hanno dimostrato di avere un vantaggio significativo di crescita rispetto alle cellule T anti-CD20 CAR, causando una diminuzione nel tempo del numero di cellule T anti-CD20 CAR anche se l'anticorpo CD20 era presente <sup>(75)</sup>.

Altre terapie combinatoriali comprendono cellule CAR-T e farmaci molecolari come ibrutinib, un inibitore della tirosina chinasi di Bruton (BTK). In studi preclinici su neoplasie B, è stato dimostrato come l'aggiunta di ibrutinib aumenti l'attività delle cellule CAR-T mediante la riduzione della regolazione dei recettori inibitori sulle cellule T <sup>(76)</sup>. Inoltre, combinazioni di immunoterapia CAR-mediata con inibitori dei *checkpoint* quali PD-1 (pembrolizumab), sono in fase di studio e validazione sia preclinica che clinica al fine di migliorare la risposta antitumorale revertendo l'immunosoppressione tumore-associata <sup>(77)</sup>.

## Conclusioni

Il trattamento pediatrico della leucemia rappresenta oggi uno dei migliori esempi di successo nel tasso di cura grazie a un approccio continuo di *bench to bed-side and backward*. L'immunoterapia ha sicuramente rappresentato un importante passo in avanti, in particolare dopo l'avvento delle cellule T geneticamente modificate. Sono ancora necessari avanzamenti per migliorare il processo complesso di manipolazione di cellule e geni e di affrontare eterogenei meccanismi di evasione immunologica recentemente descritti. Tuttavia, come discusso nella presente review, le attuali scoperte si sono rivelate promettenti anche nel risolvere tali aperte questioni scientifiche, ed in futuro si prevedono ulteriori avanzamenti per un nuovo concetto di *personalized therapy*.

## Bibliografia

1. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2938-48.
2. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-52.
3. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998;352(9142):1731-8.
4. Biondi A, Cazzaniga G. Novel clinical trials for pediatric leukemias: lessons learned from genomic analyses. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:612-9.
5. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010;115(16):3206-14.
6. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood*. 2011;118(8):2077-84.
7. Puumala SE, Ross JA, Aplenc R, Spector LG. Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *Pediatric blood & cancer*. 2013;60(5):728-33.
8. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*. 2015;125(26):3977-87.
9. von Stackelberg A, Locatelli F, Zugmaier G, Handgretinger R, Trippett TM, Rizzari C, et al. Phase I/Phase II Study of Blinatumomab in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2016;34(36):4381-9.
10. Magnani CF, Biondi A, Biagi E. Donor-derived CD19-targeted T cells in allogeneic transplants. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(6):497-502.
11. Magnani CF, Turazzi N, Benedicenti F, Calabria A, Tenderini E, Tettamanti S, et al. Immunotherapy of acute leukemia by chimeric antigen receptor-modified lymphocytes using an improved Sleeping Beauty transposon platform. *Oncotarget*. 2016;7(32):51581-97.
12. Rotiroli MC, Arcangeli S, Casucci M, Perriello V, Bondanza A, Biondi A, et al. Acute Myeloid Leukemia Targeting by Chimeric Antigen Receptor T Cells: Bridging the Gap from Preclinical Modeling to Human Studies. *Hum Gene Ther*. 2017;28(3):231-41.
13. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A, 1989;86(24):10024-8.
14. Biagi E, Marin V, Giordano Attianese GM, Dander E, D'Amico G, Biondi A. Chimeric T-cell receptors: new challenges for targeted immunotherapy in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2007;92(3):381-8.
  15. Ma Q, Gonzalo-Daganzo RM, Junghans RP. Genetically engineered T cells as adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Chemother Biol Response Modif*. 2002;20:315-41.
  16. Rossig C, Pule M, Altvater B, Saiagh S, Wright G, Ghorashian S, et al. Vaccination to improve the persistence of CD19CAR gene-modified T cells in relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(5):1087-95.
  17. Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res*. 2006;66(22):10995-1004.
  18. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-18.
  19. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol*. 2015;33(6):540-9.
  20. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2015;385(9967):517-28.
  21. Porter DL, Hwang WT, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*. 2015;7(303):303ra139.
  22. 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.
  23. Barrett DM, Grupp SA, June CH. Chimeric Antigen Receptor- and TCR-Modified T Cells Enter Main Street and Wall Street. *J Immunol*. 2015;195(3):755-61.
  24. Maude SL, Pulsipher MA, Boyer MW, Grupp SA, Davies SM, Phillips CL, et al. Efficacy and Safety of CTL019 in the First US Phase II Multicenter Trial in Pediatric Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of an Interim Analysis. *Blood*. 2016;128:2801.
  25. Gardner RA, Finney O, Annesley C, Brakke H, Summers C, Leger K, et al. Intent to treat leukemia remission by CD19CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*. 2017;129(25):3322-3331.
  26. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2123-38.
  27. Konopleva MY, Jordan CT. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):591-9.
  28. Majeti R. Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene*. 2011;30(9):1009-19.
  29. Wang QS, Wang Y, Lv HY, Han QW, Fan H, Guo B, et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther*. 2015;23(1):184-91.
  30. Ritchie DS, Neeson PJ, Khot A, Peinert S, Tai T, Tainton K, et al. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. *Mol Ther*. 2013;21(11):2122-9.
  31. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010;18(4):843-51.
  32. Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther*. 2013;21(4):904-12.
  33. Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, et al. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 zeta chimeric antigen receptor-modified effector CD8+ T cells. *J Immunol*. 2015;194(3):911-20.
  34. Kenderian SS, Ruella M, Shestova O, Klichinsky M, Kim MY, Porter DL, et al. Identification of PD1 and TIM3 As Checkpoints That Limit Chimeric Antigen Receptor T Cell Efficacy in Leukemia. *Blood*. 2015;126:852-.
  35. Marin V, Pizzitola I, Agostoni V, Attianese GM, Finney H, Lawson A, et al. Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors. *Haematologica*. 2010;95(12):2144-52.
  36. O'Hear C, Heiber JF, Schubert J, Fey G, Geiger TL. Anti-CD33 chimeric antigen receptor targeting of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2015;100(3):336-44.
  37. Testa U, Riccioni R, Miliuti S, Coccia E, Stellacci E, Samoggia P, et al. Elevated expression of IL-3Ralpha in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood*. 2002;100(8):2980-8.
  38. Pizzitola I, Anjos-Afonso F, Rouault-Pierre K, Lassailly F, Tettamanti S, Spinelli O et al. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Leukemia*. 2014;28(8):1596-605.
  39. Tettamanti S, Marin V, Pizzitola I, Magnani CE, Giordano Attianese GM, Cribioli E, et al. Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor. *Br J Haematol*. 2013;161(3):389-401.
  40. Gill S, Tasian SK, Ruella M, Shestova O, Li Y, Porter DL, et al. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood*. 2014;123(15):2343-54.
  41. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra25.
  42. Gaipa G, Introna M, Golay J, Nolli ML, Vallanti G, Parati E, et al. Development of advanced therapies in Italy: Management models and sustainability in six Italian cell factories. *Cytotherapy*. 2016;18(4):481-6.
  43. Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017;4:92-101.
  44. Cruz CR, Micklethwaite KP, Savoldo B, Ramos CA, Lam S, Ku S, et al. Infusion of donor-derived CD19-redirection virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase 1 study. *Blood*. 2013;122(17):2965-73.
  45. Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, Kassim SH, Rose JJ, Telford WG, et al. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013;122(25):4129-39.
  46. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*. 2016;127(26):3321-30.
  47. Torikai H, Reik A, Liu PQ, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood*. 2012;119(24):5697-705.
  48. MacLeod DT, Antony J, Martin AJ, Moser RJ, Hekele A, Wetzel KJ, et al. Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells. *Mol Ther*. 2017;25(4):949-61.
  49. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*. 2017;543(7643):113-7.
  50. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2017;9(374):eaaj2013.
  51. Lussana F, Introna M, Golay J, Delaini F, Pavoni C, Valgarsdottir R, et al. Final Analysis of a Multicenter Pilot Phase 2 Study of Cytokine Induced Killer (CIK) Cells for Patients with Relapse after Allogeneic Transplantation. *Blood*. 2016;128:1160.
  52. Marin V, Dander E, Biagi E, Introna M, Fazio G, Biondi A, et al. Characterization of in vitro migratory properties of anti-CD19 chimeric receptor-redirection CIK cells for their potential use in B-ALL immunotherapy. *Exp Hematol*. 2006;34(9):1219-29.
  53. Rambaldi A, Biagi E, Bonini C, Biondi A, Introna M. Cell-based strategies to manage leukemia relapse: efficacy and feasibility of immunotherapy approaches. *Leukemia*. 2015;29(1):1-10.

54. Wang X, Olszewska M, Qu J, Wasielewska T, Bartido S, Hermetet G, et al. Large-scale clinical-grade retroviral vector production in a fixed-bed bioreactor. *J Immunother*. 2015;38(3):127-35.
55. Wang X, Riviere I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3:16015.
56. Merten OW, Charrier S, Laroudie N, Fauchille S, Dugue C, Jenny C, et al. Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. *Hum Gene Ther*. 2011;22(3):343-56.
57. Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figliola MJ, Bassett R, Olivares S, et al. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest*. 2016;126(9):3363-76.
58. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Zhang L, Yang G, et al. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. *PLoS One*. 2013;8(5):e64138.
59. Ivics Z, Izsvak Z, Minter A, Hackett PB. Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):5008-13.
60. Magnani CF, Mezzanotte C, Cappuzzello C, Benedicenti F, Bardini M, Tettamanti S, et al. Sleeping Beauty Modified CAR+ Lymphocytes Engraft and Exhibit Anti-Tumor Activity in Patient-Derived Xenograft Models of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2016;128:4022.
61. Introna M, Borleri G, Conti E, Franceschetti M, Barbui AM, Broady R, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study. *Haematologica*. 2007;92(7):952-9.
62. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer discovery*. 2015;5(12):1282-95.
63. Gardner R, Wu D, Cherian S, Fang M, Hanafi LA, Finney O, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*. 2016;127(20):2406-10.
64. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest*. 2016;126(10):3814-26.
65. Qin H, Cho M, Haso W, Zhang L, Tasian SK, Oo HZ, et al. Eradication of B-ALL using chimeric antigen receptor-expressing T cells targeting the TSLPR oncoprotein. *Blood*. 2015;126(5):629-39.
66. Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013;121(7):1165-74.
67. Berger C, Sommermeyer D, Hudecek M, Berger M, Balakrishnan A, Paszkiewicz PJ, et al. Safety of targeting ROR1 in primates with chimeric antigen receptor-modified T cells. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(2):206-16.
68. Savoldo B, Rooney CM, Di Stasi A, Abken H, Hombach A, Foster AE, et al. Epstein Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30zeta artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. *Blood*. 2007;110(7):2620-30.
69. Vera J, Savoldo B, Vigouroux S, Biagi E, Pule M, Rossig C, et al. T lymphocytes redirected against the kappa light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells. *Blood*. 2006;108(12):3890-7.
70. Munoz L, Nomdedeu JF, Lopez O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventin A, et al. Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2001;86(12):1261-9.
71. Grada Z, Hegde M, Byrd T, Shaffer DR, Ghazi A, Brawley VS, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013;2:e105.
72. Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol*. 2013;31(1):71-5.
73. Arcangeli S, Rotiroti MC, Bardelli M, Simonelli L, Magnani CF, Biondi A, et al. Balance of Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor Binding Affinity and Density for the Targeting of Acute Myeloid Leukemia. *Mol Ther*. 2017;25(8):1933-45.
74. Hegde M, Mukherjee M, Grada Z, Pignata A, Landi D, Navai SA, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Ralpha2 mitigate tumor antigen escape. *J Clin Invest*. 2016;126(8):3036-52.
75. Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, Jensen MC, Chen YY. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(6):498-508.
76. Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M, Zheng Z, Barrett DM, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood*. 2016;127(9):1117-27.
77. Maude SL, Hucks GE, Seif AE, Talekar MK, Teachey DT, Baniewicz D, et al. The effect of pembrolizumab in combination with CD19-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cells in relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Clin Oncol*. 2017 35:15(Suppl):103-103.

