

Anno 2 - Numero 2 - 2015

Ematologia **Oncologica.it**

Farmaci bersaglio (I)

Organo Ufficiale
della **Fondazione Matarrelli** - Milano

Con il supporto non condizionato di



Farmaci bersaglio (I)

Dalla biologia alle terapie mirate

Maurizio D'Incalci, Mario Negri, Elena Monti

7

Leucemia mieloide cronica

Fabrizio Pane, Roberta Della Pepa, Barbara Izzo, Luigia Luciano

29

Leucemia linfatica cronica

Maria Ciccone, Antonio Cuneo

51

Neoplasie mieloproliferative Ph-

Alessandro M. Vannucchi, Lisa Pieri, Chiara Paoli, Paola Guglielmelli

63

Linfomi maligni

Davide Rossi

75

Ematologia Oncologica.it

Vol 2 - n.2 - 2015

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.

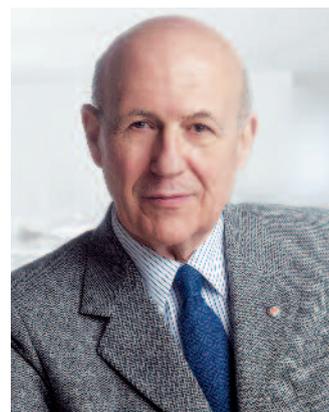
Capitoli di libri

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 Deliliers
Fondazione Matarrelli - Milano



Dopo la scoperta dell'acido trans-retinoico e dell'imatinib, l'arsenale terapeutico per le neoplasie ematologiche nel corso di questi ultimi anni si è rapidamente arricchito. Ciò è dovuto alla identificazione di numerosi marcatori molecolari e allo sviluppo della cosiddetta medicina di precisione. Obiettivo di *Ematologia Oncologica.it* è riassumere le conoscenze biologiche che hanno portato alla sintesi dei farmaci bersaglio, rivolti contro quelle anomalie genomiche che svolgono un ruolo cruciale per la crescita o la progressione dei tumori, e discutere i dati sulla loro efficacia clinica nelle emopatie più frequenti. L'analisi verrà allargata ad altre patologie in un altro numero della rivista dell'anno 2016.

Il primo grande successo dell'approccio mirato all'inibizione di chinasi oncogeniche è stato riportato nella leucemia mieloide cronica, oggi trasformata in una malattia controllabile con una terapia orale. Più recentemente diversi farmaci di seconda e terza generazione sono entrati nella pratica clinica, in grado di vincere la resistenza primaria o secondaria all'imatinib e ridurre notevolmente i livelli di malattia residua. Infatti, grazie anche all'evoluzione tecnologica, oggi è possibile individuare pazienti che hanno raggiunto risposte citogenetiche e molecolari profonde, così da tentare l'interruzione del trattamento. Oltre all'efficacia terapeutica, altri fattori come la tollerabilità e l'incidenza di eventi avversi devono guidare la scelta dell'inibitore tirosin-chinasico più appropriato nell'ambito dei cinque oggi disponibili.

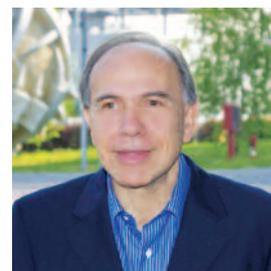
Anche nelle neoplasie del tessuto linfoide i farmaci bersaglio hanno migliorato le possibilità di cura nei pazienti portatori di anomalie genetiche primarie e secondarie. L'obiettivo terapeutico può essere raggiunto inducendo una citotossicità anticorpo mediata, inibendo le tirosin-chinasi che mediano la trasduzione dei segnali di attivazione linfocitaria, potenziando con farmaci immunomodulanti l'attività citotossica dei linfociti T e NK, neutralizzando l'azione anti-apoptotica di BCL2 e, più recentemente, attraverso la trasdu-

zione dei linfociti T autologhi con il metodo di infezione retrovirale. Risultati ancora preliminari evidenziano che nella leucemia linfatica cronica i farmaci bersaglio hanno migliorato la sopravvivenza di alcuni pazienti con lesioni genetiche sfavorevoli fino ad eradicare la malattia minima residua. In alcuni sottogruppi di linfomi maligni i risultati più promettenti si sono ottenuti con l'inibitore della tirosin-chinasi di Bruton. Tuttavia nelle neoplasie linfatiche questioni aperte sono ancora il controllo della tossicità dei trattamenti, la durata della risposta, lo sviluppo di sub-cloni resistenti e, non trascurabile, l'impatto economico sul sistema sanitario nazionale.

L'identificazione dell'abnorme attivazione della via JAK/STAT nei pazienti con neoplasie mieloproliferative croniche ha stimolato la ricerca di molecole dotate della capacità di inibire la proteina JAK2. Si tratta di inibitori verso la proteina sia mutata che normale; ciò rappresenta un vantaggio in quanto possono essere utilizzati indipendentemente dalla mutazione V617F, ma anche rende ragione della loro tossicità dovuta all'inibizione della emopoiesi fisiologica. Ruxolitinib è il primo JAK2 inibitore approvato che ha dimostrato una rimarchevole attività sul controllo della massa eritrocitaria nella policitemia vera e della splenomegalia nella mielofibrosi. Tuttavia la possibilità di eventi avversi legati alla citopenia secondaria e l'effetto modesto sui meccanismi biologici della patologia di base, hanno stimolato la sintesi di altri JAK inibitori, attualmente in fase di sperimentazione clinica.

In conclusione, la genetica molecolare ha permesso di identificare farmaci che nelle neoplasie ematologiche agiscono con nuovi meccanismi d'azione. Stanno emergendo fenomeni di resistenza per la selezione di cloni cellulari che esprimono bersagli molecolari non più sensibili. Pertanto sono in corso di sperimentazione regimi di combinazione con chemioterapici tradizionali che colpiscono il DNA e con altre sostanze più indirizzate al microambiente tumorale e al controllo immunitario.

Dalla biologia alle terapie mirate



Maurizio D'Incalci¹, Elena Monti²,

¹Dipartimento di Oncologia, IRCCS – Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano

²Dipartimento di Scienze Teoriche e Applicate, Sezione di Ricerca Biomedica
Università degli Studi dell'Insubria, Busto Arsizio, Varese

Introduzione

Negli ultimi trent'anni abbiamo assistito a un'esplosione di conoscenze sulla biologia molecolare dei tumori, che hanno modificato radicalmente la ricerca farmacologica in questo campo. Fino agli anni 1980, la scoperta di nuovi farmaci antitumorali si basava prevalentemente sullo screening di composti che venivano testati su tumori murini a rapida crescita, come la leucemia P388 o la L1210, che erano molto riproducibili e permettevano di ottenere risultati in tempi brevi. Utilizzando questi modelli sperimentali, il *National Cancer Institute* americano, anche in collaborazione con alcuni Istituti di ricerca in Europa, aveva per molti anni attuato uno screening di centinaia di migliaia di composti, sia naturali che di sintesi⁽¹⁾. Attraverso questo tipo di screening, che includeva composti sintetizzati in base a un razionale biochimico, si identificarono farmaci, quali gli agenti alchilanti, che modificano chimicamente il DNA, antimetaboliti, che agiscono inibendo la sintesi di DNA, e antimitotici. Alcuni di questi, somministrati in combinazione, hanno prodotto risultati importanti in campo ematologico, portando alla guarigione di pazienti affetti da alcuni tipi di leucemie e linfomi. Gli stessi farmaci furono anche impiegati per la terapia dei tumori solidi metastatici, ma con risultati certamente meno eclatanti di quelli ottenuti nelle neoplasie ematologiche, facendo nascere il sospetto che il sistema di screening non fosse adeguato per identificare in modo efficiente composti attivi contro tumori solidi umani, a causa delle differenze biologiche tra questi e i modelli di leucemie murine utilizzati per lo screening primario. Incominciava anche a farsi strada l'idea che il termine tumore comprendesse entità patologiche molto diverse tra loro, sia dal punto di vista clinico che da quello biologico, e che fosse necessario tener conto di queste differenze per identificare farmaci più efficaci. Si è quindi intrapreso un programma di screening primario utilizzando 60 linee cellulari derivate da tumori umani di diversa origine. Queste venivano esposte a concentrazioni crescenti dei composti in esame per 48 ore, a seguito delle quali venivano definite le concentrazioni in grado di inibire la crescita (GI50) e

quelle che risultavano citotossiche (IC50) per il 50% delle cellule. Questo enorme esperimento, condotto su milioni di composti, ha prodotto risultati scientificamente importanti, ad esempio mostrando che per composti che avevano lo stesso meccanismo d'azione esisteva un pattern di sensibilità simile, mentre se un composto si comparava negativamente con tutti gli altri che erano stati precedentemente testati, si poteva desumere che agisse con un meccanismo inedito. La caratterizzazione molecolare delle 60 linee permetteva in alcuni casi di ipotizzare quale fosse il meccanismo d'azione di un nuovo composto sulla base del pattern di sensibilità di alcune linee cellulari^(2,3). Questo tipo di informazione era di grande potenziale importanza, in quanto farmaci con un meccanismo d'azione diverso da quelli dei farmaci già disponibili avrebbero potuto mostrare attività antitumorale contro tumori scarsamente sensibili a questi ultimi. Inoltre, al di là del tipo istologico del tumore da cui provenivano le diverse linee cellulari, alcune analogie di sensibilità potevano verosimilmente dipendere da alterazioni specifiche presenti in quel tipo di tumore.

Mentre questi sistemi di screening più o meno modificati venivano applicati allo sviluppo di nuovi farmaci, si assisteva ad un rapido progresso nel campo della biologia molecolare e cellulare dei tumori. La scoperta degli oncogeni e dei geni soppressori e la caratterizzazione di alterazioni funzionali di *pathways* implicati nella trasduzione dei segnali che distinguono le cellule tumorali da quelle normali ha reso possibile in linea teorica immaginare che ci possano essere composti in grado di colpire in modo selettivo le cellule tumorali senza causare tossicità sulle cellule normali.

Come vedremo, l'applicazione di questo approccio ha radicalmente modificato la scoperta di nuovi farmaci antitumorali. Esamineremo qui come con alcuni di questi farmaci, principalmente diretti ad inibire alcune chinasi, si sia raggiunto un buon grado di selettività, mentre nel caso di altri bersagli, teoricamente altrettanto cruciali per la crescita e la metastatizzazione dei tumori (p.e. numerosi fattori trascrizionali), il successo è stato più limitato, anche se si intravedono alcune novità incoraggianti.

Farmaci convenzionali e farmaci a bersaglio molecolare

È da sottolineare come per la maggioranza dei tumori solidi la terapia antitumorale sia ancora principalmente basata su farmaci convenzionali e come l'aggiunta di farmaci a bersaglio molecolare non abbia prodotto, se non in un esiguo numero di casi, un miglioramento reale dell'efficacia del trattamento antineoplastico. Perché mettiamo tra virgolette i farmaci a bersaglio molecolare? Perché praticamente tutti i farmaci attivi agiscono su specifici bersagli molecolari. Nel linguaggio corrente dell'oncologo medico si è fatta strada una terminologia secondo la quale vi è una netta separazione, che nella maggioranza dei casi è fittizia, tra farmaci convenzionali e nuovi farmaci, che non hanno come target il DNA, o enzimi coinvolti nella sintesi o nella funzionalità degli acidi nucleici, o la tubulina.

In realtà, anche i nuovi farmaci per la maggior parte inibiscono molecole che sono espresse e hanno un ruolo fisiologico anche nei tessuti normali. Anche l'imatinib, farmaco emblematico di questa nuova generazione e disegnato per colpire una proteina che è espressa esclusivamente nelle cellule tumorali (si veda oltre), non agisce sfruttando l'unicità del bersaglio, ma inibendone l'attività catalitica, che opportunamente regolata ha un ruolo importante anche nelle cellule normali. In questo contesto, risulta quasi più difficile spiegare il successo ottenuto con questi farmaci in un numero limitato di tipi tumorali, piuttosto che i risultati molto meno clamorosi ottenuti negli altri tipi. Per rendere ragione di questo apparente paradosso è stato sviluppato il concetto di dipendenza oncogenica (*oncogene addiction*)⁽⁴⁾, in base al quale una cellula tumorale che presenti un'alterazione *driver*, quale p.e. l'attivazione costitutiva di un oncogene, riprogramma i propri circuiti di trasduzione del segnale in funzione del *pathway* aberrante: l'abolizione o inibizione di quest'ultimo ha quindi un effetto distruttivo per la cellula tumorale, mentre la cellula normale, che mantiene la funzione di vie parallele e talora ridondanti per trasmettere uno stesso tipo di segnale, subisce generalmente solo una momentanea perturbazione.

Ci sembra utile a questo punto fare qualche considerazione sul meccanismo d'azione dei farmaci convenzionali, per stimolare gli oncologi a non accogliere senza spirito critico alcune distinzioni e classificazioni che non sono del tutto giustificate scientificamente. Una prima considerazione è che per la maggior parte i farmaci antitumorali convenzionali hanno come target il DNA, sia legandosi direttamente ad esso, sia indirettamente, inibendo enzimi implicati nella sintesi, nella riparazione o nella trascrizione del DNA. È evidente che l'inibizione della sintesi del DNA blocca la crescita di un tessuto a rapida proliferazione e questo spiega perché molti dei farmaci convenzionali abbiano una tossicità midollare e gastrointestinale. C'è da sottolineare però come non ci sia una relazione chiara tra attività dei farmaci e velocità di crescita dei tumori solidi. Questo perché i farmaci efficaci contro un certo tipo di tumore sono tali

perché dotati di un certo grado di selettività, che non riguarda unicamente l'indice proliferativo e i cui meccanismi sono solo in parte conosciuti. Non sappiamo con certezza perché il cisplatino porti a guarigione la maggioranza dei pazienti con tumore del testicolo⁽⁵⁾, anche se metastatici, ma poiché il farmaco reagisce con il DNA delle cellule tumorali del carcinoma testicolare formando *crosslinks* nel DNA in modo analogo a quello che avviene in altri tessuti, si ritiene che la particolare suscettibilità sia da attribuirsi alla risposta di quel particolare tipo di cellule, sia in termini di riparazione dei danni al DNA che di induzione di morte cellulare. Il grado di selettività di ogni farmaco è attribuibile quindi a particolarità biologiche e biochimiche dei diversi tumori. Ad esempio, per farmaci che agiscono danneggiando il DNA è evidente come i meccanismi di riparazione del DNA, che sembrano essere inefficienti in alcuni tumori, possano giocare un ruolo importante. Sappiamo oggi che in una percentuale rilevante di tumori dell'ovaio e della mammella vi sono mutazioni dei geni BRCA1 o BRCA2, che partecipano al meccanismo di ricombinazione omologa (HR); in questi tumori si osserva una elevata sensibilità al cisplatino e ai suoi derivati, perché viene meno il principale meccanismo di riparazione dei danni al DNA prodotti da questi composti. In pratica, l'efficacia clinica di un farmaco, determinata attraverso sperimentazioni cliniche, è dovuta a particolarità biologiche del tumore, molte delle quali tuttora sconosciute e che solo recentemente si stanno cominciando a chiarire. Un esempio interessante per illustrare questo concetto è quello relativo allo sviluppo di inibitori dell'enzima poli-ADP ribosio polimerasi (PARP)⁽⁶⁻⁸⁾. Questi composti sembrano essere attivi nei tumori che hanno mutazioni di BRCA1 e BRCA2, come alcune forme di carcinoma dell'ovaio, per le quali recentemente è stato registrato in Europa il primo farmaco di questa classe, con il nome di olaparib⁽⁹⁾. I farmaci di questa classe, certamente interessanti perché posseggono un meccanismo differente da quello dei composti già disponibili in terapia, sono per molti oncologi il prototipo di farmaci a bersaglio molecolare per la terapia dei tumori dell'ovaio. In realtà gli inibitori di PARP agiscono inibendo la riparazione del DNA, vale a dire, aumentando i danni a carico del DNA soprattutto in presenza di un difetto del meccanismo di HR. La selettività deriva dal fatto che l'inibizione di PARP causa la trasformazione di rotture del singolo filamento in rotture del doppio filamento, che sono riparabili da HR nelle cellule normali, ma non in quelle tumorali che presentano un deficit di HR. Recentemente si è stabilito che, oltre a inibire la riparazione del DNA, gli inibitori di PARP inducono la formazione di complessi ternari DNA-PARP-inibitore altamente citotossici^(10,11). Gli inibitori di PARP sono quindi composti che, oltre a causare un accumulo di danni al DNA, particolarmente gravi in cellule deficienti in meccanismi di riparazione, danneggiano il DNA direttamente, in modo analogo a quanto osservato per gli inibitori delle topoisomerasi o per i farmaci che formano *crosslinks* nel DNA, come il cisplatino e suoi derivati.

È molto probabile che la forte efficacia di alcuni chemioterapici convenzionali per la terapia di determinati tumori sia attribuibile alla concomitante presenza di un difetto biochimico delle cellule tumorali che le rendono particolarmente sensibili ai meccanismi citotossici dei farmaci stessi. Questo concetto, che va sotto il nome di letalità sintetica, sostiene l'idea che fra le tante alterazioni presenti nelle cellule tumorali ce ne siano alcune che rendono le cellule stesse particolarmente vulnerabili a determinate classi di farmaci, come nel caso dell'efficacia dei farmaci che inibiscono la riparazione del DNA nei confronti di tumori con difetti di HR causati da mutazioni di BRCA1 o BRCA2.

Ci soffermiamo un momento sul concetto di letalità sintetica perché riteniamo che, essendo oggi disponibili tecnologie altamente sensibili ed affidabili per determinare la presenza di difetti molecolari dei tumori, questo approccio sarà certamente di crescente interesse. È noto da molti anni che nella *Drosophila* ⁽¹²⁾ vi sono geni che se non sono espressi singolarmente non producono importanti cambiamenti nella crescita e sopravvivenza, ma se assenti simultaneamente causano letalità. In altre parole, la mancanza del gene A non causa alcun effetto, la mancanza del gene B non causa alcun effetto, ma la mancanza simultanea del gene A e del gene B causa letalità. Questo concetto, che è già applicato nel caso dei PARP inibitori e probabilmente sta alla base della selettività d'azione di molte terapie convenzionali, potrà essere sfruttato per identificare nuove terapie antitumorali ^(7, 13). Se una cellula tumorale presenta un'alterazione costitutiva a carico del gene A, farmaci in grado di abolire la funzione di B determinano la morte della cellula tumorale, ma non delle cellule normali (che non presentano alterazioni di A). Questo concetto può essere sfruttato quando A presenta un'alterazione *driver* che consista in una perdita piuttosto che un'acquisizione di funzione, o quando A, pur essendo attivato in senso oncogenico, non si presti alla modulazione farmacologica (p.es. forme alterate di RAS ⁽¹⁴⁾ o MYC) ⁽¹⁵⁾; la creazione di piattaforme in grado di identificare sistematicamente situazioni di letalità sintetica nelle cellule tumorali rappresenta attualmente una delle strategie più promettenti per lo sviluppo di nuovi agenti antitumorali.

Nuova generazione di farmaci antitumorali

I così detti farmaci di nuova generazione sono stati disegnati specificamente per interferire con uno specifico bersaglio molecolare, tipicamente una proteina, che si ritiene svolgere un ruolo cruciale per la crescita o la progressione del tumore.

Un impulso decisivo per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali è venuto nella seconda metà degli anni 1970 dalla scoperta di due classi di geni fondamentali per la trasformazione e la progressione neoplastica. I geni appartenenti alla prima classe, denominati oncogeni, rappresentano una versione corrotta di geni normalmente pre-

senti nelle cellule e implicati nel controllo della loro proliferazione e sopravvivenza ⁽¹⁶⁾. L'attivazione oncogenica di questi normali geni cellulari può avvenire attraverso diversi meccanismi:

- traslocazione cromosomica, che può portare alla formazione di geni di fusione i cui prodotti proteici sfuggono ai normali meccanismi di regolazione (p.e. *BCR-ABL* nella leucemia mieloide cronica o *EML4-ALK* in un gruppo di tumori del polmone non a piccole cellule), oppure trasportare un gene, perfettamente normale quanto alla sequenza nucleotidica, in un diverso contesto regolatorio in grado di esaltarne l'espressione (p.e. *MYC* nel linfoma di Burkitt o *BCL 2* nei linfomi follicolari);
- iper-espressione, generalmente dovuta a un aumento di numero di copie del gene, ma anche a alterazioni dei meccanismi che regolano la trascrizione e/o la traduzione (p.e. *HER2* nei carcinomi della mammella o *EGFR* nei tumori della testa e del collo);
- mutazioni puntiformi o delezioni (p.e. *K-RAS* nel NSCLC o *BRAF* nel melanoma metastatico).

La seconda classe di geni è invece costituita dai così detti geni oncosoppressori, il cui compito è vigilare sull'integrità del genoma, sorvegliare il corretto svolgimento delle varie fasi del ciclo proliferativo cellulare, eventualmente indirizzando le cellule difettose verso la senescenza o la morte apoptotica, e tenere sotto controllo la capacità migratoria e metastatica delle cellule trasformate. Questi geni possono essere inattivati nelle cellule tumorali a causa di mutazioni, delezioni e silenziamento epigenetico in grado di portare alla perdita di funzione del relativo prodotto, ma la down-regolazione può avvenire anche a livello post-trascrizionale, grazie all'intervento di microRNA ad azione oncogenica (onco-miR), e post-traduzionale, a seguito dell'interazione con proteine che facilitano la degradazione del prodotto proteico o di modificazioni covalenti della proteina stessa ⁽¹⁶⁾.

L'acquisizione di difetti in entrambe queste categorie di geni scandisce la progressione tumorale attraverso lo sviluppo di quelli che ben sono stati definiti i segni cardinali del cancro (*the hallmarks of cancer*) in un celeberrimo articolo di Douglas Hanahan e Robert Weinberg comparso nel 2000 sulla rivista *Cell* e aggiornato e rivisto dagli stessi autori nel 2011 ^(17, 18). Questi segni cardinali sono le proprietà fondamentali che contraddistinguono la cellula tumorale dalla cellula normale e la loro trattazione ha rappresentato al tempo stesso un compendio delle conoscenze sulla biologia della cellula tumorale acquisite negli ultimi decenni del secolo scorso e una utile *roadmap* per l'esplorazione di nuovi approcci terapeutici negli anni successivi. Originariamente, i segni cardinali comprendevano: autosufficienza nei confronti di stimoli mitogenici e refrattarietà nei confronti di segnali anti-mitogenici; potenziale replicativo illimitato; capacità di eludere i segnali di morte; capacità di invadere i tessuti normali circostanti e di colonizzare distretti a distanza attraverso il circolo sanguigno e/o linfatico; e capacità di costruire una rete vascolare in grado di approvvigionare il tumore di ossigeno e nutrienti. A queste

si sono successivamente aggiunte altre due proprietà, la capacità di eludere l'attacco del sistema immunitario e quella di riprogrammare il metabolismo energetico cellulare, oltre all'individuazione di due condizioni sottostanti che facilitano l'acquisizione di tutte le altre proprietà: l'instabilità genomica delle cellule tumorali e la loro capacità di reclutare le cellule dell'immunità innata che, inducendo uno stato infiammatorio cronico nella sede del tumore (che ha portato a paragonare i tumori a ferite che non si rimarginano mai), favoriscono la progressione tumorale.

Questo quadro di insieme evidenzia numerosissimi spunti per lo sviluppo di nuovi farmaci e strategie terapeutiche, e molti di questi sono attualmente perseguiti in ambito preclinico e clinico. I farmaci già approvati agiscono però ancora per la maggior parte inibendo i segnali proliferativi incontrollati che derivano dall'attivazione oncogenica di recettori per fattori di crescita o elementi delle vie di trasduzione intracellulari di segnali di mitogenici o di sopravvivenza.

Imatinib e i suoi successori

Il primo clamoroso successo dell'approccio mirato all'inibizione di chinasi oncogeniche è stato riportato nell'ambito della terapia della leucemia mieloide cronica (LMC). Questa neoplasia ematologica rappresentava uno scenario ideale per mettere alla prova il concetto di terapia mirata, poiché in oltre il 95% dei casi dipende, almeno nella sua fase cronica, dalla presenza di una proteina di fusione, derivata dalla traslocazione reciproca tra i cromosomi 9 e 22 (con la creazione del così detto cromosoma Philadelphia), che è del tutto assente nelle cellule normali. A seguito di questa traslocazione, il gene che codifica per la tirosin-chinasi (TK) intracellulare *c-Abl* risulta fuso con il gene *Bcr*, dando origine alla proteina Bcr-Abl. Nella fusione vengono perse alcune sequenze regolatrici, per cui il sito chinasi di Abl risulta costitutivamente attivo, assumendo un ruolo *driver* per questa patologia.