## Parole Chiave

Leucemia linfoblastica acuta, leucemia mieloide acuta, immunoterapia, recettori chimerici antigenici (CARs)

## Ringraziamenti

*Daniela Cigognini per il suo contributo. Una profonda gratitudine è rivolta ai comitati dei genitori "Amici di Duccio", "Quelli che ... con LUCA onlus", "Comitato Maria Letizia Verga" e "Stefano Verri" per il loro costante sostegno. Questo lavoro è stato supportato dai grants AIRC Molecular Clinical Oncology 5 per mille, 9962, AIRC IG2014, 15992, e AIRC IG Grant 2015, 17248.*

## Indirizzi per la corrispondenza

**Andrea Biondi**

Pro-Rector for International Affairs  
 Professor of Pediatrics  
 University of Milano-Bicocca  
 Director, Department of Pediatrics  
 Fondazione MBBM/Ospedale San Gerardo  
 Via Pergolesi 33, 20900 Monza (IT)  
 Tel: 039-2333515, Fax: 039-2332167  
 Email: abiondi.unimib@gmail.com

# Leucemia linfoblastica acuta dell'adulto



Sabina Chiaretti, Valentina Gianfelici, Robin Foà

Ematologia, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Policlinico Umberto I, "Sapienza" Università di Roma

## Introduzione

L'applicazione dei protocolli di derivazione pediatrica ha migliorato significativamente la sopravvivenza degli adolescenti (15-18 anni) e dei giovani adulti (fascia d'età compresa tra i 18 ed i 35-40 anni) affetti da leucemia acuta linfoblastica (LLA). Tuttavia, la sopravvivenza libera da malattia (*Disease Free survival*, DFS) non supera il 50% a 5 anni negli adulti e rimane ancora largamente insoddisfacente negli anziani (età >65 anni)<sup>(1)</sup>. In particolare, i protocolli di derivazione pediatrica non apportano un vantaggio di sopravvivenza nei pazienti adulti >55 anni e sono difficilmente applicabili. Infatti, la tossicità ad essi correlata è responsabile di un maggior numero di decessi in induzione o in prima remissione completa (RC) ed una ridotta sopravvivenza libera da eventi (*Event Free Survival*, EFS)<sup>(2)</sup>.

Oltre all'età e ai fattori di rischio biologici legati alla malattia, la risposta alla chemioterapia iniziale rappresenta un fattore importante nel predire il rischio di recidiva. Studi prospettici hanno dimostrato che l'entità della malattia minima residua (o *minimal residual disease*, MMR) - valutata tramite citometria a flusso o biologia molecolare - rappresenta oggi il fattore prognostico più importante nell'influenzare negativamente i tassi di DFS, indipendentemente dall'età e dai fattori di rischio iniziali. La persistenza della MMR - o la sua ricomparsa - dopo terapia d'induzione e/o consolidamento porta inevitabilmente ad una recidiva ematologica, con scarse possibilità di cura con le terapie di salvataggio tradizionali<sup>(3,4)</sup>. Pertanto, gli attuali approcci terapeutici, tanto nel bambino quanto nell'adulto, contemplano un approccio *MMR-driven* che prevede la stratificazione in diversi gruppi di rischio basata sulle caratteristiche clinico-biologiche del paziente all'esordio e la valutazione della MMR<sup>(3-6)</sup>.

Ulteriori miglioramenti nella sopravvivenza a lungo termine sono stati resi possibili grazie allo sviluppo ed all'introduzione nella pratica clinica di farmaci bersaglio, che hanno completamente rivoluzionato l'approccio e la prognosi di specifici sottogruppi, quali la LLA Ph+ e

le LLA B-mature (Burkitt o Burkitt-type), che si vanno ad integrare alla chemioterapia convenzionale e all'allograft di cellule staminali emopoietiche (allo-SCT). L'identificazione negli ultimi anni di nuovi sottogruppi immunofenotipici e molecolari sta non solo arricchendo la classificazione della LLA, ma anche ampliando il panorama delle lesioni bersaglio e quindi dei pazienti che potrebbero beneficiare di terapie mirate, basate su meccanismi alternativi alla chemioterapia. Mentre per alcuni farmaci - i.e. gli inibitori delle tirosinchinasi, TKI (oltre a quelli diretti contro ABL1), gli inibitori delle vie del segnale di RAS e JAK/STAT, ed altri coinvolti nei meccanismi epigenetici - i risultati clinici sono ancora del tutto preliminari, gli anticorpi monoclonali (AbMo) stanno entrando nella pratica clinica e sono stati riportati risultati promettenti, tanto alla recidiva, che nel contesto della persistenza della malattia a livello molecolare, e sono in via di introduzione nei protocolli di prima linea. Oltre agli AbMo, le nuove strategie terapeutiche contemplano l'impiego della terapia cellulare, rappresentata in particolare dalle CAR-T.

In questo capitolo illustreremo i principali agenti immunoterapici che stanno trovando applicazione nel trattamento della LLA, in particolar modo nelle LLA a derivazione B ed in minor misura a derivazione T. I risultati che verranno discussi si riferiscono soprattutto a studi in pazienti recidivati, e in alcuni casi MMR-positivi - sulla cui valutazione rimandiamo alla Tabella 1.

## Anticorpi monoclonali

Le potenzialità terapeutiche degli AbMo nella LLA si basano sulla possibilità di eliminare le cellule leucemiche attraverso il legame ad antigeni espressi sulla loro superficie. I primi AbMo sintetizzati erano anticorpi nudi, non coniugati, diretti contro un determinato antigene espresso sulla cellula leucemica, come il CD20 per il rituximab, il CD22 per l'epratuzumab ed il CD52 per l'alemtuzumab. Successivamente, sono stati sviluppati anticorpi coniugati ad agenti citotossici al fine di aumentarne l'efficacia.

Tecniche di MMR	Sensibilità	Applicabilità	Vantaggi	Svantaggi
Citometria a flusso	10 <sup>-4</sup>	LLA-B: >90% LLA-T: >90%	Velocità; analisi di sottopopolazioni cellulari o di singole cellule; informazioni sulla cellularità totale del campione	Sensibilità variabile; difficoltà nel distinguere gli ematogoni dalle cellule leucemiche; limitata standardizzazione; necessità di un adeguato numero di cellule
RQ-PCR dei riarrangiamenti dei geni delle Ig e/o del TCR	10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-6</sup>	LLA-B: 95% LLA-T: 90-95%	Applicabilità a quasi tutti i casi di LLA; sensibilità; standardizzazione	Tempi di esecuzione; costi; richiede esperienza e conoscenza
Q-RT-PCR dei trascritti di fusione	10 <sup>-4</sup> -10 <sup>-6</sup>	LLA-B: 25-40% LLA-T: 10-15%	Semplicità del metodo; sensibilità; applicabilità a specifici sottogruppi di leucemia	Limitata standardizzazione; limitata applicabilità (assenza di marcatori in >50% dei casi); rischio di contaminazione

Tabella 1 - Tecniche utilizzate per il monitoraggio della MMR.

Tra gli AbMo coniugati sviluppati per le LLA-B, ricordiamo l'ino-tuzumab ozogamicina (anti-CD22) e il denintuzumab (anti-CD19). Infine, negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi agenti immunoterapici che sfruttano la capacità del sistema immune dell'ospite di attaccare le cellule leucemiche. Il blinatumomab è stato il primo farmaco approvato nella classe di anticorpi bi-specifici, chiamati BiTE® (*bispecific T-cell engager*) che derivano dalla fusione di due regioni variabili presenti in due anticorpi monoclonali a singola catena, diretti contro il CD19 ed il CD3.

Appare evidente da quanto descritto che i progressi fatti nel campo

dell'immunoterapia sono stati possibili grazie ad un'accurata classificazione immunofenotipica delle LLA e all'avanzamento delle conoscenze sui meccanismi d'azione del sistema immunitario. Nella Tabella 2 riportiamo la classificazione immunofenotipica delle LLA, mentre nella Tabella 3 sono descritti i principali studi condotti nelle LLA-B. Nei paragrafi successivi descriveremo gli AbMo che hanno trovato maggior impiego nella pratica clinica. Vedremo come siano ormai diversi gli armamentari terapeutici per il sottogruppo delle LLA-B, mentre nelle LLA-T sono ancora pochi i farmaci sviluppati e per lo più in fase pre-clinica.

	TdT	CD19	CD79	cCD22	CD10	clgμ	slgμ	sk/λ
Pro-B	+	+	+	+	-	-	-	-
Comune	+	+	+	+	+	-	-	-
Pre-B	+	+	+	+	+/-	+	-	-
B-mature	-	+	+	+	-	+	+	+

Tabella 2a - Caratterizzazione immunofenotipica della LLA a fenotipo B.

	TdT	cCD3	CD7	CD2	CD5	CD1a	sCD3	γ/δ oppure α/β
Pro-T	+	+	+	-	-	-	-	-
Pre-T	+	+	+	+	+	-	-	-
T-corticali	+	+	+	+	+	+	+/-	-
T-mature	+/-	+	+	+	+	-	+	+/-

Tabella 2b - Caratterizzazione immunofenotipica della LLA a fenotipo T.

Farmaco	Descrizione	Fase di studio
<b>AbMo anti-CD20</b>		
Rituximab	Ab chimerico, nudo	Approvato in prima linea per le LLA-B mature Fase III in prima linea per gli altri sottotipi
Ofatumumab	Ab umanizzato, nudo Lega un epitopo diverso dal rituximab. Maggiore attività ADCC del rituximab	Fase I
Obinutuzumab	Ab umanizzato glicoingegnerizzato di tipo 2, nudo Superiore al rituximab e ofatumumab nell'indurre la morte cellulare diretta	Preclinica
<b>AbMo anti-CD22</b>		
Inotuzumab ozogamicina	Ab umanizzato, coniugato alla caliceamicina	Fase I/II in prima linea e fase III nei casi refrattari/recidivati
HA22 (CAT-8015)	Coniugato alla esotosina A dello <i>Pseudomonas</i>	Fase I-II nei casi refrattari/recidivati
<b>AbMo anti-CD19</b>		
Denintuzumab	Ab umanizzato, coniugato ad un inibitore dei microtubuli	Fase I nei casi refrattari/recidivati
Combotox	Anti-CD22 e anti-CD19 coniugati alla ricina	Fase I nei casi refrattari/recidivati
Blinatumomab	Anticorpo bi-specifico, anti-CD19 ed anti-CD3	Approvato nei casi refrattari/recidivati Fase II/III in prima linea
<b>Terapia cellulare</b>		
CAR-T	Linfociti T ingegnerizzati con recettori diretti contro il CD19	Fase I/II

Tabella 3 - Principali approcci immuterapici sviluppati nella LLA-B.

## LLA a derivazione B

### AbMo anti-CD20

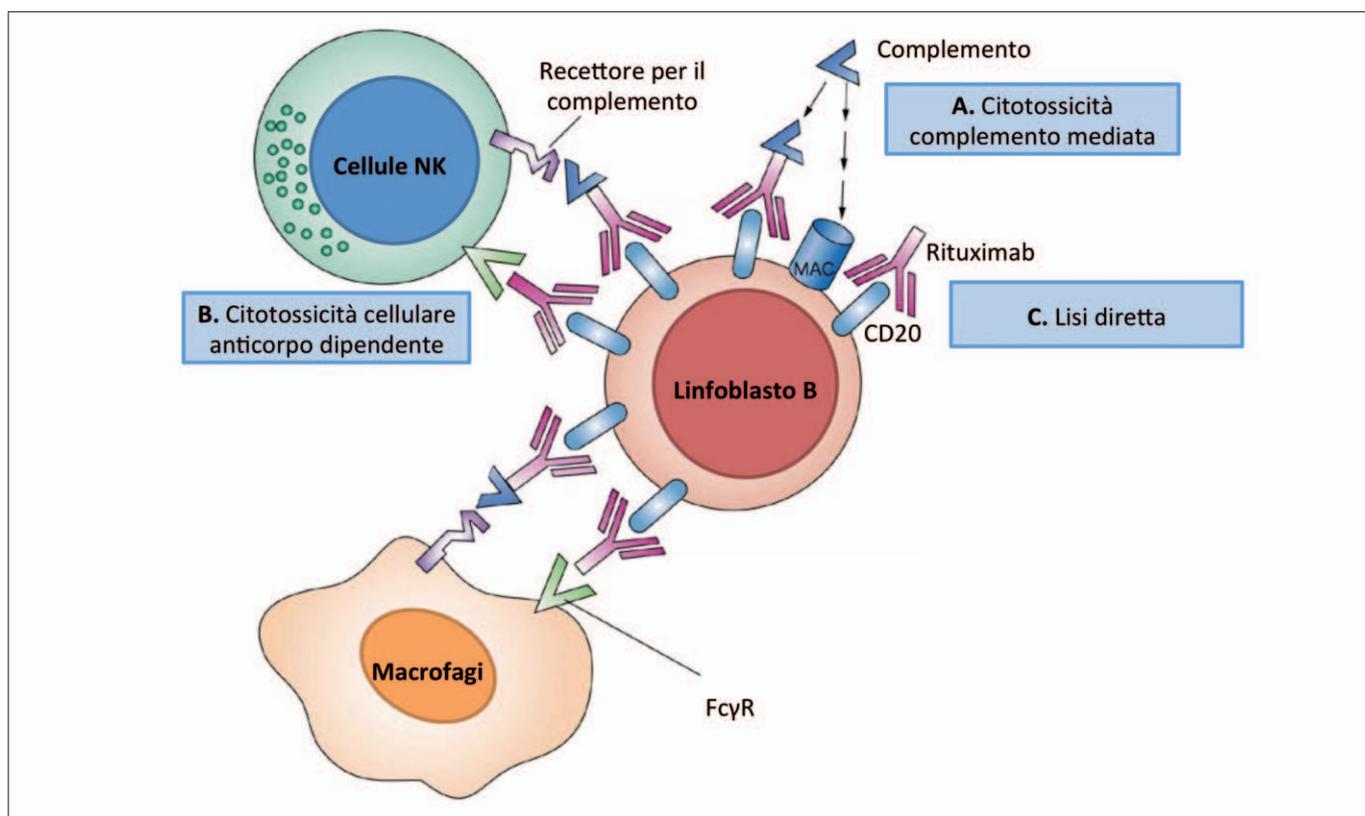
L'antigene di superficie CD20 è una fosfoproteina transmembrana presente sulle cellule pre-B e sui linfociti B maturi, ma non sulle cellule staminali, sulle cellule pro-B, sulle plasmacellule ed altri tessuti normali. Il CD20 è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e nell'attivazione dei linfociti B attraverso il controllo del flusso degli ioni calcio. L'antigene non viene internalizzato dopo legame anticorpale e non circola nel sangue come antigene libero, quindi non compete con il legame degli anticorpi. È espresso nel 95% dei linfomi non-Hodgkin (LNH) a cellule B ed in circa il 30% dei casi affetti da LLA-B<sup>(7)</sup>. La sua espressione aumenta con il grado di maturazione della cellula leucemica. Infatti, è assente nei casi di LLA pro-B, mentre è espresso su tutte le cellule nelle LLA-B mature. È stato, inoltre, riportato un aumento dell'espressione del CD20 sui blasti leucemici dopo terapia di induzione, soprattutto in seguito al trattamento con steroidi<sup>(8)</sup>.

### Rituximab

È un AbMo chimerico di tipo IgG1/k di origine murina nella porzione variabile e umana nelle regioni costanti delle catene leggere e di quelle pesanti. Il dominio Fab (frammento con sito di legame

per l'antigene) del rituximab si lega all'antigene CD20 espresso sui linfociti B, mentre il dominio Fc delle catene pesanti (frammento cristallizzabile) può attivare le funzioni effettrici del sistema immunitario con lo scopo di provocare la lisi delle cellule B. Come illustrato nella Figura 1, i meccanismi della lisi cellulare mediata dall'AbMo comprendono la citotossicità complemento-dipendente (CDC) attraverso il legame con il C1q e la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) mediata da uno o più recettori Fcγ sulla superficie di granulociti, macrofagi e cellule NK.

È stato anche dimostrato che il legame del rituximab all'antigene CD20 sui linfociti B induce la morte cellulare per apoptosi<sup>(9)</sup>. Il rituximab è stato il primo AbMo sviluppato ed approvato per il trattamento dei LNH. Successivamente, è stato incorporato nel trattamento delle LLA-B mature di tipo Burkitt, un sottogruppo nel passato considerato a prognosi sfavorevole; con l'introduzione di regimi chemioterapici intensivi e ravvicinati nel tempo in combinazione al rituximab la prognosi delle LLA-B mature di tipo Burkitt è nettamente migliorata<sup>(10,11)</sup>. Ad oggi, con questo schema immunochemioterapico, le percentuali di RC sono dell'80-90%, a seconda della fascia di età, e la sopravvivenza globale (*Overall Survival*, OS) è superiore al 90% nell'adolescente, dell'84% nei



**Figura 1** - Meccanismo d'azione del rituximab. Il rituximab lega il linfoblasto B che esprime il CD20. Le cellule sono quindi uccise attraverso 3 meccanismi: A) citotossicità complemento mediata (CDC); B) citotossicità cellulare anticorpo dipendente (ADCC); C) lisi diretta ed attivazione dell'apoptosi.

giovani adulti e del 64% negli adulti (>50 anni) <sup>(11,12)</sup>.

Il rituximab ha trovato impiego anche negli altri sottogruppi di LLA-B CD20-positivi. Uno studio del MD Anderson Cancer Center (MDACC) ha dimostrato l'efficacia dell'aggiunta del rituximab in associazione alla chemioterapia nei pazienti adolescenti ed adulti (età ≤60 anni) CD20-positivi con LLA-B *de novo*. In questo studio, il rituximab veniva somministrato alla dose standard di 375 mg/m<sup>2</sup> durante i primi 4 cicli di induzione e consolidamento - al giorno 1 e 11 dell'hyper-CVAD e al giorno 1 e 8 della daunorubicina liposomiale e citarabina - per un totale di 8 cicli e, successivamente, al sesto e diciottesimo mese di mantenimento prima dell'intensificazione con l'hyper-CVAD. L'OS a 3 anni è risultata significativamente superiore nei pazienti che avevano ricevuto il rituximab rispetto a coloro che avevano ricevuto solo la chemioterapia (75% vs 47%, p=0,003). Inoltre, la percentuale di casi che avevano ottenuto la negativizzazione della MMR - valutata mediante citometria a flusso - è risultata più elevata nell'ambito dei pazienti CD20-positivi trattati con la terapia di associazione rispetto ai casi che avevano ricevuto solo la chemioterapia (81% vs 58%, p=0,02) <sup>(13)</sup>. Tuttavia, nei pazienti anziani non si è registrato un miglioramento dell'OS a 3 anni, in parte a causa dei decessi in RC dovuti soprattutto ad infezioni. In maniera simile, il GRAALL (*Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*; CT.gov:NCT00327678) ha recentemente

dimostrato - nell'ambito di uno studio randomizzato che paragonava la combinazione immunochimioterapica alla sola chemioterapia - che l'aggiunta del rituximab durante tutto l'iter terapeutico (da 16 a 18 cicli totali) in pazienti con età compresa tra 18 e 59 anni è in grado di incrementare il tasso di casi che effettuano un allo-SCT, migliorare l'EFS (65% vs 52%, p=0,038) e l'OS a 2 anni, quest'ultima solo censorizzando per allo-SCT (74% vs 63%, p=0,018) <sup>(14)</sup>. Gli studi finora pubblicati riguardano pazienti con livelli di espressione del CD20 >20%. Il gruppo inglese (UKALL) sta conducendo uno studio randomizzato di fase III per valutare se l'aggiunta del rituximab alla chemioterapia migliori la sopravvivenza dei pazienti affetti da LLA-B, indipendentemente dai livelli di espressione del CD20 (CT.gov:NCT01085617).

Sebbene i risultati finora riportati siano molto promettenti in alcuni paesi, al momento il rituximab non è approvato per il trattamento delle LLA CD20-positivi, con l'eccezione delle LLA-B mature (*Burkitt like*).