L'imatinib è stato il primo farmaco sviluppato allo scopo di inibire l'attività catalitica di Bcr-Abl sfruttando la *oncogene addiction* delle cellule di LMC. Il trattamento con imatinib durante la fase cronica della malattia è in grado di indurre una risposta ematologica completa (scomparsa dei blasti dal sangue periferico) in oltre il 90% dei pazienti e una risposta citogenetica completa (assenza di cromosoma Philadelphia in 20/20 cellule metafasiche esaminate) in oltre il 60%; l'effetto nelle fasi più avanzate (accelerazione e crisi blastica) è però molto meno spettacolare, perché in queste fasi altre mutazioni si aggiungono alla mutazione *driver* originaria, e quindi l'inibizione di Bcr-Abl non è più sufficiente, o diventa addirittura irrilevante, ai fini del controllo della malattia. L'imatinib compete con l'ATP per il legame al sito catalitico di Bcr-Abl. Questo può esistere in una conformazione chiusa (inattiva) e in una conformazione aperta (attivata), e l'imatinib si lega all'enzima nella conformazione chiusa, impedendo l'accesso all'ATP, bloccando l'attività enzimatica secondo un meccanismo definito di tipo II (in opposizione al meccanismo

di tipo I, secondo cui l'inibitore si lega alla conformazione aperta) e favorendo il differenziamento dei precursori mieloidi. Sfortunatamente, nella maggior parte dei casi a una iniziale risposta al trattamento fa seguito, dopo un periodo più o meno lungo, lo sviluppo di resistenza, e la malattia progredisce nonostante il trattamento. I fattori che possono portare a progressione della malattia in corso di trattamento sono molteplici. Alcuni di questi non dipendono da alterazioni dirette a carico delle cellule tumorali, ma piuttosto da cambiamenti nella farmacocinetica del/i composto/i utilizzato/i, dovuti per esempio a deterioramento della funzione epatica o renale, assunzione contemporanea di nuovi farmaci potenzialmente interferenti, e anche a una diminuzione della compliance del paziente. È stato anche ipotizzato sulla base di dati preclinici che in alcuni casi la resistenza sia imputabile al legame del farmaco a α_1 -glicoproteina acida, con una conseguente minore distribuzione del farmaco alle cellule tumorali^(19,20). Nella maggior parte dei casi, però, la resistenza insorge per selezione di cloni cellulari in grado di eludere gli effetti del trattamento grazie a tre principali classi di meccanismi. Alla prima classe afferiscono i meccanismi che hanno come risultato una riduzione dei livelli di farmaco disponibili per l'interazione con il bersaglio (p.e. alterata espressione di proteine che mediano il trasporto del farmaco nella cellula o la sua estrusione, o di enzimi che attivano/inattivano il farmaco). Nel caso dell'imatinib, la iper-espressione di trasportatori appartenenti alla famiglia ABC, in particolare di ABCB1 e ABCG2, sembra contribuire alla resistenza. I meccanismi della seconda classe portano invece ad alterazioni quali o quantitative del bersaglio, tali per cui la dose di farmaco standard non è più in grado di controllarne l'attività. Per quanto riguarda l'imatinib queste sono le alterazioni più frequentemente implicate nella resistenza ed è stata identificata una pletora di mutazioni in grado di alterare l'affinità di Bcr-Abl per il farmaco. In particolare, è stato identificato un residuo di treonina in posizione 315 che regola l'accesso dell'imatinib al sito di legame per l'ATP, e che per questo viene definito residuo *gatekeeper*. La sostituzione della treonina con una isoleucina (Bcr-Abl^{T315I}) preclude l'accesso a quasi tutti gli inibitori chinasi, mantenendo ovviamente la capacità di legare l'ATP. È da notare che per queste due prime classi di meccanismi di resistenza quello che viene meno è la possibilità di ottenere una concentrazione adeguata (in senso assoluto o relativo) di farmaco a livello del bersaglio; la dipendenza del tumore dal bersaglio rimane inalterata, e questo giustifica la ricerca di strategie alternative per colpirlo.

La terza classe, invece, comprende meccanismi di resistenza basati sull'attivazione di vie collaterali per la trasduzione dei segnali oncogenici, o di elementi a valle del bersaglio, il che affranca il tumore dalla dipendenza dal bersaglio stesso; in genere nella LMC questo coincide con la progressione della malattia verso le fasi di accelerazione e di crisi blastica. Poiché il meccanismo più comune di resistenza all'imatinib è rappresentato dalla comparsa di mutazioni a livello del sito di legame per il farmaco, sono stati sviluppati inibitori

di seconda generazione di tipo I (dasatinib, bosutinib) o II (nilotinib), in grado di interagire anche con la maggior parte delle forme mutate dell'enzima (Tabella 1). Tuttavia neppure questi analoghi sono in grado di inibire la forma mutata Bcr-Abl^{T315I}, e solo recentemente è stato approvato un inibitore di terza generazione, il ponatinib, in grado di inibire (con un meccanismo di tipo II) anche

le forme enzimatiche con questa mutazione^[1]. Curiosamente, l'axitinib (Tabella 2), un inibitore tirosin-chinasico selettivo per tutte le forme di recettore per il *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e approvato per le sue proprietà antiangiogeniche nel trattamento del carcinoma metastatico a cellule renali (mRCC)^[2], è risultato avere una particolare affinità per Bcr-Abl^{T315I} (21).

	BERSAGLIO MOLECOLARE	MECCANISMO D'AZIONE	INDICAZIONI CLINICHE
Inibitori di Bcr-Abl			
Imatinib (GLEEVEC)	Bcr-Abl; c-KIT; PDGFR-β	Inibizione competitiva del legame dell'ATP	LMC Ph+; GIST
Nilotinib (TASIGNA)	Bcr-Abl; c-KIT; PDGFR-β	"	LMC Ph+; GIST
Dasatinib (SPRYCEL)	Bcr-Abl; c-KIT; PDGFR-β; SFK	"	LMC, ALL Ph+; GIST
Bosutinib (BOSULIF)	Bcr-Abl; SFK; cKIT; PDGFR	"	LMC Ph+
Ponatinib (ICLUSIG)	Bcr-Abl (compreso BcrAbl T315I), c-KIT; PDGFR-β	"	LMC ph+, ALL Ph+
Inibitori dei recettori della famiglia HER			
Erlotinib (TARCEVA)	EGFR	Inibizione competitiva del legame dell'ATP	NSCLC con EGFR mutato
Gefitini (IRESSA)	EGFR	"	NSCLC con EGFR mutato, CA pancreas
Afatinib (GILOTRIF)	EGFR	Inibizione irreversibile del legame dell'ATP	NSCLC con EGFR mutato
Lapatinib (TYKERB)	EGFR, HER2	Inibizione competitiva del legame dell'ATP	Ca mammella HER2+
Inibitori multichinasici			
Sorafenib (NEXAVAR)	VEGFR1,2,3; PDGFR; C-RAF	"	mRCC; HCC
Sunitinib (SUTENT)	VEGFR1,2,3; PDGFR; RET	"	mRCC; GIST; PNET
Pazopanib (VOTRIENT)	VEGFR1,2,3	"	mRCC; sarcomi dei tessuti molli
Axitinib (INLYTA)	VEGFR1,2,3; PDGFR; c-Kit; Bcr-Abl ^{T315I}	"	RCC (seconda linea)
Regorafenib (STIVARGA)	VEGFR1,2,3; c-Kit; PDGFR; FGFR1,2; BRAF; B-RAF ^{V600E}	"	CA colorettaile; GIST
Cabozantinib (COMETRIQ)	VEGFR1,2,3; PDGFR; RET; MET; TrkB	"	CA midollare della tiroide
Vandetanib (CAPRELSA)	VEGFR1,2,3; PDGFR; RET; MET; EGFR	"	CA midollare della tiroide
Altri			
Crizotinib (XALKORI)	EML4-ALK	"	NSCLC EML4/ALK+
Ceritinib (ZYKADIA)	EML4-ALK; InsR; IGFR1	"	NSCLC EML4/ALK+

Tabella 1 – Inibitori tirosin-chinasici e multichinasici.

1] La distinzione tra inibitori di tipo I e II è piuttosto rilevante ai fini dell'insorgenza di resistenza basata su eventi mutazionali: infatti la conformazione chiusa tollera la presenza di mutazioni a carico di diversi residui nel sito di legame, con il risultato di ridurre l'affinità per gli inibitori di tipo II senza che questo comprometta la performance dell'enzima quando si trova nella forma attiva, mentre nel caso della conformazione aperta molte mutazioni non sono compatibili con l'attività catalitica dell'enzima, per cui la probabilità di insorgenza di resistenza attraverso questo meccanismo è decisamente più bassa per gli inibitori di tipo I rispetto a quelli di tipo II.

	TIPO DI ANTICORPO	BERSAGLIO	INDICAZIONI TERAPEUTICHE
Inibizione di recettori per fattori di crescita			
Trastuzumab (HERCEPTIN)	Umanizzato	HER2	CA della mammella HER2+
Pertuzumab (PERJETA)	Umanizzato	HER2	CA della mammella HER2+
Cetuximab (ERBITUX)	Chimerico	EGFR	mCRC
Panitumumab (VECTIBIX)	Umano	EGFR	mCRC
Inibizione di fattori di crescita			
Bevacizumab (AVASTIN)	Umanizzato	VEGF	mCRC; NSCLC; mRCC; tumori della cervice uterina e dell'ovaio; glioblastoma
Ramucirumab (CYRAMZA)	Umano	VEGFR2	CA gastrico; NSCLC
Inibizione di antigeni CD			
Alemtuzumab (CAMPATH)	Umanizzato	CD52	LLC, CTCL, TCL
Rituximab (RITUXAN)	Chimerico	CD20	Linfoma
Obinutuzumab (GAZYVA)	Umanizzato	CD20	LLC
Ofatumumab (ARZERRA)	Umano	CD20	LLC
Inibizione del checkpoint immunologico			
Ipilimumab (YERVOY)	Umano	CTLA-4	Melanoma metastatico
Pembrolizumab (KEYTRUDA)			
Nivolumab (OPDIVO)	Umano	PD-1	Melanoma metastatico; NSCLC a cellule squamose
ADC (Antibody-Drug Conjugates)			
Ado-trastuzumab-emtansina (KADCYLA)	Umanizzato, coniugato a DM1	HER2	CA metastatico della mammella HER2+
Brentuximab Vedotin (ADCETRIS)	Chimerico, coniugato a MMAE	CD30	LH, Linfoma anaplastico a grandi cellule
Abbreviazioni: mCRC, carcinoma metastatico del colon-retto; NSCLC, tumore del polmone non a piccole cellule; mRCC, carcinoma metastatico a cellule renali; LLC, leucemia linfocitaria cronica; CTCL, linfoma cutaneo a cellule T; TCL, linfoma a cellule T; LH, linfoma di Hodgkin; DM1, <i>disulfide-containing maytansinoid</i> ; MMAE, monomethylauristatina			

Tabella 2 – Anticorpi monoclonali utilizzati nella terapia dei tumori.

Infine, sono in via di sviluppo anche inibitori allosterici (tipo III), che non legano direttamente il sito di legame per l'ATP, ma ne modificano allostericamente l'attività.

Benché l'imatinib sia stato espressamente sviluppato come inibitore selettivo dell'attività chinasi di Bcr-Abl, in realtà la sua selettività non è assoluta, e sono stati identificati alcuni altri bersagli impor-

tanti, tra cui forme mutate e costitutivamente attivate dei recettori di membrana KIT (recettore per lo *Stem Cell Factor*) e PDGFR (recettore per il *Platelet Derived Growth Factor*), che fungono da *driver* per una frazione rilevante di tumori stromali gastrointestinali (GIST). In questo modo l'imatinib e i suoi analoghi, dopo avere rivoluzionato la terapia della LMC, hanno anche migliorato la pro-

2) Il carcinoma a cellule renali è un tumore fortemente angiogenico a causa della presenza, in una elevata percentuale di casi, di mutazioni inattivanti nel gene *VHL*, che codifica per una proteina implicata nel sistema di ubiquitinazione e degradazione proteasomale. Uno dei bersagli la cui degradazione viene bloccata quando *VHL* è inattivato è la subunità labile α dei fattori inducibili dall'ipossia (HIF), che regolano l'espressione, tra gli altri, del gene *VEGF-A*; l'aumentata espressione di questo gene rende quindi ragione dell'intensa vascolarizzazione di questo tipo di tumore.

gnosi dei pazienti affetti da queste neoplasie relativamente rare, nei confronti delle quali non esistevano in precedenza terapie farmacologiche efficaci.