#### **Ofatumumab ed obinutuzumab**

Rappresentano la seconda generazione di anticorpi completamente umanizzati e si distinguono dal rituximab, il primo per la capacità di riconoscere un epitopo diverso dal CD20, ed il secondo per l'aggiunta di un gruppo glucidico alla porzione costante dell'anticorpo <sup>(15,16)</sup>. Gli anticorpi anti-CD20 di nuova generazione hanno

dimostrato un'efficacia simile, ed in alcuni casi superiore, rispetto al rituximab. Questi nuovi agenti, a differenza del rituximab, non stabilizzano la proteina CD20 all'interno delle cosiddette *lipid rafts*, e persistono più a lungo sulla superficie dei linfociti B. Questo si traduce in una più facile interazione con il recettore per la porzione Fc presente sulle cellule effettrici e quindi con una ADCC più potenziata. Inoltre, essi inducono la morte diretta della cellula attraverso la riorganizzazione actina-dipendente del citoscheletro, determinando il rilascio dei radicali liberi e del contenuto lisosomiale<sup>(17,18)</sup>. Mentre l'efficacia dell'obinutuzumab nelle LLA-B è stata dimostrata solo in studi pre-clinici<sup>(19)</sup>, l'ofatumumab è stato associato con successo alla chemioterapia di induzione per il trattamento delle LLA-B CD20-positivo<sup>(20)</sup>.

Sasaki et al. hanno recentemente riportato sotto forma di abstract i risultati preliminari di uno studio di fase II condotto su pazienti adulti affetti da LLA-B con espressione del CD20 >1% (CT.gov:NCT01363128). Sono stati valutati 55 pazienti con età mediana di 41 anni (range: 18-71). Il 63% dei pazienti presentava alla diagnosi livelli di CD20 >20%, l'8% tra il 20% ed il 10%, ed il 24% aveva livelli compresi tra 1% e 10%. Associando l'ofatumumab alla chemioterapia secondo lo schema hyper-CVAD sono stati ottenuti tassi di RC pari al 98% e negatività della MMR - valutata mediante citometria a flusso - nel 93% dei casi, di cui il 54% dopo induzione. La bassa espressione del CD20 alla diagnosi si associa negativamente con il raggiungimento della negatività della MMR al giorno +21. Tuttavia, con un follow up mediano di 20 mesi (range: 1-58), non sono state osservate differenze statisticamente significative in termini di OS tra i pazienti con espressione del CD20 maggiore o minore del 20%. A 3 anni, la OS è del 68% e la durata di remissione del 78%<sup>(20)</sup>.

### AbMo anti-CD22

A differenza del CD20, il CD22 è una immunoglobulina di superficie che viene internalizzata dalla cellula dopo il legame con il ligando. È espresso virtualmente in tutte le fasi maturative del linfocita B, ad eccezione delle plasmacellule. Il CD22 funge sia come molecola di adesione ad altri linfociti, che come regolatore del segnale del calcio<sup>(21)</sup>. È espresso anche in tessuti non linfoidi come ovaie, tube di Falloppio ed appendice. Tra gli anticorpi anti-CD22 descriveremo l'epratuzumab e l'anticorpo coniugato inotuzumab ozogamicina, l'ultimo dei quali sta trovando largo impiego.

#### Epratuzumab

È un anticorpo completamente umanizzato diretto contro il CD22, che ne induce l'internalizzazione entro 24 ore: *in vitro* sembra inibire l'attivazione dei linfociti B piuttosto che avere azione citotossica. Inoltre, ha un'emivita breve. Per tali motivi, non è efficace come agente singolo ma viene piuttosto impiegato in associazione alla chemioterapia. In ambito pediatrico è stato riportato che l'epratuzumab è in grado di indurre la negatività della MMR a livello immunofe-

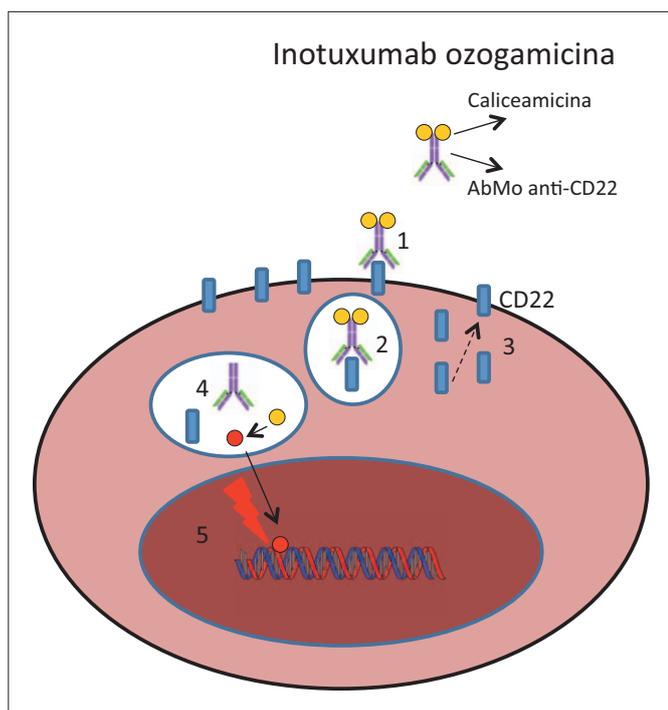
notipico e può servire come ponte per un allo-SCT<sup>(22)</sup>. Tuttavia, questi risultati non sono stati replicati negli adulti. Chevallier e collaboratori hanno riportato uno studio di fase II condotto su 26 pazienti con età >55 anni (età mediana: 65 anni) affetti da LLA-B CD22-positiva refrattaria/recidivata ed hanno valutato l'efficacia dell'epratuzumab somministrato settimanalmente alla dose di 360 mg/m<sup>2</sup> in associazione a vincristina e desametasone per un totale di 4 dosi<sup>(23)</sup>. Sebbene le risposte siano state del 40% circa, non sono state durature. Lo stesso gruppo ha recentemente pubblicato uno studio (CT.gov:NCT01219816) condotto su 30 pazienti adulti (età mediana 35 anni, range: 21-59) con LLA-B refrattaria o recidivata<sup>(24)</sup>. L'epratuzumab è stato somministrato alla dose di 360 mg/m<sup>2</sup> per un totale di 4 dosi somministrate al giorno +1, +8, +15 e +22 dell'hyper-CVAD: i criteri di inclusione prevedevano un numero di blasti midollari >20% e l'espressione del CD22 in più del 30% dei blasti. Questo schema ha indotto una risposta globale nel 50% dei pazienti. Inoltre, 4 dei 9 pazienti in RC hanno ottenuto la negativizzazione della MMR valutata con la citometria a flusso. Variabili predittive di RC erano rappresentate dall'età <36 anni (50% vs 14%, p<0,001) e dal numero di recidive (54% nelle prime recidive non trattate vs 18% per le altre linee di trattamento, p<0,0001). Il 40% dei pazienti è stato successivamente sottoposto ad allo-SCT. Non sono tuttavia forniti risultati a lungo termine.

In un altro studio condotto dal gruppo (*Southwest Oncology Group*, SWOG), l'epratuzumab è stato somministrato in associazione a clofarabina e citarabina a pazienti refrattari/recidivati (CT.gov:NCT00945815)<sup>(25)</sup>. Con questa combinazione, i tassi di RC sono stati nettamente superiori a quelli ottenuti dallo stesso gruppo con la sola clofarabina e citarabina (57% vs 17%); tuttavia, analogamente a quanto osservato in precedenza, le risposte non sono state durature.

#### Inotuzumab ozogamicina

È un AbMo anti-CD22 coniugato alla caliceamicina, che provoca una rottura del DNA e conseguente apoptosi cellulare. L'inotuzumab ozogamicina viene legato ad alta affinità dalle cellule CD22-positivo, rapidamente internalizzato, determinando il rilascio della caliceamicina all'interno di esse (Figura 2)<sup>(26)</sup>. Il suo utilizzo nei LNH aggressivi e indolenti ha mostrato buoni risultati con tossicità epatica transitoria e trombocitopenia<sup>(26,27)</sup>.

La sua efficacia nei pazienti con LLA-B refrattaria/recidivata CD22-positiva è stata dapprima dimostrata in uno studio monocentrico di fase II condotto dai colleghi del MDACC su 49 pazienti trattati con inotuzumab ozogamicina, somministrato come singolo agente al dosaggio di 1,8 mg/m<sup>2</sup><sup>(28)</sup>. I pazienti che ottenevano la RC dopo uno o due cicli potevano ricevere fino ad un massimo di 4 cicli mentre i pazienti con risposte parziali (RP) fino ad un massimo di 8 cicli. I pazienti hanno ricevuto da 1 a 5 cicli (mediana 2 cicli) con un intervallo mediano tra i cicli di 3 settimane (da 3 a 6 settimane). I tassi di ri-



**Figura 2** - Meccanismo d'azione dell'inotuzumab ozogamicina. 1) L'inotuzumab ozogamicina lega il linfoblasto B che esprime il CD22; 2) il complesso inotuzumab ozogamicina-CD22 viene internalizzato; 3) il CD22 viene riespresso dal linfoblasto; 4) negli endosomi la caliceamicina viene liberata ed attivata per azione enzimatica; 5) la caliceamicina attivata viene trasportata nel nucleo dove si lega al DNA provocando la rottura del doppio filamento ed apoptosi.

sposta globale sono stati del 57%. La maggior parte dei pazienti rispondenti ha ottenuto una risposta, anche in termini di eradicazione della MMR valutata mediante citofluorimetria, entro i primi due cicli. L'OS mediana è di 5,1 mesi. Il 45% dei pazienti è stato successivamente sottoposto ad allo-SCT. Tuttavia, va segnalato che il 59% dei pazienti trapiantati è deceduto per infezione o malattia veno-occlusiva epatica (VOD; 30% dei decessi). Alla luce dell'alta incidenza di VOD, la dose di inotuzumab ozogamicina è stata successivamente ridotta a 0,8 mg/m<sup>2</sup> al giorno +1 e 0,5 mg/m<sup>2</sup> al giorno +8 e +15 di ogni ciclo - per un massimo di 6 cicli<sup>(29)</sup>. Recentemente, Kantarjian et al. hanno riportato i risultati di uno studio internazionale di fase III condotto su 218 pazienti adulti refrattari o recidivati randomizzati per ricevere inotuzumab ozogamicina in monoterapia o chemioterapia (CT.gov: NCT01564784)<sup>(30)</sup>. Analogamente al precedente studio monocentrico<sup>(29)</sup>, l'inotuzumab ozogamicina è stato somministrato ad un dosaggio iniziale di 1,8 mg/m<sup>2</sup> per ciclo: i pazienti ricevevano 0,8 mg al giorno +1 di ciascun ciclo e 0,5 mg al giorno +8 e +15. Raggiunta la RC, il dosaggio del giorno +1 veniva ridotto a 0,5 mg. La durata dei cicli era di 21 giorni per il primo ciclo e di 28 giorni per i cicli successivi. I pazienti potevano ricevere fino ad un massimo di 6 cicli. I tassi di RC e negativizzazione della MMR immunofenotipica sono stati significativamente più alti nel gruppo che aveva ricevuto inotuzumab ozogamicina rispetto a quello che aveva ricevuto chemioterapia standard (80 vs 29% e 78% vs 28%, p<0,001). L'in-

tuzumab ozogamicina ha mostrato maggiore efficacia della chemioterapia in tutti i sottogruppi analizzati, con l'eccezione dei pazienti con t(4;11), nei quali non è stata osservata nessuna differenza tra i 2 trattamenti (33% di RC in entrambi i bracci). La durata della RC è risultata significativamente più lunga per i pazienti trattati con inotuzumab ozogamicina (4,6 vs 3,1 mesi, p=0,03) così come la sopravvivenza libera da progressione (*Progression Free Survival*, PFS) (5 vs 1,8 mesi, p=0,001). Inoltre, un maggior numero di pazienti trattati con inotuzumab ozogamicina ha potuto effettuare un allo-SCT (41% vs 11%). Il beneficio sulla OS è stato invece meno evidente (7,7 mesi vs 6,7, p=0,04): a tal riguardo, è doveroso sottolineare che la maggiore efficacia osservata nei pazienti che hanno ricevuto inotuzumab ozogamicina è verosimilmente sostenuta non solo dell'impiego dell'anticorpo stesso, ma anche dalla possibilità di effettuare un allo-SCT; infatti, le maggiori differenze in termini di OS tra i due regimi terapeutici sono evidenti dal quindicesimo mese in poi.

Pertanto, questi risultati, per quanto promettenti, indicano che tale farmaco dovrebbe essere utilizzato come ponte per un successivo allo-SCT. Gli eventi avversi più comuni sono la neutropenia, la piastrinopenia ed il rialzo degli indici di funzionalità epatica. Tuttavia, mentre la neutropenia e la piastrinopenia di grado III/IV sono state meno frequenti nei pazienti trattati con inotuzumab ozogamicina rispetto alla chemioterapia, la tossicità epatica di grado III o IV è stata più frequente nei pazienti trattati con l'AbMo. In particolare, è stata descritta una maggiore incidenza di VOD durante o subito dopo la sospensione del trattamento con inotuzumab ozogamicina rispetto ai casi trattati con la chemioterapia (11% vs 1%), confermando quanto riportato nello studio monocentrico<sup>(28)</sup>. Nei casi che avevano ricevuto l'AbMo, la VOD è stata particolarmente frequente (21%) dopo allo-SCT e si è verificata precocemente, con un tempo mediano di 16 giorni dal trapianto (range: 3-39 giorni). Attualmente è in corso uno studio di fase I volto a valutare l'efficacia delle inotuzumab ozogamicina in associazione con ciclofosfamide, vincristina e prednisone in pazienti affetti da LLA-B refrattari o recidivati (CT.gov:NCT01925131).

L'inotuzumab ozogamicina è stato anche impiegato in pazienti anziani di nuova diagnosi: l'MDACC ha riportato recentemente, in forma di abstract<sup>(31)</sup>, l'aggiornamento a 24 mesi di uno studio che combina lo schema mini-hyper-CVAD al suddetto AbMo: complessivamente, sono stati trattati 46 pazienti con un'età mediana di 68 anni (range: 60-81). Dei 42 pazienti valutabili, il 95% ha ottenuto una CR o una CR con recupero parziale della conta piastrinica; nel 91% dei casi è stata inoltre ottenuta la negatività della MMR a livello immunofenotipico. Episodi di VOD sono stati documentati in 4 pazienti (9%), uno dei quali post-allo-SCT. I risultati sono estremamente promettenti, con il 65% dei pazienti vivi ed il 61% in RC a 2 anni. Alla stregua di questi risultati, anche il gruppo EWALL (*European Working Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*) sta

disegnando un protocollo di chemioterapia combinato con inotuzumab di prima linea per pazienti anziani.

### AbMo anti-CD19

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 ed il differenziamento delle cellule B normali, promuovendo la leucemogenesi e la capacità di auto-rinnovamento delle cellule neoplastiche. Rappresenta un target ideale in quanto è espresso in tutti i casi di LLA-B con livelli di espressione che variano dal 20% al 98%, indipendentemente dal sottogruppo di appartenenza <sup>(7)</sup>.

La sua ampia espressione sui linfociti B ha favorito lo sviluppo di farmaci immunomodulanti quali il blinatumomab e le CAR-T - oggetto delle prossime sezioni - che stanno rivoluzionando il trattamento delle LLA-B.

### Blinatumomab

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 (Figura 3) <sup>(32)</sup>.

Il blinatumomab presenta un'emivita molto breve, di circa 2 ore, che ne rende necessaria l'infusione continua <sup>(32)</sup>. Induce una rapida deplezione dei linfociti B entro 2 giorni ed una riduzione delle cellule T entro poche ore dall'inizio dell'infusione, che tornano ai valori iniziali o più alti entro 9 giorni dall'inizio della terapia, probabilmente per un effetto di redistribuzione e successiva espansione policlonale dei linfociti T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> attivati. In alcuni casi, si verifica un transitorio rilascio di citochine, in particolare IL-10, IL-6 e INF- $\gamma$ .

Il livello delle citochine in genere decresce dopo 2 giorni e non si verifica dopo il primo ciclo <sup>(33)</sup>.

I primi studi riguardanti l'utilizzo di blinatumomab nell'uomo sono stati condotti su pazienti con LNH refrattari o recidivati <sup>(34, 35)</sup>; nonostante i risultati ottenuti siano stati promettenti, si sono verificati episodi di importante neurotossicità. Il blinatumomab è stato successivamente testato in pazienti con LLA-B, dove ha trovato largo impiego. Il gruppo tedesco ha dapprima valutato l'efficacia del blinatumomab in pazienti adulti (>18 anni senza limite di età) con MMR persistente o in incremento, un sottogruppo ad alto rischio di recidiva <sup>(36)</sup>. Il blinatumomab, somministrato in infusione endovena continua per 4 settimane alla dose di 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$  seguito da 2 settimane di pausa, ha indotto una negativizzazione molecolare della MMR nell'80% dei pazienti entro 4 cicli - la maggior parte dei quali dopo il primo ciclo - ed una EFS a 33 mesi del 61%. Il 45% dei pazienti è stato successivamente sottoposto ad allo-SCT; è importante

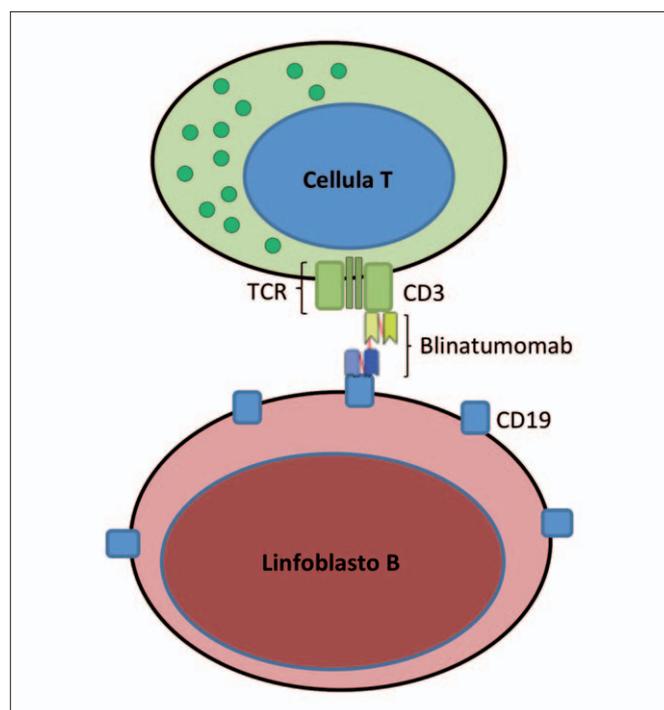


Figura 3 - Meccanismo d'azione del blinatumomab. L'anticorpo si lega da una parte, tramite il CD3, alle cellule T, che vengono attivate, e dall'altra alle cellule B che esprimono il CD19, inducendo un doppio meccanismo di citotossicità.

sottolineare che non sono state osservate differenze statisticamente significative nella sopravvivenza tra i pazienti sottoposti ad allo-SCT o meno, anche nel follow up a lungo termine <sup>(36)</sup>. Successivamente, sono stati completati studi di fase II anche in pazienti refrattari o recidivati ottenendo il 43% di risposte (33% di risposte ematologiche complete e 10% di risposte ematologiche incomplete); il 40% dei rispondenti è riuscito ad essere sottoposto ad allo-SCT <sup>(37, 38)</sup>. Recentemente sono stati pubblicati i risultati del primo studio di fase III randomizzato (studio TOWER) su pazienti affetti da LLA-B refrattaria o recidivata, volto a paragonare l'efficacia del blinatumomab verso la chemioterapia standard (CT.gov:NCT02013167) <sup>(39)</sup>. L'arruolamento è iniziato nel gennaio 2014 ed è stato terminato nel settembre 2015, con 405 pazienti registrati. Di questi, 376 hanno effettuato il trattamento previsto (267 nel braccio blinatumomab e 109 nel braccio chemioterapia). Il follow up mediano è stato di 11 mesi per entrambi i gruppi. Gli autori riportano percentuali di RC significativamente più elevate nei pazienti che hanno ricevuto blinatumomab rispetto ai pazienti trattati con chemioterapia (43% vs 25%) ed un vantaggio di OS (7,7 mesi per blinatumomab vs 4 per chemioterapia,  $p=0,012$ ) che è stato confermato anche dopo censurazione per allo-SCT.

Il blinatumomab è stato testato in pazienti affetti da LLA-B Ph+ refrattari o recidivati (studio ALCANTARA) con risultati promettenti (CT.gov:NCT02000427) <sup>(40)</sup>. Infatti, dei 45 pazienti arruolati, tutti pesantemente pretrattati, 16 (36%) - inclusi 4 pazienti con la mutazione T315I - hanno ottenuto una CR o CRh (con re-

cupero parziale dei valori emocromocitometrici) entro i primi due cicli di trattamento. Nell'88% dei casi si è ottenuta una negativizzazione molecolare della MMR ed il 55% è stato successivamente sottoposto ad allo-SCT. La PFS e la OS sono risultate di 6,7 e 7,1 mesi, rispettivamente.

Dopo *Food and Drug Administration*, FDA e *European Medicines Agency*, EMA, il blinatumomab è stato recentemente approvato in Italia per il trattamento dei pazienti affetti da LLA-B refrattari o recidivati. Inoltre, stanno partendo e/o sono in fase di reclutamento numerosi protocolli clinici, che prevedono l'impiego del blinatumomab nei pazienti di nuova diagnosi, tanto nei casi Ph+ che Ph-. Per quanto riguarda le LLA Ph+ dell'adulto, il GIMEMA ha recentemente aperto all'arruolamento (CT.gov: NCT02744768) un protocollo basato su una induzione con dasatinib (+ steroidi) seguito da almeno due cicli di blinatumomab come consolidamento. L'endpoint primario dello studio è la percentuale di pazienti che ottengono una negativizzazione molecolare della MMR. Studi basati su approcci simili si stanno sviluppando anche a livello internazionale: è in corso uno studio randomizzato di fase III volto a valutare se l'aggiunta del blinatumomab alla chemioterapia di prima linea allunghi la sopravvivenza dei pazienti affetti da LLA-B Ph- rispetto alla sola chemioterapia (CT.gov: NCT02003222).