Inibitori dei recettori per i fattori di crescita

Il successo ottenuto dall'imatinib nella terapia della LMC e dei GIST è stato salutato come una conferma della possibilità di curare o almeno arrestare la progressione tumorale colpendo le cellule tumorali a livello del tallone di Achille rappresentato dalla dipendenza da specifiche proteine attivate in senso oncogenico. In realtà ad oggi si contano pochissime situazioni in cui questo successo sia stato replicato, e due di queste coinvolgono la famiglia dei recettori tirosin-chinasici HER (*Human EGF Receptor*). Si tratta di recettori di membrana che, dopo aver interagito con i rispettivi ligandi, formano omo- o eterodimeri; i due membri del dimero si fosforilano reciprocamente a livello di residui tirosinici nella porzione intracellulare carbossiterminale, creando siti di ancoraggio per substrati proteici e proteine adattatrici che cooperano nella trasduzione dei segnali implicati nella proliferazione cellulare e nella progressione neoplastica. A questo schema fa eccezione il recettore HER2, che è privo di ligando e pre-

senta una conformazione costitutivamente predisposta alla formazione di omo- ed eterodimeri; in compenso, i dimeri contenenti HER2 sono particolarmente efficaci ai fini della trasduzione dei segnali. L'interesse farmacologico di questo recettore deriva dalla sua iper-espressione in una percentuale ragguardevole (20-25%) di carcinomi della mammella, caratterizzati da un fenotipo piuttosto aggressivo. Il primo farmaco approvato per la terapia dei carcinomi della mammella HER2-positivi è stato il trastuzumab (Tabella 3), un anticorpo monoclonale (mAb) umanizzato diretto contro HER2. Non è chiaro se in questi tumori si possa parlare di una dipendenza oncogenica analoga a quella della LMC nei confronti di Bcr-Abl, ma in questo caso l'abolizione dei segnali intracellulari non è l'unico meccanismo sui cui il trastuzumab basa la propria azione antitumorale. Infatti, una volta avvenuto il riconoscimento dell'antigene esposto sulla superficie delle cellule tumorali, il trastuzumab (così come anche la maggior parte degli altri anticorpi monoclonali terapeutici) attraverso il frammento cristallizzabile Fc è in grado di reclutare cellule immunitarie effettrici ed elementi del sistema del complemento che provvedono all'eliminazione delle cellule tumorali bersaglio attraverso i processi di *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC), *antibody-dependent cell-mediated phagocytosis* (ADCP) e *complement-dependent cytotoxicity* (CDC).

CLASSE		BERSAGLIO MOLECOLARE	INDICAZIONI
Bevacizumab (AVASTIN)	Anticorpo umanizzato	VEGF-A	mCRC; NSCLC; mRCC; tumori della cervice uterina e dell'ovaio; glioblastoma
Aflibercept (ZALTRAP)	Proteina chimerica	VEGF-A e -B; PlGF	mCRC
Ramucirumab (CYRAMZA)	Anticorpo umano	VEGFR2	Carcinoma gastrico; NSCLC
Pazopanib (VOTRIENT)	Inibitore multichinasico	VEGFR1-2	mRCC; sarcomi dei tessuti molli
Sorafenib (NEXAVAR)	Inibitore multichinasico	VEGFR1-2; PDGFR; KIT; CRAF	mRCC; HCC; DTC
Sunitinib (SUTENT)	Inibitore multichinasico	VEGFR; KIT; PDGFR	mRCC; GIST; PNET
Axitinib (INLYTA)	Inibitore multichinasico	VEGFR1-3; Bcr-AbIT315I	mRCC
Cabozantinib (COMETRIQ)	Inibitore multichinasico	VEGFR2; c-MET	Carcinoma midollare della tiroide
Lenvatinib (LENVIMA)	Inibitore multichinasico	VEGFR1-3; FGFR1-4; PDGFRA; KIT	DTC
Vandetanib (CAPRELSA)	Inibitore multichinasico	VEGFR2, EGFR, RET	Carcinoma midollare metastatico della tiroide
Everolimus (Afinitor)	Inibitore di mTOR	mTOR	Carcinoma HR+ della mammella; mRCC; PNET
Temsirolimus (Torisel)	Inibitore di mTOR	mTOR	mRCC

Abbreviazioni: mCRC, carcinoma metastatico del colon-retto; NSCLC, tumore del polmone non a piccole cellule; mRCC, carcinoma metastatico a cellule renali; HCC, carcinoma epatocellulare; DTC, carcinoma diffuso della tiroide; GIST, tumori stromali gastro-intestinali; PNET, tumori neuroendocrini del pancreas

Tabella 3 – Farmaci antiangiogenici.

Attualmente il trastuzumab è stato affiancato da un secondo anticorpo monoclonale umanizzato, denominato pertuzumab. I due legano siti diversi della porzione extracellulare di HER2 ed esercitano azioni complementari^[3], il che giustifica il sinergismo osservato nell'ambito di una terapia combinata. Un'ulteriore evoluzione del targeting dei HER2 mediante anticorpi è stato lo sviluppo, e l'approvazione nel 2012, del farmaco-immunocongiugato trastuzumab-DM1 (o trastuzumab-emtansina), che grazie alla capacità di convogliare un principio citotossico all'interno delle cellule è in grado di superare alcune forme di resistenza al trastuzumab. I meccanismi di resistenza a trastuzumab e pertuzumab possono basarsi su:

- aumento dell'espressione del recettore;
- mutazioni del dominio recettoriale extracellulare che compromettono il riconoscimento da parte degli anticorpi;
- *shielding* del dominio extracellulare per aumento dell'espressione di mucina o dei livelli di glucosaminoglicani presenti nel glicocalice;
- processing proteolitico che porta alla perdita parziale o totale del dominio extracellulare del recettore;
- *oncogene shift*, cioè attivazione di altri recettori tirosin-chinasici (p.e. HER3, il recettore IGF1R per gli *insulin-like growth factors* o cMET anche noto come HGFR, recettore per l'*Hepatocyte Growth Factor* o *scatter factor*) che insistono sulle stesse vie di trasduzione del segnale, in particolare le vie di RAS-RAF-MEK-ERK e PI3K-AKT-mTOR (si veda oltre); e infine
- vie di *bypass* che consistono nell'attivazione recettore-indipendente delle vie di trasduzione a valle di HER2.

Oltre a questi interventi basati sull'uso di mAb, nel 2007 è stato approvato per il trattamento del carcinoma della mammella HER2-positivo anche il lapatinib (Tabella 1), un inibitore catalitico bi-specifico a basso peso molecolare, che agisce sia su HER2, sia su EGFR. Gli inibitori catalitici dei recettori HER trovano però il loro impiego di maggiore successo nella terapia di un sottoinsieme di adenocarcinomi del polmone che esprimono forme mutate del recettore per l'*epidermal growth factor* (EGFR o HER1). Le mutazioni riscontrate sono concentrate nel dominio chinasico e possono aumentare l'attività catalitica del recettore di oltre 50 volte. Si tratta prevalentemente di mutazioni somatiche presenti in forma eterozigote, e spesso l'allele mutato è anche amplificato. Sono state identificate più di 100 mutazioni, e tra queste quelle che più frequentemente (85%) inducono attivazione sono una delezione dell'esone 19 (del19) e la mutazione puntiforme L858R^[4]. Il trattamento di tumori del polmone non a piccole cellule (NSCLC) che presentano queste mutazioni con inibitori (EGFRi) quali gefitinib e erlotinib (Tabella 1) illustra mirabilmente il concetto di oncogene *addiction*, in quanto lo spegnimento

di questa via cruciale di trasduzione del segnale causa la morte delle cellule tumorali, mediata dall'azione di BIM, membro pro-apoptotico della famiglia BCL-2⁽²³⁾. Terapie dirette contro EGFR sono state approvate anche per altri tumori, e in particolare per i carcinomi del colon retto e i tumori della testa e del collo. Anche questi tumori possono presentare mutazioni attivanti o iper-espressione del recettore, ma è meno chiaro se anche in questo caso si possa parlare di dipendenza oncogenica, analogamente a quanto detto per i NSCLC con mutazioni di EGFR, dato che è necessario combinare agenti anti-EGFR con la chemioterapia per osservare risposte paragonabili a quelle osservate nel NSCLC con EGFRi in monoterapia. Nel tumore del colon retto e della testa e del collo vengono usati di preferenza anticorpi monoclonali anti-EGF, nella fattispecie l'anticorpo chimerico cetuximab e l'anticorpo umano panitumumab (Tabella 3). Per entrambi l'impiego è subordinato alla verifica dell'assenza di mutazioni attivanti di *KRAS*, peraltro piuttosto comuni nei tumori del colon retto. Infatti, l'attivazione costitutiva della via di trasduzione del segnale che dipende da *KRAS*, che è una delle principali vie a valle di EGFR, vanificherebbe in gran parte l'efficacia dell'inibizione di quest'ultimo. Nonostante i benefici clinici derivanti dall'inibizione di EGFR, anche in questo caso come in quello dell'imatinib si tratta di benefici di durata limitata dallo sviluppo di resistenza acquisita attraverso 4 meccanismi riportati di seguito.

1) Mutazioni secondarie a carico di EGFR, che lo rendono resistente al farmaco senza ridurre l'attività chinasica. Esempi di queste mutazioni sono le sostituzioni T790M, che aumenta l'affinità del legame all'ATP e causa resistenza a gefitinib e erlotinib, e S429R, che blocca il legame del cetuximab a EGFR⁽⁵⁾. Si tratta del meccanismo più comune nel NSCLC, riscontrato in oltre il 60% dei casi, ed è un meccanismo che riproduce la situazione osservata anche in altri tumori che mostrano oncogene *addiction* (T315I in Bcr-Abl nella LMC, T670I in KIT nei GIST). Questo rappresenta una ulteriore conferma dello stato di dipendenza di questi tumori: la semplice sostituzione di un aminoacido ripristina la capacità proliferativa del tumore sotto trattamento con EGFRi; al contrario, nei tumori del colon la resistenza al cetuximab si deve principalmente all'attivazione di vie alternative.

2) *Shift oncogenico* o attivazione di una via di *bypass* (si veda sopra). L'attivazione di *KRAS*, *PIK3CA* e *BRAF* o la perdita di *PTEN*, come pure l'amplificazione di *HER2*, causano l'attivazione persistente dei segnali a valle di EGFR nonostante l'inibizione di quest'ultimo, bloccando l'innescò dell'apoptosi o l'effetto antiproliferativo normalmente causati dall'inibizione di EGFR. La distinzione tra il ruolo trainante svolto da EGFR nei NSCLCs e quello

3) Il trastuzumab è particolarmente efficace nell'inibire l'attività di omodimeri o omoaggregati costituiti da HER2, ma non lo è altrettanto nell'inibire gli eterodimeri che HER2 forma con gli altri membri della famiglia, il pertuzumab blocca il sito di dimerizzazione.

4) Uno studio recente indica che le diverse mutazioni attivanti di EGFR non sono equivalenti ai fini della risposta al trattamento con EGFRi e che un beneficio significativo si osserva principalmente quando l'attivazione è dovuta a del19⁽²²⁾.

5) È interessante notare che il legame del panitumumab a EGFR non risente di questa mutazione

di via comprimaria svolto invece nel colon ha notevoli implicazioni dal punto di vista clinico. In primo luogo, la frequenza e la durata della risposta sono molto superiori nel primo rispetto al secondo caso. In secondo luogo, nel NSCLC la combinazione tra EGFRi e chemioterapici non porta ad alcun beneficio sostanziale rispetto alla monoterapia, mentre nel colon la combinazione tra cetuximab e chemioterapia produce un significativo miglioramento della risposta. Infine, dal punto di vista farmacologico è molto più facile superare forme di resistenza dovute ad alterazioni di un oncogene driver piuttosto che forme dovute all'attivazione di vie accessorie. Nel primo caso si è già ottenuto qualche successo con lo sviluppo di inibitori di nuova generazione, di cui l'afatinib (Tabella 1) rappresenta il primo esempio clinico. L'afatinib inibisce irreversibilmente il recettore mediante la modificazione covalente del residuo di Cys797 presente nel sito che lega l'ATP, riducendo l'affinità per quest'ultimo e vanificando l'effetto della mutazione T790M. Un altro inibitore irreversibile, il dacomitinib, attualmente oggetto di numerosi trials clinici, oltre a EGFR inibisce anche HER2 e HER4; questo da un lato permette di bypassare un potenziale meccanismo di resistenza, ma dall'altro potrebbe dare luogo ad effetti tossici non tollerabili. Nel caso invece dell'attivazione di vie alternative si richiede la combinazione tra più agenti, ognuno dei quali selettivamente diretto contro uno o più elementi di una o più vie alternative, con un inevitabile aumento della tossicità (ammesso che inibitori farmacologici di tali vie siano effettivamente disponibili).

3) Compromissione delle vie necessarie per l'attivazione dell'apoptosi indotta dai EGFRi: un esempio tipico di questo meccanismo è rappresentato da delezioni del dominio BH3 di BIM⁽²³⁾.

4) Alterazione istologica (riguarda circa il 3% delle forme di resistenza osservate). La più studiata di queste alterazioni è la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), che si manifesta tipicamente attraverso la perdita di espressione di marker epiteliali come la E-caderina e l'aumento di espressione di marker mesenchimali come vimentina e fibronectina, ed è stata osservata in pazienti con resistenza acquisita agli EGFRi in assenza della mutazione T790M. Questa forma di resistenza sembra essere associata all'attivazione della chinasi AXL, a sua volta in grado di indurre EMT. In altri casi si è osservata invece una trasformazione da NSCLC a SCLC.

Inibitori multichinasici *versus* inibitori selettivi

Il presupposto per lo sviluppo dei farmaci di nuova generazione era che questi dovessero essere il più possibile selettivi per il bersaglio designato, al fine di ridurre il più possibile l'incidenza e la gravità degli effetti sui tessuti normali. Questo presupposto è rispettato dalla classe degli anticorpi monoclonali terapeutici, che sono squisitamente selettivi per gli antigeni nei confronti dei quali sono stati prodotti,

ma sembra essere declinato in maniera meno restrittiva dalla classe degli inibitori (tirosin) chinasi, e in particolar modo da quelli che agiscono come competitori per il legame all'ATP. Alcuni di questi (p.e. gefitinib, erlotinib) presentano effettivamente un valore di IC₅₀ significativamente più basso per il proprio bersaglio rispetto a qualunque altra chinasi, incluse quelle della medesima famiglia; la maggior parte degli inibitori però è in grado di interagire con diverse chinasi bersaglio con affinità dello stesso ordine di grandezza. Lo stesso imatinib, prototipo dei farmaci a bersaglio molecolare, è in realtà un inibitore multichinasico, dato che, come già illustrato, compete per il legame all'ATP non solo nel caso di Bcr-Abl, ma anche nel caso di KIT e PDGFR, e anche i farmaci sviluppati per superare le resistenze all'imatinib nel trattamento della LMC (nilotinib, dasatinib, bosutinib e ponatinib) agiscono su molteplici bersagli. La possibilità di controllare chinasi diverse con un unico inibitore, emersa in modo più o meno fortuito, è stata sfruttata per dare vita a una vera e propria classe di inibitori multichinasici (MKI) (Tabella 1), diretti principalmente, anche se non esclusivamente, contro tirosin-chinasi recettoriali. I vantaggi di questo approccio sono molteplici:

- inibizione simultanea di più recettori che operano attraverso le stesse vie di trasduzione del segnale, oppure di un recettore e di elementi delle vie di trasduzione a valle, oppure di più vie di trasduzione complementari, neutralizzando possibili meccanismi di resistenza legati a *shift* oncogenico o attivazione di meccanismi di *bypass*;
- ridotta probabilità di insorgenza di resistenza dovuta a mutazione contemporanea di più bersagli nella stessa cellula;
- inibizione simultanea di recettori per fattori di crescita espressi dalle cellule tumorali e recettori per fattori pro-angiogenici espressi dalle cellule endoteliali, bloccando la crescita tumorale in modo diretto e indiretto;
- possibilità di evitare le problematiche di ordine farmacocinetico che sarebbero inevitabili qualora venissero utilizzati inibitori diversi per inibire chinasi diverse;
- possibile ampliamento delle indicazioni per l'uso clinico.

La maggior parte dei MKI ha tra i bersagli uno o più recettori per il VEGF, il che spiega il successo di questi farmaci in tumori altamente dipendenti dall'angiogenesi, quali il mRCC; ci sono però alcune eccezioni, come p.e. il già citato lapatinib, che inibisce contemporaneamente EGFR e HER2, inibendo la trasduzione dei segnali mitogenici a seguito della omo- e eterodimerizzazione recettoriale. Un discorso a parte merita il crizotinib, che è un duplice inibitore della tirosin-chinasi recettoriale ALK e di cMET, recettore per l'*hepatocyte growth factor* e implicato nell'invasività e nella metastatizzazione tumorali. ALK può venire attivato in senso oncogenico per amplificazione genica o mutazione (nei neuroblastomi), oppure per traslocazione, come avviene nei linfomi anaplastici e in un sottogruppo (circa il 4%) dei tumori del polmone non a piccole cellule. È proprio per la capacità di inibire l'attività aberrante della chinasi

chimerica EML4-ALK espressa che ha trovato impiego il crizotinib, sfruttando un ennesimo esempio di dipendenza oncogenica. La capacità di inibire contemporaneamente anche cMet consente da un lato di tenere sotto controllo alcuni aspetti della progressione del tumore, dall'altro di sfuggire a meccanismi di resistenza legati all'attivazione di cMet, che ha in comune con ALK diverse vie di trasduzione del segnale. Anche nel caso del crizotinib si è però rapidamente riconfermato il paradigma secondo il quale a una risposta iniziale fa seguito una ripresa della malattia, in questo caso a causa di mutazioni a carico del sito catalitico di ALK; a questo proposito è già stato recentemente approvato un ALK-inibitore di seconda generazione, il ceritinib, in grado di superare questa forma di resistenza e con un profilo un po' diverso dal crizotinib per quanto riguarda gli ulteriori bersagli, che sono rappresentati dal recettore per l'insulina (Ins) e dal recettore di tipo I per gli *insulin-like growth factors* (IGFR1)

Anticorpi monoclonali *versus* inibitori di TK

Lo sviluppo di anticorpi monoclonali (mAb) diretti contro proteine di membrana iper-esprese o costitutivamente attivate nei tumori rappresenta l'approccio che più si avvicina al concetto di proiettile magico, proposto alla fine dell'ottocento da Paul Ehrlich a proposito dei chemioterapici antibatterici. Il testo illustra numerosi esempi di mAb terapeutici (Tabella 2), diretti in particolare contro recettori tirosin-chinasici per i fattori di crescita e utilizzati nella terapia di diversi tipi di tumori solidi; altri riconoscono invece antigeni di superficie appartenenti alla famiglia dei *cluster of differentiation* (CD) *antigens* e trovano impiego clinico nel trattamento di leucemie e linfomi; altri ancora modulano il cosiddetto *checkpoint* immunologico e trovano impiego nella terapia del melanoma metastatico (si veda oltre). Poiché per taluni bersagli (e.g. recettori della famiglia HER) esistono sia mAb specifici, sia inibitori a basso peso molecolare (<500 Da), e non sempre le risposte alle due classi di farmaci sono sovrapponibili, sembra opportuno confrontarne proprietà, vantaggi e svantaggi. Una prima differenza riguarda una serie di proprietà farmacocinetiche legate alla diversa natura e alle diverse dimensioni delle due classi di molecole. I mAb devono essere somministrati per via parenterale, non legano le proteine plasmatiche e non vengono filtrati dal rene né metabolizzati dagli enzimi che dipendono dalle varie isoforme del citocromo P450; questo li rende meno maneggevoli degli inibitori tirosin-chinasici (TKI), che hanno una buona biodisponibilità orale, ma ne prolunga sensibilmente l'emivita e inoltre riduce la variabilità interindividuale, sia su base farmacogenetica (legata all'espressione di forme più o meno efficienti degli enzimi farmaco-metabolizzanti), sia sulla base dell'eventuale interazione con farmaci assunti in concomitanza. Dal punto di vista farmacodinamico, i mAb possono interagire solamente con molecole espresse sulla superficie delle cellule tumorali, mentre i TKI hanno accesso

all'interno della cellula, e si distribuiscono inoltre in maniera più omogenea all'interno del tumore rispetto ai mAb grazie alle loro più piccole dimensioni. I mAb sono maggiormente selettivi per il bersaglio, e questo certamente riduce gli effetti *off-target* della terapia; d'altra parte, come descritto nel testo, la capacità di alcuni TKI di colpire più bersagli contemporaneamente è alla base del successo di farmaci come sorafenib e sunitinib in particolari tipi di tumore.

Infine, mentre la risposta ai TKI dipende dall'inibizione delle vie di trasduzione del segnale che si trovano a valle della chinasi colpita, nel caso dei mAb la risposta cellulare dipende da molteplici meccanismi, diretti e indiretti. Al primo gruppo fanno riferimento meccanismi che dipendono dai frammenti Fab del mAb, come il blocco dell'interazione ligando-recettore e/o della dimerizzazione del recettore, l'internalizzazione di quest'ultimo o l'inibizione del suo *processing* proteolitico e relativa inattivazione, con il risultato di inibire le vie di trasduzione del segnale che si trovano a valle e, in alcuni casi, di indurre la morte per apoptosi delle cellule tumorali. Al secondo gruppo appartengono invece i meccanismi indiretti, legati al reclutamento di cellule del sistema immunitario e del sistema del complemento dal parte della porzione Fc del mAb. Anche i meccanismi di resistenza sono spesso differenti per le due classi, come già illustrato. Dal punto di vista traslazionale, in linea generale i TKI sembrano risultare più efficaci nei tumori in cui si abbia un grado elevato di dipendenza oncogenica dall'attivazione costitutiva di una particolare chinasi mutata (p.e. gefitinib e erlotinib vs. EGFR o crizotinib e ceritinib vs EML4-ALK nel NSCLC), mentre i mAb sembrano più efficaci in quei tumori in cui l'attività recettoriale sia aumentata per un aumento del numero di copie del gene codificante il recettore o della sua espressione (p.e. trastuzumab vs HER2); il fatto che risultino efficaci anche in situazioni in cui la dipendenza oncogenica dall'attività recettoriale è più incerta (p.e. cetuximab e panitumumab vs EGFR nel mCRC) è probabilmente legato alla capacità dei mAb di reclutare anche la componente immunitaria, che procede all'eliminazione delle cellule tumorali in modo indipendente dalla modulazione dei segnali intracellulari.

Inibitori di vie di trasduzione dei segnali intracellulari

L'attivazione di TK recettoriali (RTK), come quella di TK intracellulari, ha come risultato l'attivazione di una varietà di vie di trasduzione dei segnali a livello intracellulare (Figura 1). Tra queste, due sono ritenute particolarmente importanti ai fini della crescita e della sopravvivenza delle cellule tumorali: la via di RAS-RAF-MEK (*MAP-ERK kinase*)-ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) e la via della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)/AKT/mTOR (*mammalian target of rapamycin*); nei confronti di queste due vie si sono cercati, e in alcuni casi trovati, inibitori efficaci almeno per alcuni tipi di tumore (Tabella 3).

Inibizione della via di RAS/RAF/MEK/ERK

La via di RAS-RAF-MEK-ERK svolge un ruolo centrale nella regolazione dei segnali proliferativi, di sopravvivenza e pro-metastatici, trasmettendo segnali provenienti dai recettori di superficie a substrati presenti nel citoplasma e nel nucleo. Elevati livelli di attività di questa via possono dipendere da una attivazione aberrante dei recettori a monte o da alterazioni a carico dei diversi elementi che la compongono. Inibirne la funzione può dare risultati molto diversi, a seconda del grado di dipendenza sviluppato dal tumore. A titolo di esempio, mutazioni di KRAS (la forma di RAS più frequentemente alterata nei tumori umani) hanno un ruolo *driver* per una frazione significativa di adenocarcinomi del polmone e di tumori del pancreas, e lo stesso vale per mutazioni di BRAF in oltre il 50% dei melanomi metastatici; al contrario, benché le stesse mutazioni siano presenti in una percentuale elevata di tumori del colon-retto, in questi tumori la dipendenza dalla via è meno pronunciata, e i risultati della sua inibizione assai meno spettacolari. L'oncogene *RAS*, uno tra i primi oncogeni identificati, codifica per una piccola G-proteina citoplasmatica, che si attiva a seguito del legame con il GTP e del reclutamento in membrana, dove promuove la formazione di complessi multi-proteici implicati nella proliferazione, nella sopravvivenza, nell'adesione e nella migrazione delle

cellule tumorali. L'interazione con la chinasi Ser/Thr-specifica RAF ne permette l'attivazione, a seguito della quale vengono fosforilate in cascata le chinasi MEK1/2 e ERK 1/2; queste ultime trasducono i segnali a livello nucleare e modulano l'attività del *pathway* mediante circuiti a feedback negativo. Nonostante il forte razionale per lo sviluppo di farmaci in grado di inibire RAS, decenni di tentativi non hanno prodotto alcun risultato clinicamente utile. Il targeting diretto di RAS è particolarmente arduo per la presenza nella molecola di un unico sito in grado di stabilire legami ad alta affinità, e questo sito è occupato in maniera permanente da GTP o GDP. Per questo i primi tentativi di inibire l'attività di RAS si sono basati su approcci di tipo indiretto, volti ad impedire le reazioni post-traduzionali di lipidazione che ne permettono l'indispensabile ancoraggio alla membrana. Questa strategia ha portato allo sviluppo degli inibitori della farnesilazione di RAS (*farnesyl transferase inhibitors*, FTI), composti non privi di attività clinica, ma i cui effetti sono probabilmente dovuti a meccanismi *off-target*, dato che KRAS e NRAS (altra isoforma frequentemente mutata nei tumori umani) possono subire una modificazione alternativa, la geranilgeranilazione, che ne preserva l'attività. In anni recenti la ricerca di strategie terapeutiche mirate a inibire l'attività di RAS sembra però avere trovato nuovi spunti, portando all'identificazione di una serie di composti in grado di interferire con l'interazione tra RAS e SOS (fattore di scambio di