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), caratterizzata da febbre, brividi, ipotensione e dispnea, e dovuta alla rapida eliminazione delle cellule B da parte delle cellule T citotossiche e dall'attivazione degli stessi durante le fasi iniziali del trattamento. 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 dalla redistribuzione ed attivazione delle cellule T. Inoltre, nel 15-20% dei pazienti sono stati riportati effetti sul sistema nervoso centrale, come atassia, tremori, convulsioni, disorientamento, confusione e disturbi del linguaggio, ed in rari casi encefalopatia. Tali sintomi possono essere anche gravi (grado 3 o 4), ma per lo più reversibili con la sospensione temporanea del farmaco.

Nonostante i risultati ottenuti, una porzione di pazienti sviluppa una resistenza al blinatumomab. Mentre diversi Autori non riportano differenze in termini di numero di linfociti T circolanti e produzione di citochine tra pazienti rispondenti o resistenti al blinatumomab<sup>(32)</sup>, è stato altresì dimostrato che il numero di linfociti T circolanti, in particolare i linfociti T CD3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CD197<sup>-</sup> (i.e. *effector memory* T, TEM) ed in minor misura i linfociti T CD8<sup>+</sup> TEM (con riacquisizione del CD45RA) ed i linfociti T CD4<sup>+</sup> (*central memory* T cells) correlano con la risposta a lungo termine<sup>(41)</sup>.

Inoltre, un recente studio ha dimostrato nei pazienti non-rispondenti un numero più alto di cellule T-reg rispetto ai pazienti rispon-

denti con conseguente riduzione della proliferazione cellulare T e riduzione degli effetti citotossici mediati dalle cellule T CD8<sup>+</sup><sup>(42)</sup>.

È interessante sottolineare che la rimozione delle Treg rende le cellule dei pazienti resistenti sensibili al trattamento con blinatumomab.

Alcuni autori hanno inoltre descritto lo sviluppo di recidive mieloidi o CD19-negative in corso di trattamento con immunomodulanti o, meno frequentemente, al termine del trattamento; quest'ultimo evento non è sorprendente considerando che studi precedenti avevano già descritto rari casi di resistenza al rituximab dovuti allo sviluppo di cloni CD20-negativi<sup>(9,43)</sup>. Diversi meccanismi sarebbero alla base dello sviluppo di recidive CD19-negative, tanto con blinatumomab che a seguito del trattamento con CAR-T.

Il fenomeno è stato attribuito in alcuni casi alla presenza di cloni con mutazioni nel sito di *splicing* a carico dell'esone 2 del CD19-codificante per la porzione extracellulare - con conseguente *splicing* alternativo e produzione di una molecola CD19 tronca<sup>(44)</sup>. In altri casi è stato postulato che l'esposizione ad immunomodulanti anti-CD19 porti ad un meccanismo di riprogrammazione a carico delle cellule staminali leucemiche ed espansione di cloni CD19<sup>-</sup><sup>(45)</sup>. Recentemente, studi *in vitro* hanno documentato un'alterazione del trasporto del CD19 dal reticolo endoplasmatico al citoplasma che potrebbe essere alla base di alcune recidive CD19<sup>-</sup><sup>(46)</sup>.

## Terapia cellulare e CAR-T

Un approccio immunoterapico in via di sviluppo è infine rappresentato dalla terapia cellulare basata principalmente sulle CAR-T, linfociti T ingegnerizzati con recettori diretti contro antigeni tumorali. La terapia cellulare sfrutta la capacità del sistema immunitario, in particolare i linfociti T citotossici e NK, di determinare un'azione citotossica nei confronti di cellule tumorali previo riconoscimento di determinati antigeni. È noto che il rischio di recidiva dopo allo-SCT è inferiore nei pazienti che sviluppano una *graft-versus-host-disease* (GvHD) rispetto ai casi che non la sviluppano.

La *graft-versus-leukemia* (GvL) contribuisce, infatti, all'efficacia dell'allo-SCT e costituisce il razionale per l'infusione dei linfociti del donatore (DLI) in pazienti allotrapiantati. La DLI rappresenta uno dei primi esempi di immunoterapia, utilizzata nei pazienti recidivati dopo allo-SCT, al fine di indurre una nuova remissione di malattia<sup>(47, 48)</sup>. Al fine di evitare le conseguenze della GvHD, sono state sviluppate diverse tecniche per espandere ed infondere linfociti autologhi. È stata, per esempio, dimostrata la possibilità di espandere *in vitro* cellule NK che mantengono l'attività citotossica contro blasti autologhi di pazienti affetti da LLA in remissione ematologica ma non molecolare<sup>(49)</sup>. Attualmente, è in corso uno studio GIMEMA di fase I volto a valutare l'efficacia dell'infusione di cellule NK autologhe arricchite ed espanse in pazienti anziani (>60) affetti da LLA-Ph<sup>+</sup> in RC ma MMR-positivi e non eleggibili per chemio-

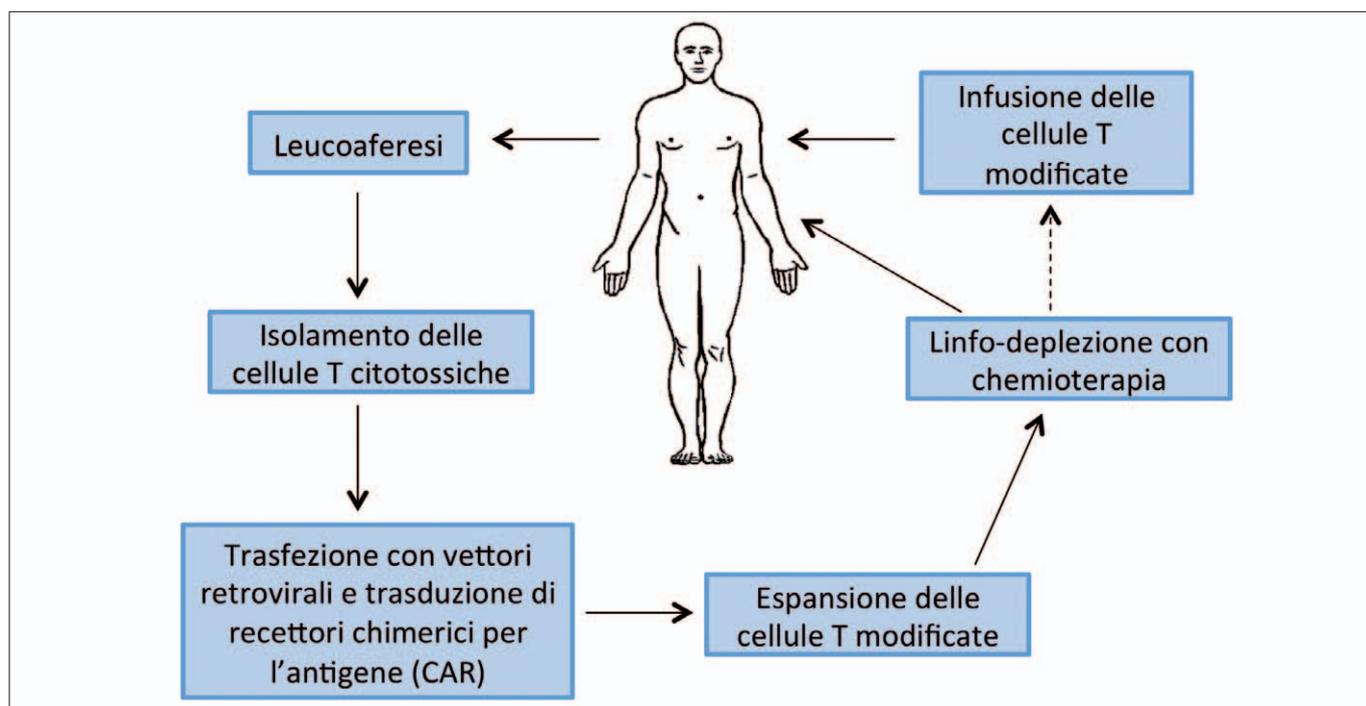


Figura 4 - Preparazione e infusione delle cellule CAR-T.

terapia di consolidamento o allo-SCT (CT.gov: NCT02185781). 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<sup>(50-52)</sup>.

In alternativa al fisiologico TCR, il linfocita T può essere ingegnerizzato 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.

Come mostrato nella Figura 4, le cellule T vengono ottenute mediante leucoaferesi dal paziente, transfettate con lentivirus o gamma-retrovirus ed ingegnerizzate con CAR, espanse e poi infuse nel paziente previa terapia di linfo-deplezione generalmente con fludarabina/ciclofosfamide o sola ciclofosfamide. Le CAR-T sono state rilevate nel paziente - tramite PCR e non citometria a flusso - per periodi variabili da poche settimane a mesi, sebbene la persistenza prolungata sia variabile.

I linfociti CAR-T 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-T 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 pro-

duzione di citochine e di espansione. Recentemente, la combinazione di domini multipli di segnale ha permesso lo sviluppo di CAR-T di terza generazione ad attività ulteriormente incrementata.

Nella LLA, i primi studi con CAR-T dirette contro l'antigene CD19 hanno riportato - tanto nelle casistiche pediatriche che adulte - risultati eccellenti, con tassi di RC compresi tra il 70 e il 94%<sup>(53-59)</sup>, variabili a seconda della popolazione e dello stato di malattia, generalmente molto avanzata. Mentre il follow up dei primi studi era relativamente breve, gli aggiornamenti, che sono stati recentemente riportati sotto forma di abstract, confermano le premesse, e ne dimostrano la fattibilità anche a livello multicentrico<sup>(60-62)</sup>. Lo studio ELIANA, è stato condotto in bambini/giovani adulti (età mediana: 12 anni): degli 88 pazienti arruolati, 68 hanno effettivamente ricevuto le CAR-T: la RC ematologica e immunofenotipica è dell'83%, e l'OS è dell'89% e del 79% a 6 e 12 mesi, rispettivamente.

È importante sottolineare che questo studio era multicentrico e di conseguenza conferma la fattibilità della procedura (inclusa la manifattura ed il trasporto), con percentuali di fallimenti nella produzione delle CAR-T del 7%<sup>(60)</sup>. La fattibilità è stata riportata anche in altri due studi (ZUMA-3 e ZUMA-4)<sup>(61, 62)</sup>.

In ambito adulto, è stato riportato il follow up a 18 mesi di 51 pazienti adulti, 31 MMR-positivi e 20 con malattia morfologica: l'ottenimento della RC è stato del 95% e 77%, rispettivamente (p=ns), mentre l'EFS e l'OS mediane sono significativamente differenti per i pazienti che ottenevano la negatività della MMR o meno (non raggiunta e 6,7 mesi, e non raggiunta e 17 mesi, rispettivamente); il successivo allo-SCT non sembra migliorare la prognosi<sup>(63)</sup>.

È doveroso sottolineare che tutti gli studi riportano un'elevata incidenza di importanti effetti collaterali, caratterizzati dalla possibile comparsa della CRS - talvolta complicate da shock anafilattico - che richiedono la disponibilità di un'unità di terapia intensiva, dalla neurotossicità, in alcuni casi fatale, da linfocitopenie B prolungate. L'impiego del tocilizumab (anticorpo anti-IL6) e degli steroidi per il trattamento della CRS e della neurotossicità, rispettivamente, sono in grado di mitigare tali effetti, e non sembrano interferire con l'attività delle CAR-T.

## LLA a derivazione T

A differenza dell'ampio armamentario terapeutico disponibile oggi per le LLA-B, sono stati sviluppati pochi farmaci, in particolare immunoterapici, diretti contro le cellule di LLA-T. Tra gli AbMo valutati in studi clinici ricordiamo l'alemtuzumab e l'isatuximab.

L'alemtuzumab è un AbMo nudo chimerico diretto contro il CD52, un antigene espresso tanto dalle cellule B che T. Il suo utilizzo è stato valutato in pochi trials riguardanti sia le LLA-B che -T, con risultati parziali e con una importante tossicità, soprattutto ematologica ed un alto rischio di infezioni che ne hanno giustificato l'abbandono nella pratica clinica <sup>(64-66)</sup>.

Studi preclinici hanno dimostrato l'efficacia degli anti-CD38 nel ridurre sia la crescita di linee cellulari di LLA-B e LLA-T con alta espressione di CD38, sia la massa tumorale in modelli murini <sup>(67, 68)</sup>. È in corso uno studio di fase II per valutare l'efficacia dell'isatuximab, un AbMo nudo completamente umanizzato diretto contro il CD38, in pazienti affetti da LLA-T in recidiva o refrattari (CT.gov: NCT02999633).

Un gruppo cinese ha recentemente sviluppato un AbMo anti-CD7 coniugato con l'immunotossina A dello *Pseudomonas* che si è dimostrato efficace nel ridurre la crescita cellulare di linee cellulari CD7 positive e cellule primarie di pazienti affetti da LLA-T <sup>(69)</sup>.

Le CAR-T dirette contro antigeni T-linfocitari sono attualmente in fase pre-clinica. La difficoltà nel produrre CAR-T dirette contro antigeni T risiede nella più grave immunodeficienza che si instaura in caso di deplezione T-linfocitaria rispetto all'aplasia delle cellule B indotta dalle CAR-T dirette contro il CD19. Inoltre, l'espressione di antigeni comuni tra le CAR-T ed i blasti T potrebbe indurre delle reazioni contro le CAR-T stesse e quindi ridurre l'efficacia. Diversi gruppi hanno sviluppato delle CAR - sia prodotte per espansione di cellule T che NK - dirette contro il CD5, un antigene espresso da quasi tutti i sottotipi di LLA-T, LNH-T ed alcuni LNH-B ma non dalle cellule staminali emopoietiche e dalle cellule NK <sup>(70,71)</sup>. Le CAR prodotte tramite espansione di NK avrebbero il vantaggio di eliminare i problemi di cross-reattività. Entrambe le molecole sono risultate efficaci nel ridurre la crescita cellulare di linee cellulari CD5<sup>+</sup> e la massa tumorale in xenograft murini.

## Conclusioni

Lo sviluppo dell'immunoterapia sta aprendo nuove prospettive terapeutiche per i pazienti affetti da LLA-B in diverse fasi della malattia. Nonostante i dati promettenti, il rituximab è attualmente l'unico AbMo approvato in Italia per il trattamento di un sottogruppo specifico di LLA-B - la LLA di tipo Burkitt - di cui ne ha completamente rivoluzionato la prognosi.

Soltanto recentemente, il blinatumomab è stato approvato per i casi di LLA-B refrattari/recidivati. Tuttavia, sembra offrire una terapia assai efficace non solo per i casi recidivati/refrattari ma anche per quelli con MMR persistente, qualificandosi, quindi, come uno dei farmaci più promettenti per la cura delle LLA-B, congiuntamente all'inotuzumab ozogamicina, non ancora approvato. 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-SCT. Inoltre, vista la buona tollerabilità di questo farmaco, anche pazienti anziani o comunque non eleggibili a terapie intensive o allo-SCT potranno beneficiare del suo utilizzo. L'ampliamento delle casistiche e la maggiore esperienza clinica aiuteranno a chiarire diversi quesiti tutt'oggi aperti circa i nuovi agenti immunoterapici.

Per quanto i risultati pubblicati siano promettenti, non è chiaro se la risposta ai suddetti anticorpi sia simile nei vari sottogruppi molecolari. In particolare, saranno necessari studi clinici che ne valutino l'efficacia in specifici sottogruppi quali i casi *Ph-like* o con riarrangiamenti di KMT2A (alias ALL-1).

Gli studi clinici che sono in corso di attivazione, valuteranno l'efficacia e la fattibilità di regimi poli-immunoterapici o di associazione tra AbMo o specifici inibitori ed aiuteranno a comprendere quale sia il più giusto *timing* nell'usare questi farmaci.

Sarà necessario chiarire la fattibilità dell'impiego sequenziale/combinato dei diversi anticorpi, alla luce dei dati acquisiti. Sembra infatti evidente che l'inotuzumab ozogamicina induca un maggior tasso di RC, ma meno sostenute e peristenti, mentre il blinatumomab induce risposte molecolari più durature. La combinazione dei due anticorpi potrebbe essere un valido approccio per il trattamento delle recidive ematologiche. Pazienti ad alto rischio o in recidiva hanno spesso localizzazioni extramidollari. Non vi sono ancora studi in merito alla capacità del blinatumomab - o in generale degli agenti immunoterapici - nel diffondere nei tessuti o di approcci combinati chemio-immunoterapici efficaci per tali pazienti.

Con l'uso degli AbMo stanno emergendo nuovi meccanismi di resistenza che dovranno essere oggetto dei prossimi studi al fine di sviluppare molecole sempre più efficaci e di ridurre - o prevenire - i casi di resistenza.

Infine, è auspicabile che nel prossimo futuro si sviluppino molecole efficaci e con limitata tossicità specifiche per la LLA-T.

## Bibliografia

- DeAngelo DJ, Stevenson KE, Dahlberg SE, Silverman LB, Couban S, Supko JG, et al. Long-term outcome of a pediatric-inspired regimen used for adults aged 18-50 years with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015; 29(3):526-34.
- Huguet F, Leguay T, Thomas X, Boissel N, Escoffre-Barbe M, Chevallier P, et al. The upper age limit for a pediatric-inspired therapy in younger adults with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia (ALL). Analysis of the GRAAL-2005 Study. *ASH Annual Meeting Abstract*. 2016;128(22):762.
- 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 (ALLMRD2002 Study). *J Hematol Oncol*. 2013;6:14.
- 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 MRD in adult ALL. *Blood*. 2009;113(18):4153-62.
- Goekbuget N, Kneba M, Raff T, Trautmann H, Bartram CR, Arnold R, et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012;120(9):1868-76.
- Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Different molecular levels of post-induction minimal residual disease may predict hematopoietic stem cell transplantation outcome in adult Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4:e225.
- 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.
- Dworzak MN, Schumich A, Printz D, Pötschger U, Husak Z, Attarbaschi A, et al. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood*. 2008;112(10):3982-8.
- Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H, et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1561-70.
- Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Garcia-Manero G, et al. Chemoimmunotherapy 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, Pittaluga 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.
- 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.
- Maurly S, Chevret S, Thomas X, Heim D, Leguay T, Huguet F, et al. Rituximab in B-Lineage adult acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2016;375 (11):1044-53.
- Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1101-10.
- Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1749-55.
- Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A, et al. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood*. 2012;119(15):3523-33.
- Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(22):4393-402.
- Awasthi A, Ayello J, Van de Ven C, Elmacken M, Sabulski A, Barth MJ, et al. Obinutuzumab (GA101) compared to rituximab significantly enhances cell death and antibody-dependent cytotoxicity and improves overall survival against CD20(+) rituximab-sensitive/-resistant Burkitt lymphoma (BL) and precursor B-acute lymphoblastic leukaemia (pre-B-ALL): potential targeted therapy in patients with poor risk CD20(+) BL and pre-B-ALL. *Br J Haematol*. 2015; 171(5):763-75.
- Sasaki K, Kantarjian HM, Ravandi F, Daver N, Kadia TM, Khouri RB, et al. Frontline ofatumumab in combination with Hyper-CVAD for adult patients with CD-20 positive acute lymphoblastic leukemia (ALL): Interim Result of a Phase II Clinical Trial. *ASH Annual Meeting Abstract*. 2016;128(22):2783.
- Santos L, Draves K, Botton M, Grewal PK, Marth JD, Clark EA. Dendritic cell-dependent inhibition of B cell proliferation requires CD22. *J Immunol*. 2008; 180(7):4561-9.
- Raetz EA, Cairo MS, Borowitz MJ, Lu X, Devidas M, Reid JM, et al. Re-induction chemoimmunotherapy with epratuzumab in relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL): phase II results from Children's Oncology Group (COG) study ADVL04P2. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(7):1171-5.
- Chevallier P, Huguet F, Raffoux E, Etienne A, Leguay T, Isnard F et al. Vincristine, dexamethasone and epratuzumab for older relapsed/refractory CD22+ B-acute lymphoblastic leukemia patients: a phase II study. *Haematologica*. 2015;100 (4):e128-31.
- Chevallier P, Chantepie S, Huguet F, Raffoux E, Thomas X, Leguay T, et al. Hyper-CVAD + epratuzumab as salvage regimen for younger patients with relapsed/refractory CD22+ precursor B-cell ALL. *Haematologica*. 2017;102(5): e184-6.
- Advani AS, McDonough S, Coutre S, Wood B, Radich J, Mims M, et al. SWOG S0910: a phase 2 trial of clofarabine/cytarabine/epratuzumab for relapsed/refractory acute lymphocytic leukemia. *Brit J Haematol*. 2014;165(4):504-9.
- Advani A, Coiffier B, Czuczman MS. Safety, pharmacokinetics, and preliminary clinical activity of inotuzumab ozogamicin, a novel immunocjugate for the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase I study. *J Clin Oncol*. 2010;28(12):2085-93.
- Dijoseph JF, Armellino DC, Boghaert ER, Khandke K, Dougher MM, Sridharan L, et al. Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunocjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. *Blood*. 2004;103(5):1807-14.
- 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.
- Jabbour E, O'Brien S, Huang X, Thomas D, Rytting M, Sasaki K, et al. Prognostic factors for outcome in patients with refractory and relapsed acute lymphocytic leukemia treated with inotuzumab ozogamicin, a CD22 monoclonal antibody. *Am J Hematol*. 2015;90(3):193-6.
- Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard therapy for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2016;375(8):740-53.
- Sasaki K, Jabbour EJ, O'Brien SM, Ravandi F, Thomas DA, Garcia-Manero G, et al. Inotuzumab ozogamicin in combination with low-Intensity chemotherapy (mini-hyper-CVD) as frontline therapy for older patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL): interim result of a phase II clinical trial. *ASH Annual Meeting Abstract*. 2016;128(22):588.
- Haas C, Krinner E, Brischwein K, Hoffmann P, Lutterbüse R, Schlereth B, et al. Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. *Immunobiology*. 2009;214(6):441-53.