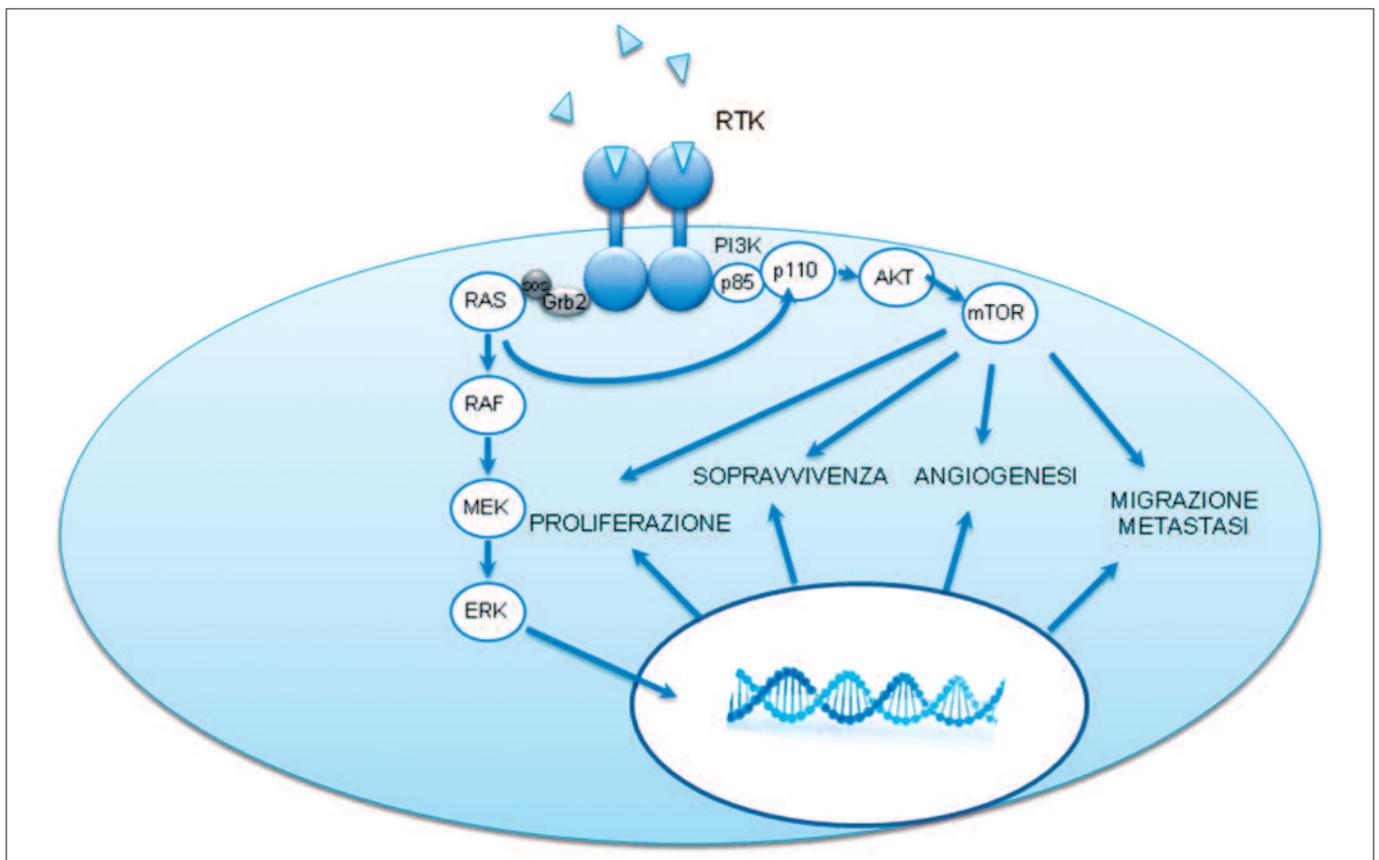


Figura 1 – Rappresentazione schematica delle due vie di trasduzione dei segnali (RAS-RAF-MEK-ERK) particolarmente importanti per l'insorgenza, la crescita e la progressione metastatica dei tumori.

nucleotidi guaninici che porta alla formazione del complesso attivo RAS-GTP⁽²⁴⁾ o tra RAS e il suo effettore principale RAF⁽²⁵⁾; inoltre sembra prendere forma anche la possibilità di colpire selettivamente forme mutate di RAS⁽²⁶⁾. Questi nuovi approcci sono però ancora in uno stadio molto precoce dello sviluppo preclinico e le attuali opzioni per modulare farmacologicamente l'attività della via RAS-RAF-MEK-ERK si basano sull'inibizione di elementi a valle di RAS, in particolare RAF e MEK.

Il primo inibitore di RAF ad ottenere l'approvazione per l'uso clinico è stato il sorafenib, originariamente sviluppato come inibitore di CRAF per il trattamento di tumori con mutazioni di RAS. Il sorafenib compete con l'ATP per il legame diretto al sito catalitico di CRAF, ma a causa delle analogie strutturali condivise dalla tasca che lega l'ATP in altre chinasi agisce anche su diverse tirosin-chinasi recettoriali implicate nel processo angiogenico. Il sorafenib è approvato per la terapia del carcinoma a cellule renali (RCC), del carcinoma epatocellulare (HCC) e del carcinoma differenziato della tiroide (DTC), ma si è rivelato molto deludente nei confronti del melanoma metastatico, che, come sopra accennato, mostra spesso una attivazione costitutiva della isoforma BRAF per la presenza di una caratteristica mutazione (BRAF^{V600E}).

Tra il 2011 e il 2013 sono stati approvati due nuovi inibitori, vemurafenib e dabrafenib, che inibiscono specificamente BRAF^{V600E} e che sono estremamente efficaci nei melanomi che mostrano dipendenza nei confronti di questa alterazione. La selettività di questi composti è stata spiegata in base al fatto che legano l'enzima nella sua conformazione attiva, secondo una modalità di tipo I, mentre il sorafenib lega di preferenza la conformazione inattiva (inibizione di tipo II) e perciò è scarsamente efficace nei confronti della proteina mutata BRAF^{V600E}, che è costitutivamente attiva. Dal punto di vista clinico la selettività mostrata da vemurafenib e dabrafenib è cruciale ai fini del trattamento dei melanomi BRAF^{V600E} perché solamente grazie a questa proprietà è possibile raggiungere il grado elevato di inibizione del bersaglio (>80%) necessario per ottenere una risposta senza incorrere in effetti tossici non sostenibili. Studi recenti hanno però mostrato che tutti i RAFi che competono con l'ATP - ivi compresi vemurafenib, dabrafenib and sorafenib - non solo sono poco efficaci sulla forma *wild-type* di BRAF, ma portano anzi a una paradossale attivazione della via di trasduzione nelle cellule in cui è presente BRAF *wild-type*^(27,28) (RAF *inhibitor paradox*), probabilmente perché favoriscono la dimerizzazione di RAF e la sua attivazione ad opera di RAS. Purtroppo però, come già riscontrato nel caso degli inibitori di BCR-ABL e EGFR, la risposta dei melanomi BRAF^{V600E}-positivi è di breve durata (< 1 anno), a causa dell'emergere di cloni cellulari resistenti. Diversamente da quanto osservato negli altri due casi, in cui mutazioni secondarie di un residuo di treonina *gatekeeper* rappresentano il meccanismo di resistenza più comune, e nonostante sia stato identificato un residuo di treonina che svolge analogha funzione nel sito attivo di BRAF, nel caso degli inibitori di quest'ultimo

la resistenza è spesso legata a una riattivazione di ERK, che può dipendere da mutazioni attivanti di NRAS, MEK1 o MEK2⁽²⁹⁾, dalla iper-espressione della forma mutata di BRAF, o dalla espressione di forme varianti derivate dallo *splicing* alternativo del mRNA di BRAF, che dimerizzano in modo indipendente da RAS⁽³⁰⁾. A questo proposito si è osservato che l'inibizione simultanea di BRAF^{V600E} e di MEK mediante l'inibitore trametinib è in grado di ritardare l'insorgenza di resistenza, e la combinazione di questo agente con il dabrafenib è stata approvata per l'uso clinico nel melanoma metastatico con mutazione BRAF^{V600E} o BRAF^{V600K}, facendo riscontrare tra l'altro una diminuzione degli effetti tossici caratteristicamente indotti dai due farmaci in monoterapia⁽³¹⁾. Tuttavia anche in questo caso la durata della risposta è compromessa dall'insorgenza di resistenza a entrambi i farmaci⁽³²⁾, e al momento non sono ancora disponibili inibitori di ERK (l'ultimo elemento della catena di trasduzione del segnale) in grado di contrastarla. Un altro possibile meccanismo è legato a una upregolazione della via di PI3K-AKT, altro *pathway* fondamentale per la trasduzione intracellulare di segnali oncogenici, a seguito dell'attivazione di recettori di membrana, come PDGFR β e IGF1R.

Inibizione della via PI3K/AKT/mTOR

Come per la via di RAS/RAF/MEK/ERK, anche per questa via di trasduzione l'attivazione può dipendere da alterazioni oncogeniche di RTK o di RAS, ma sono frequenti anche le mutazioni nel gene *PI3K*, che codifica per la subunità catalitica p110 α di PI3K, e l'inattivazione dell'oncosoppressore PTEN, che esercita un controllo negativo su tutta la via. PI3K è una chinasi lipidica che fosforilando il fosfatidilinositolo bisfosfato (PIP₂) di membrana a PIP₃ crea punti di ancoraggio che permettono il reclutamento e l'attivazione degli elementi successivi del *pathway*. AKT è una chinasi Ser/Thr-specifica che attraverso la fosforilazione di una varietà di substrati regola la sopravvivenza, la proliferazione e la migrazione cellulare. Tra i principali effettori di questa via è un'altra chinasi Ser/Thr-specifica, chiamata *mammalian target of rapamycin* (mTOR) per la sua capacità di essere inibita dalla rapamicina e dai suoi analoghi. mTOR rappresenta un nodo cruciale su cui convergono segnali mitogenici extracellulari e segnali relativi allo stato nutrizionale della cellula: solo in presenza di un sufficiente apporto di nutrienti i segnali mitogenici saranno in grado di tradursi in un effettivo aumento dell'attività biosintetica e della proliferazione cellulare. A questo proposito, l'attivazione di mTOR promuove un aumento della sintesi proteica, mentre una sua inibizione promuove il processo autofagico (un processo di degradazione controllata di macromolecole e organelli cellulari, da cui la cellula ricava i substrati energetici e i precursori che le sono necessari per la sopravvivenza in condizioni di carenza di nutrienti). Gli inibitori di mTOR derivati dalla rapamicina (un macrolide batterico utilizzato come immunosoppressore), noti con il nome di *rapalogs*, sono stati i primi farmaci attivi su questa via ad ottenere

l'approvazione per l'uso clinico. Everolimus e temsirolimus sono stati approvati per il trattamento del RCC e più recentemente l'everolimus (sommministrabile per via orale, al contrario del temsirolimus) ha ottenuto l'approvazione anche per il carcinoma della mammella ormone-responsivo e HER2-negativo (in combinazione con inibitori dell'enzima aromatasi) e nell'astrocitoma subependimale a cellule giganti (o SEGA). Si tratta di farmaci ben tollerati, ma piuttosto deludenti sotto il profilo dell'efficacia, principalmente per due motivi:

- mTOR opera nell'ambito di due diversi complessi multiproteici, uno dei quali (mTORC1) è direttamente implicato nella regolazione della sintesi proteica e della crescita cellulare attraverso l'attivazione della chinasi della proteina ribosomiale S6 (p70S6K) e la modulazione dell'equilibrio tra il fattore di inizio della traduzione eIF4E e il suo inibitore 4EBP, mentre il secondo (mTORC2) è coinvolto nella regolazione a monte del *pathway*, contribuendo all'attivazione di AKT. Gli analoghi della rapamicina sono inibitori allosterici che non inibiscono direttamente l'attività catalitica di mTOR, ma ne impediscono il reclutamento a livello di mTORC1, lasciando intatta l'attività di mTORC2;
- nell'ambito delle attività promosse da mTORC1, mTOR è in grado di esercitare una regolazione a feedback negativo sulla via di trasduzione del segnale che risulta quindi ulteriormente attivata nel suo complesso dall'azione dei *rapalogs*.

Inoltre è stata dimostrata l'esistenza di un controllo inibitorio a feedback da parte di mTORC1 sulla via di RAS/RAF/MEK/ERK⁽³³⁾, che risulterebbe quindi attivata in seguito al trattamento con i *rapalogs* e potrebbe contribuire a diminuirne l'efficacia. Infine, è stato identificato un peculiare meccanismo di resistenza ai *rapalogs*, basato su un aumento del rapporto eIF-4E/4E-BP. Diverse strategie sono state proposte per affrontare questi problemi:

- sviluppo di inibitori di mTOR di seconda generazione, che, agendo direttamente sul sito catalitico di mTOR, bloccano la sua attività indipendentemente dal complesso nell'ambito del quale agisce;
- disegno di inibitori bi-specifici diretti contro mTOR e PI3K;
- formulazione di combinazioni tra *rapalogs* e inibitori di tirosin-chinasi recettoriali o inibitori di PI3K, o tra inibitori di mTOR/PI3K e inibitori della via di RAS/RAF/MEK/ERK. Per tutti questi approcci sono attualmente in corso trials clinici di fase I e II.

Per quanto riguarda gli altri elementi del *pathway*, sono noti e utilizzati da anni due inibitori di PI3K per l'uso sperimentale, la wortmannina e il composto LY294002. La situazione è però molto complessa, a causa dell'esistenza di diverse classi di questo enzima, e del fatto che anche nell'ambito della classe più direttamente implicata nella trasduzione di segnali oncogenici (classe 1A) esistono diverse isoforme della subunità catalitica p110 (α , β , γ e δ) tra le quali non è ancora ben definito il livello di ridondanza. L'unico inibitore ad avere finora ottenuto l'approvazione per l'uso clinico è un inibitore selettivo per p110 δ , denominato idelalisib. Dato il ruolo im-

portante di p110 δ nella trasduzione di segnale a valle di numerosi recettori espressi dai linfociti, il nuovo farmaco è utilizzato nella terapia della leucemia linfatica cronica (LLC), in combinazione con il mAb anti-CD20 rituximab, e di alcune forme di linfomi non Hodgkin a cellule B. Diversi altri inibitori di PI3K sono attualmente oggetto di trials clinici, tra cui il pan-inibitore buparlisib (BKM120), in fase III per tumori della mammella ormone-sensibili in combinazione con inibitori dell'aromatasi e in fase I/II per tumori del polmone non a piccole cellule, e l'alpelisib (BYL719), selettivo per p110 α , in fase II per tumori della mammella ormone-sensibili in combinazione con inibitori dell'aromatasi e in fase I/II per tumori della testa e del collo e del colon-retto.

Terapie antiangiogeniche

Il concetto di terapia antiangiogenica ha avuto origine dalle osservazioni di Judah Folkman all'inizio degli anni 1970⁽³⁴⁾. Studi pre-clinici avevano mostrato che i tumori sono in grado di indurre lo sviluppo di nuovi vasi a partire dai vasi circostanti e che questo processo è fondamentale perché un tumore possa crescere oltre a una dimensione microscopica (1-2 mm di diametro). Inoltre, i vasi tumorali neoformati sono instabili e poco efficienti, e questo ne fa una via facilmente accessibile per la disseminazione metastatica delle cellule tumorali. Folkman propose perciò l'inibizione della formazione di nuovi vasi come strategia per reprimere la crescita e la metastatizzazione dei tumori umani. I vantaggi prospettati per questo approccio erano molteplici: un facile accesso al bersaglio (le cellule endoteliali) per il farmaco presente nel torrente circolatorio; una tossicità ridotta rispetto alla chemioterapia convenzionale, poiché nell'adulto il processo neoangiogenico ha un ruolo limitato, legato alla riparazione delle ferite e ad alcuni eventi del ciclo riproduttivo femminile; e un rischio ridotto di sviluppo di resistenza, poiché le cellule endoteliali sono cellule normali, e quindi non presentano l'instabilità genomica che caratterizza le cellule tumorali. L'uso clinico, ormai più che decennale, di queste terapie ha permesso di verificare che gli ultimi due presupposti sono solo parzialmente rispettati, come sarà discusso più avanti. Alla fine degli anni 1980, Napoleone Ferrara identificò un fattore mitogenico attivo sulle cellule endoteliali, denominato *vascular endothelial growth factor* (VEGF)⁽³⁵⁾.

Studi successivi hanno poi stabilito che:

- il VEGF è un fattore cruciale per la formazione dei nuovi vasi;
- VEGF è sovraespresso nella maggior parte dei tumori solidi;
- l'inibizione di VEGF riduce la crescita tumorale in modelli animali⁽³⁶⁾.

Sulla base di queste osservazioni sono stati sviluppati diversi farmaci, in grado di interferire con il VEGF o con i suoi recettori, che costituiscono oggi la base delle terapie antiangiogeniche in uso clinico. Il primo farmaco antiangiogenico è stato il bevacizumab (Tabelle 2 e 3), un anticorpo monoclonale umanizzato che lega una delle isoforme del VEGF (VEGF-A), impedendone l'interazione con i recettori di membrana delle cellule endoteliali, inizialmente approvato

per l'uso nel carcinoma metastatico del colon-retto (in combinazione con FOLFOX o FOLFIRI), e successivamente nel NSCLC (in combinazione con cisplatino o carboplatino), nel RCC metastatico e nelle forme ricorrenti di glioblastoma multiforme. Una ulteriore prova dell'efficacia delle terapie antiangiogeniche nel carcinoma metastatico del colon-retto è venuta da uno studio sull'affibercept, approvato nel 2011 per l'uso in combinazione con FOLFIRI. Si tratta di una proteina ricombinante che deriva dalla fusione del frammento cristallizzabile di una immunoglobulina umana con sequenze presenti nella porzione extracellulare dei recettori VEGFR1 e VEGFR2 ed è in grado di legare, oltre al VEGF-A, anche VEGF-B e il fattore di crescita placentare (PlGF), anch'essi coinvolti nell'angiogenesi e/o nella sopravvivenza dei vasi neo-formati.

Più recentemente è stato anche approvato un anticorpo monoclonale selettivo per il recettore VEGFR-2, denominato ramucirumab, come agente di seconda linea nella terapia del carcinoma gastrico o gastroesofageo avanzato. Accanto agli agenti biologici sono stati sviluppati anche inibitori tirosin-chinasici diretti contro uno o più recettori per VEGF (Tabelle 1 e 3). Si tratta in genere di inibitori multichinasici, come i già citati sunitinib e sorafenib, che hanno infatti tra i loro bersagli anche i recettori per VEGF (oltre a quelli per altri fattori pro-angiogenici quali PDGF e b-FGF). A questi si sono poi aggiunti il pazopanib, approvato per la terapia di forme avanzate di mRCC, attivo su tutti i recettori per VEGF, sul recettore KIT e sui recettori per PDGF e bFGF; l'axitinib, particolarmente attivo sui recettori VEGFR-1, -2 e -3, anche questo approvato per la terapia del mRCC; e il lenvatinib, che oltre ai 3 recettori per VEGF inibisce anche i recettori FGFR1, 2, 3, e 4, PDGFR α , KIT, and RET, recentemente approvato per la terapia del tumore differenziato della tiroide (DTC) metastatico o localmente ricorrente e refrattario al trattamento con iodio radioattivo. Nonostante l'indiscusso successo ottenuto dalle terapie antiangiogeniche contro le forme citate di tumore metastatico, per altri tumori, come il carcinoma della mammella, del pancreas e della prostata e il melanoma, sempre allo stadio metastatico, non è stato possibile indurre alcun miglioramento della sopravvivenza. Nel caso del carcinoma dell'ovaio, il bevacizumab ha certamente effetto nel ridurre l'ascite neoplastica; inoltre, causa un rallentamento della crescita del tumore e in combinazione con chemioterapici aumenta di alcuni mesi la sopravvivenza libera da progressione delle pazienti. Tuttavia, non vi sono evidenze che il farmaco aumenti la sopravvivenza, suggerendo la possibilità di un effetto *rebound* (si veda oltre).

L'uso dei farmaci antiangiogenici nel contesto delle terapie adiuvanti, sulla base del principio che, dopo la rimozione del tumore primario, l'inibizione della AG potrebbe impedire le recidive locali e/o la crescita di micrometastasi, ha dato risultati deludenti anche nel caso di tumori sensibili a questo approccio nelle forme metastatiche (mCRC), suggerendo che le micrometastasi possano presentare sostanziali differenze, dal punto di vista biologico e nella dipendenza

dall'angiogenesi, rispetto alle metastasi ormai consolidate. In ambito neoadiuvante l'adozione delle terapie antiangiogeniche potrebbe ridurre le dimensioni del tumore, riducendo l'invasività dell'intervento chirurgico, e potrebbe anche migliorare lo stadio del tumore, riducendo le probabilità di recidive o metastasi. Da questo punto di vista l'uso neoadiuvante del bevacizumab è raccomandato prima della resezione delle metastasi epatiche. Una importante differenza riscontrata tra TKI attivi sui recettori per VEGF e agenti biologici che sequestrano il fattore consiste nel fatto che, mentre i primi in generale sono attivi come monoterapia, farmaci come bevacizumab e affibercept, salvo rare eccezioni, mostrano un'attività significativa solo in combinazione con la chemioterapia. Questa dicotomia potrebbe dipendere da differenze intrinseche alla componente stromale dei diversi tipi di tumore: nei tumori responsivi alla combinazione bevacizumab/chemioterapia (mCRC, NSCLC) i vasi sono circondati da uno stroma ben sviluppato, in analogia con quanto si osserva nei tessuti normali, mentre nei tumori che rispondono bene alla monoterapia con TKI (mRCC; tumori neuroendocrini del pancreas) i vasi si trovano a stretto contatto con le cellule tumorali senza l'interposizione di una significativa componente stromale⁽³⁷⁾.

Per spiegare l'effetto sinergico osservato tra bevacizumab o affibercept e chemioterapici, per la verità piuttosto inatteso, è stato proposto il concetto della normalizzazione vascolare: la scarsa efficienza dei vasi tumorali neoformati, aumentando la pressione dei liquidi interstiziali, crea un ostacolo all'accesso dei chemioterapici alle cellule tumorali⁽³⁸⁾. L'inibizione dei segnali che dipendono dal VEGF, migliorando la funzionalità dei vasi, migliorerebbe anche l'accesso dei farmaci alle cellule del tumore. La conclusione che il bevacizumab funzioni in clinica perché migliora la distribuzione dei chemioterapici si scontra però con l'osservazione che questo non sembra valere per tutti i contesti, come dimostrato dal fatto che in pazienti con NSCLC il bevacizumab è risultato diminuire, anziché aumentare, i livelli di chemioterapici nel tumore⁽³⁹⁾.

Resistenza ai farmaci antiangiogenici

Osservazioni cliniche e precliniche indicano che, come era da attendersi, quando la terapia anti-VEGF viene sospesa la rete vascolare tumorale viene rapidamente ristabilita, portando a una ricrescita del tumore. Questo suggerisce che sia necessario un uso prolungato di agenti anti-VEGF per poter ottenere il massimo beneficio. Tuttavia, nella maggior parte dei casi la risposta del tumore tende a diminuire con il protrarsi del trattamento, a causa dell'instaurarsi di resistenza. Contrariamente alle attese, infatti, si può osservare resistenza in entrambe le forme, intrinseca e acquisita, anche nei confronti di queste terapie. I meccanismi alla base del fenomeno sono molteplici, ma fondamentalmente possono essere ricondotti a due tipologie principali:

- attivazione da parte del tumore di vie alternative per indurre la formazione di nuovi vasi;
- adattamento delle cellule tumorali ad una situazione di ridotto apporto di ossigeno e nutrienti⁽⁴⁰⁾.

Per quanto riguarda la prima tipologia, studi preclinici indicano una maggiore efficacia delle terapie anti-VEGF nel sopprimere i vasi di formazione più recente rispetto a quelli già parzialmente stabilizzati. L'opinione prevalente è che i vasi nascenti dipendano strettamente dal VEGF, ma che con la maturazione questa dipendenza venga meno ⁽⁴¹⁾. Ad esempio, un aspetto importante della maturazione vascolare è rappresentato dal reclutamento dei periciti a formare un rivestimento attorno alle cellule endoteliali sotto l'effetto del PDGF e terapie dirette contro questo processo migliorano l'efficacia delle terapie anti-VEGF. Angiopoietine, EGF, la via Delta-Notch, FGF-1 e -2, HGF, IL-8 e PlGF sono altri fattori pro-angiogenici che si sostituiscono o sovrappongono al VEGF nel sostenere la crescita e la sopravvivenza dei vasi tumorali; la maggior parte degli inibitori multichinasici è in grado di sopprimere i segnali mediati da molteplici fattori, ma nonostante questo anche con questi agenti presto o tardi si osserva progressione della malattia. Inoltre, la neo-angiogenesi (in base alla quale i nuovi vasi originano per *sprouting*⁽⁶⁾ dai vasi preesistenti) è solamente una delle modalità con cui i vasi tumorali possono formarsi. Altre modalità descritte comprendono l'*intussuscezione* (processo in cui una colonna di tessuto tumorale esercita una pressione localizzata sulla parete di un vaso, la allunga e causa la fissione del vaso in due strutture figlie), il reclutamento di cellule provenienti dal midollo emopoietico e l'incorporazione nella parete dei vasi, e il *vasculogenic mimicry* in base al quale le cellule tumorali acquisiscono un fenotipo de-differenziato e formano strutture tubulari che si raccordano poi con i vasi circostanti. Infine, in tumori che si sviluppano in organi con uno stroma particolarmente vascolarizzato le cellule possono crescere lungo i vasi già esistenti, bypassando in gran parte la necessità di formare nuovi vasi tumorali (co-optazione vascolare) ⁽⁴²⁾. In tutti questi casi la dipendenza del tumore da VEGF sembra essere meno esclusiva e anzi, l'induzione di queste particolari modalità angiogeniche può essere conseguenza diretta della down-regolazione dei segnali mediati da VEGF ⁽⁴³⁾.