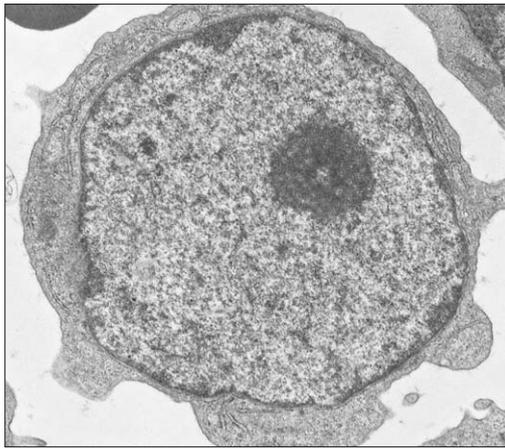
33. Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou RC, Topp MS, et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood*. 2012;119(26):6226-33.
34. Goebeler ME, Knop S, Viardot A, Kufer P, Topp MS, Einsele H, et al. A bispecific T-Cell engager (BiTE) antibody construct blinatumomab for the treatment of patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma: final results from a phase I Study. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1104-11.
35. Viardot A, Goebeler ME, Hess G, Neumann S, Pfreundschuh M, Adrian N, et al. Phase 2 study of the bispecific T-cell engager (BiTE) antibody blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2016;127(11):1410-6.
36. Gökbuğet N, Zugmaier G, Klinger M, Kufer P, Stelljes M, Viardot A, et al. Long-term relapse-free survival in a phase 2 study of Blinatumomab for the treatment of patients with minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2017;102(4):e132-5.
37. Topp MS, Gökbuğet 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.
38. Topp MS, Gökbuğet 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.
39. Kantarjian H, Stein A, Gökbuğet N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376(9):836-47.
40. Martinelli G, Boissel N, Chevallier P, Ottmann O, Gökbuğet N, Topp MS, et al. Complete hematologic and molecular response in adult Patients with relapsed/refractory Philadelphia Chromosome-Positive B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Following Treatment With Blinatumomab: Results From a Phase II, Single-Arm, Multicenter Study. *J Clin Oncol*. 2017;35(16):1795-802.
41. Zugmaier G, Gökbuğet N, Klinger M, Viardot A, Stelljes M, Neumann S, et al. Long-term survival and T-cell kinetics in relapsed/refractory ALL patients who achieved MRD response after blinatumomab treatment. *Blood*. 2015;126(24):2578-84.
42. Duell J, Dittrich M, Bedke T, Mueller T, Eisele F, Rosenwald A, et al. Frequency of regulatory T cells determines the outcome of the T-cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL. *Leukemia*. 2017, Epub. doi: 10.1038/leu.2017.41.
43. Davis T, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res*. 1999;5(3):611-5.
44. Fischer J, Paret C, El Malki K, Alt F, Wingarter A, Neu MA, et al. CD19 isoforms enabling resistance to CART-19 immunotherapy are expressed in B-ALL patients at initial diagnosis. *J Immunother*. 2017;40(5):187-95.
45. Gardner R, Wu D, Cherian S, Fang M, Hanafi LA, Finney O, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*. 2016;127(20):2406-10.
46. Braig F, Brandt A, Goebeler M, Tony HP, Kurze AK, Nollau P, et al. Resistance to anti-CD19/CD3BiTE in acute lymphoblastic leukemia may be mediated by disrupted CD19 membrane trafficking. *Blood*. 2017;129(1):100-4.
47. Choi SJ, Lee JH, Kim S, Lee YS, Seol M, Ryu SG, et al. Treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: a prospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36(2):163-9.
48. Loren AW, Porter DL. Donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(5):483-93.
49. Torelli GF, Guarini A, Maggio R, Alfieri C, Vitale A, Foà R. Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission. *Haematologica*. 2005;90(6):785-92.
50. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ, Younes A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(1):25-40.
51. Wang Z, Wu Z, Liu, Y, Han W. New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):53.
52. 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.
53. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2123-38.
54. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2015;385(9967):517-28.
55. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra225.
56. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-17.
57. Brudno JN, Somerville RP, Shi V, Rose JJ, Halverson DC, Fowler DH, et al. Allogeneic T Cells that express an anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of B-Cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-Cell transplantation without causing graft-versus-host disease. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1112-21.
58. Pan J, Yang J, Deng B, Zhao X, Zhang X, Lin Y, et al. High efficacy and safety of low dose CD19-directed CAR-T cell therapy in 51 refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia*. 2017, Epub ahead of print. doi: 10.1038/leu.2017.145.
59. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2013;5(177):177ra38.
60. Buechner J, Grupp SA, Maude SL, Boyer M, Bittencourt H, Laetsch TW, et al. Global registration trial of efficacy and safety of CTL019 in pediatric and young adult patients with relapsed/refractory (r/r) acute lymphoblastic leukemia (ALL): update to the interim analysis. *European Hematology Association Annual Congress Abstracts*. 2017;102(s2):s476.
61. Shah B, Wierda WG, Schiller GJ, Bishop MR, Castro JE, Sabatino M, et al. KTE-C19 chimeric antigen receptor (car) T cell therapy in adults with high-burden relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (R/R ALL): updated results from phase 1/2 of ZUMA-3. *European Hematology Association Annual Congress Abstracts*. 2017;102(s2):p523.
62. Lee DW, Wayne AS, Huynh V, Handgretinger R, Brown PA, Pieters R, et al. Updated results from ZUMA-4: a phase1/2 study of KTE-C19 chimeric antigen receptor (car) t cell therapy in pediatric and adolescent patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *European Hematology Association Annual Congress Abstracts*. 2017;102(s2):E840.
63. Park J, Riviere I, Wang X, Senechal Y, Wang Y, Purdon T, et al. Durable long-term survival of adult patients with B-ALL after CD19 CAR (19-28Z) T cell therapy. *European Hematology Association Annual Congress Abstracts*. 2017;102(s2):s479.
64. Angiolillo AL, Yu AL, Reaman G, Ingle AM, Secola R, Adamson PC. A phase II study of Campath-1H in children with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group report. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(6):978-983.
65. Stock W, Sanford B, Lozanski G, Vij R, Byrd JC, Powell BL, et al. Alemtuzumab can be incorporated into front-line therapy of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): final phase I results of a Cancer and Leukemia Group B Study (CALGB 10102). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2009;114(1):838.
66. Stock W, Yu D, Sanford B, Lozanski G, Cataland S, Vij R, et al. Incorporation of alemtuzumab into front-line therapy of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) is feasible: a phase I/II study from the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 10102). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2005;106(1):145.
67. Deckert J, Wetzel MC, Bartle LM, Skaletskaya A, Goldmacher VS, Vallée F, et al.

SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2014;20(17):4574-83.

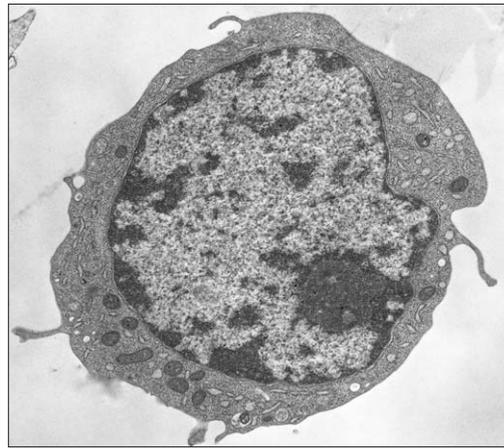
68. Doshi P, Sasser AK, Axel A, Lammerts van Bueren J. Daratumumab treatment alone or in combination with vincristine results in the inhibition of tumor growth and long term survival in preclinical models of acute lymphocytic leukemia. *European Hematology Association Annual Congress Abstract.* 2014;99(s1):P109.
69. Yu Y, Li J, Zhu X, Tang X, Bao Y, Sun X, et al. Humanized CD7 nanobody-based

immunotoxins exhibit promising anti-T-cell acute lymphoblastic leukemia potential. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:1969-83.

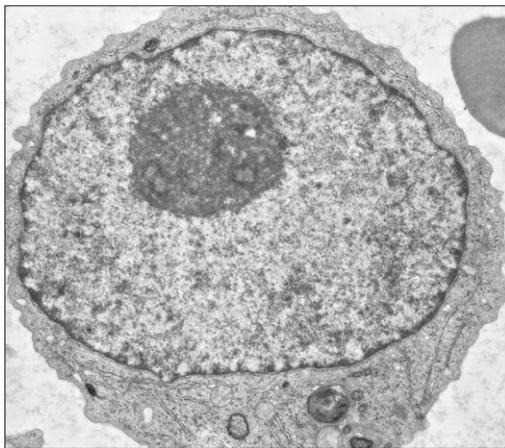
70. Mamonkin M, Rouse RH, Tashiro H, Brenner MK. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood.* 2015;126(8):983-92.
71. Chen KH, Wada M, Pinz KG, Liu H, Lin KW, Jares A, et al. Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor. *Leukemia.* 2017. Epub. doi: 10.1038/leu.2017.8.



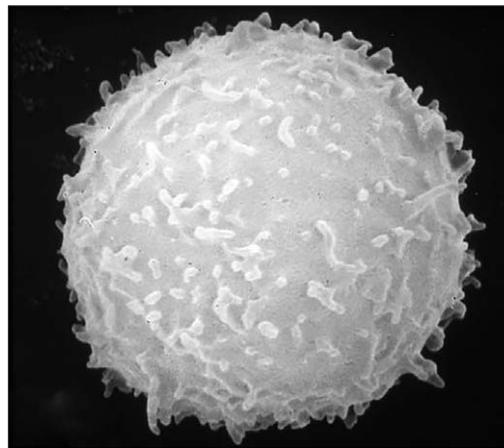
LLA-B: linfoblasto al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilier).



LLA-B: linfoblasto al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilier).



LLA-T: linfoblasto al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Delilier).



LLA-T: linfoblasto al ME a scansione (Archivio di G. Lambertenghi Delilier).

### Parole Chiave

Leucemia linfoblastica acuta, farmaci bersaglio, immunoterapia, adulti, malattia minima residua

### 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.

### Indirizzi per la corrispondenza

**Sabina Chiaretti**

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: [chiaretti@bce.uniroma1.it](mailto:chiaretti@bce.uniroma1.it)



*La rivista è consultabile anche sui siti web:*

Fondazione Matarelli

**[www.fondazionematarelli.it](http://www.fondazionematarelli.it)**

Società Italiana di Ematologia (SIE)

**[www.siematologia.it](http://www.siematologia.it)**

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)

**[www.siesonline.it](http://www.siesonline.it)**

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini

**[www.beat-leukemia.com](http://www.beat-leukemia.com)**

*Nel prossimo numero: Anno 5 - Numero 1 - 2018*

## **Linfomi a grandi cellule**

Definizione istologica

Patogenesi

Quadro clinico

Terapia

Clinica e terapia in età pediatrica

*Con il supporto non condizionato di*