La seconda tipologia di meccanismi di resistenza si basa invece sulla risposta adattativa del tumore a una condizione di ridotta vascolarizzazione. Un ruolo importante in questi fenomeni adattativi spetta certamente all'ipossia e ai fattori trascrizionali inducibili dalla stessa, HIF-1 e HIF-2. In condizioni di carenza di ossigeno, quali quelle che si vengono a creare nei tumori solidi scarsamente vascolarizzati, l'ipossia rappresenta il principale stimolo per l'angiogenesi, attraverso un aumento dell'espressione di VEGF mediato dall'attivazione degli HIF, ma questa è solamente una delle molteplici risposte che vengono attuate e che nel loro complesso determinano un notevole aumento dell'aggressività del tumore, favorendo in particolare la transizione epitelio-mesenchimale che rappresenta il presupposto per l'invasività e la metastatizzazione. Proprio questo aspetto desta

qualche preoccupazione a proposito della terapia antiangiogenica, che riducendo l'apporto di ossigeno al tumore tende ad accentuare la risposta all'ipossia. Alcuni autori hanno suggerito che l'aumentata aggressività dei tumori ipossici possa spiegare lo scarso successo dei farmaci antiangiogenici nei confronti di alcuni tipi di tumore, anche nell'ambito adiuvante, e che qualche vantaggio si potrebbe ottenere associando alla terapia antiangiogenica interventi volti a inibire l'attività dei fattori HIF⁽⁷⁾⁽⁴⁴⁾. Inoltre, la riduzione dell'apporto di ossigeno e nutrienti causata dai farmaci antiangiogenici è in grado di indurre autofagia, che, come già accennato, è un processo catabolico altamente conservato in base a quale proteine e organelli usurati vengono inglobati in vescicole delimitate da membrane a doppio strato (gli autofagosomi) e veicolati ai lisosomi dove vengono degradati e utilizzati per produrre energia. L'attivazione del processo autofagico protegge il tumore nei confronti di moltissimi agenti terapeutici, e può rappresentare un meccanismo di resistenza anche contro i farmaci antiangiogenici ⁽⁴⁵⁾. Per questo, l'efficacia degli antiangiogenici potrebbe beneficiare dell'associazione con farmaci in grado di bloccare il processo autofagico, come per l'esempio la idrossiclorochina, attualmente oggetto di numerosi trials clinici per questa sua azione.

Farmaci epigenetici

Accanto alle alterazioni genomiche che portano all'attivazione degli oncogeni e alla perdita di funzione di geni oncosoppressori, un numero di evidenze sempre maggiore indica che anche le alterazioni dell'espressione genica attraverso meccanismi epigenetici sono di grandissima importanza per l'oncogenesi e la progressione tumorale. La ricerca di farmaci epigenetici ha avuto negli ultimi anni uno sviluppo rapidissimo e ci sembra utile fare una breve introduzione all'argomento, che è piuttosto complesso, ma certamente affascinante dal punto di vista biologico ed anche attraente per approcci farmacologici ⁽⁴⁶⁾.

È ormai noto che il DNA che codifica per proteine rappresenta circa il 3% di tutto il DNA presente nel genoma umano. Si ritiene oggi che il 97% del DNA svolga funzioni regolatorie importanti e che diversi tipi di RNA che non codificano per proteine svolgano un ruolo cruciale nell'insorgenza e nella progressione tumorale. Tra le molecole di RNA non codificanti i microRNA sono sicuramente quelle meglio caratterizzate in numerosi tipi di tumore. Ne sono stati identificati circa 3000, ed ognuna di queste molecole può regolare l'espressione genica di centinaia di geni, alterando in modo significativo la biologia cellulare. Per ora queste molecole non sono ancora utilizzate come i farmaci, ma riteniamo plausibile che lo sviluppo di sistemi adeguati di veicolazione possa permetterne in futuro l'impiego in oncologia.

Nel contesto di questo articolo ci sembra importante spiegare alcuni

6] Letteralmente, germogliano.

7] In effetti, everolimus e temsirolimus (già citati tra gli inibitori della via PI3K/Akt/mTOR) trovano impiego nella terapia del mRCC perché grazie all'inibizione di mTOR sono in grado di ridurre la sintesi di VEGF mediata da HIF-1.

altri meccanismi epigenetici che hanno offerto l'opportunità per lo sviluppo di farmaci già utilizzati in clinica o attualmente oggetto di sperimentazioni cliniche.

È noto come la cromatina, oltre a compattare il DNA, costituisca lo scheletro sul quale hanno luogo le interazioni con la macchina trascrizionale, e come sue modificazioni possano portare all'attivazione o alla repressione della trascrizione di cluster di geni ⁽⁴⁷⁾.

Le modificazioni della cromatina riguardano sia il DNA che le proteine istoniche. A livello del DNA è noto da molti anni il ruolo delle citosine metilate in posizione 5 nel mantenere un'ereditarietà epigenetica nelle cellule figlie. La metilazione delle citosine, catalizzata dalla famiglia delle DNA-metiltransferasi (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B), riguarda sequenze regolatorie che contengono nucleotidi CpG e porta alla soppressione della trascrizione inibendo il legame dei fattori trascrizionali richiesti per l'attivazione della trascrizione ^(48, 49).

Sono utilizzati in clinica da molti anni composti quali la azacitidina e la deossi-azacitidina (o decitabina), che inibiscono le DNA-metiltransferasi ed inducono ipometilazione, che a sua volta porta all'attivazione della trascrizione di numerosi geni con conseguente effetto differenziante contro alcuni tumori di origine ematologica ⁽⁵⁰⁾. In realtà è probabile che una delle ragioni dell'effetto antitumorale di questi farmaci sia riferibile ai danni causati al DNA dall'incorporazione di azacitosina che viene successivamente rimossa dal DNA a opera di glicosidasi, formando siti apirimidinici, che vengono trasformati in rotture del DNA da endonucleasi ⁽⁵¹⁾.

Preferiamo in questa sezione concentrarci maggiormente sugli altri farmaci che agiscono su meccanismi epigenetici in quanto di più recente utilizzo in clinica per alcune leucemie, ma in sviluppo anche per molti tumori solidi.

Inibitori delle istone-deacetilasi

L'acetilazione dei residui di lisina negli istoni H3 e H4 modifica la carica di queste proteine e quindi il loro legame al DNA, che a sua volta regola l'espressione genica ^(52, 53). Gli enzimi HDAC, rimuovendo i gruppi acetilici dagli istoni, aumentano il legame di queste proteine al DNA, e così facendo limitano l'accesso dei fattori trascrizionali alle regioni regolatorie. Numerosi studi hanno messo in evidenza l'espressione aberrante di HDAC in diversi tipi di neoplasie umane. Per alcune di esse, quali carcinomi della prostata, della mammella, del polmone, dello stomaco e del fegato, l'iper-espressione di particolari isoforme di HDAC, soprattutto le isoforme 1, 2, 3 e 6, risulta correlata in modo inverso alla sopravvivenza ⁽⁵⁴⁾.

L'iper-espressione di HDAC porta ad una repressione epigenetica di geni soppressivi, tra cui quelli che codificano per proteine che hanno una funzione nella riparazione del DNA, come BRCA1, ATM o ATR. Il meccanismo epigenetico delle diverse isoforme di HDAC è complesso e non sempre la iper-espressione è correlata a una prognosi infausta; ad esempio, sia in pazienti con carcinoma

della mammella estrogeno-positivi ⁽⁵⁵⁾ sia nel linfoma cutaneo a cellule T (CTCL)⁽⁵⁶⁾ che è sia sensibile agli inibitori HDAC(HDACi), l'iper-espressione di HDAC-6 è un indicatore di buona prognosi ⁽⁵⁴⁾. Questa complessità spiega anche la difficoltà a prevedere l'attività dei HDACi sulla base dell'espressione delle diverse isoforme di questi enzimi. È anche da tenere in conto che le HDAC non deacetilano soltanto proteine istoniche, ma anche altre proteine che svolgono un ruolo chiave nella cellula. Ad esempio, deacetilano direttamente l'oncosoppressore p53, causando una diminuzione della sua attività trascrizionale ⁽⁵⁷⁾, mentre per altri fattori trascrizionali, quali SP1, C/EBP α e HIF-1 la deacetilazione comporta un aumento dell'attività, e la conseguente attivazione della trascrizione di oncogeni come BCL2 ⁽⁵⁸⁾.

L'importanza del ruolo delle HDAC, documentata nella letteratura oncologica recente, ha stimolato l'interesse a identificare e sviluppare prodotti naturali e composti di sintesi in grado di inibire questi enzimi e di svolgere un'attività antitumorale. Attualmente tre composti appartenenti alla classe degli inibitori delle HDAC hanno ottenuto l'approvazione della FDA (vorinostat e romidepsina per la terapia del CTCL e panobinostat per quella del mieloma multiplo) e moltissimi altri sono in sperimentazione clinica per diversi tipi di tumori.

Come si comprende dalla Tabella 4 le diverse isoforme di HDAC hanno funzioni diverse, ma globalmente esse regolano il ciclo cellulare, la morte cellulare, il differenziamento, l'immunogenicità, l'immunosoppressione e l'angiogenesi attraverso una varietà di meccanismi di regolazione epigenetica della trascrizione, ma anche attraverso l'attivazione o inattivazione di proteine che giocano un ruolo importante in tutti i processi biologici elencati.

Gli HDACi registrati ed utilizzati in clinica inibiscono tutte le isoforme principali, tranne la isoforma 6, che non viene inibita dalla romidepsina. Sono in corso molte sperimentazioni cliniche con nuovi inibitori di HDAC, alcuni dei quali particolarmente selettivi per alcune classi. Ad esempio, un inibitore selettivo dell'HDAC-1 (MGCD0103) è allo studio per alcune neoplasie ematologiche; un inibitore specifico della forma 6 (ACY-1215) è in studio nel mieloma, sia impiegato da solo che in combinazione con altri farmaci.

Ci sono molti nuovi composti in sperimentazione anche per la terapia di tumori solidi ⁽⁵⁴⁾. Anche se in alcuni casi si è osservata attività antitumorale, al momento attuale non disponiamo però di dati sufficienti per trarre conclusioni sulla loro efficacia.

Inibitori delle istone metiltransferasi

Un'altra modificazione importante che può avvenire su specifici residui di lisina presenti nelle proteine istoniche è la metilazione ⁽⁴⁶⁾. Mentre la lisina può accettare un singolo gruppo acetile, nel caso della metilazione può essere mono-, di- o tri-metilata, con risultati profondamente diversi a seconda del numero di gruppi metilici

HDAC	TUMORI DOVE C'È IPERESPRESSIONE	EFFETTI VISTI DALLA SOPPRESSIONE DI ESPRESSIONE DEL GENE
Classe I (Omologo alle proteine RDP3 di lievito, localizzazione molecolare, espressione in tutti i tessuti)		
HDAC1	Carcinomi dello stomaco, mammella, colon-retto, polmone, fegato e linfoma di Hodgkin.	Arresto crescita e apoptosi in molte linee di carcinoma del colon e mammella e di osteosarcoma.
HDAC2	Carcinomi dello stomaco, prostata, colon-retto, CTCL, linfoma di Hodgkin	Arresto crescita e apoptosi in linee di carcinoma del colon, della mammella e del polmone.
HDAC3	Carcinomi dello stomaco, mammella, colon-retto e linfoma di Hodgkin	<i>Knock-down</i> causa apoptosi in linee di carcinoma del colon
HDAC8	Neuroblastoma	Ridotta proliferazione in alcune linee cellulari di carcinoma
Classe II (Omologo alle proteine Hda1 di lievito, localizzazione molecolare e citoplasmatica, espressione ristretta ad alcuni tessuti)		
HDAC4	–	<i>Knock-down</i> della crescita e apoptosi in linee cellulari di carcinomi
HDAC5	Medulloblastoma	Diminuzione della crescita di cellule di medulloblastoma
HDAC7	ALL	Arresto della crescita in linee di carcinomi del colon e mammella
HDAC9	ALL, medulloblastoma	Inibizione di ricombinazione omologa con conseguente aumento di sensibilità ai farmaci che danneggiano il DNA e diminuzione della crescita di cellule di medulloblastoma
Classe IIb		
HDAC6	Carcinoma della mammella, rene, fegato e polmone	Accumulo di proteine con struttura terziaria aberrante e apoptosi di linee tumorali
HDAC10	–	Inibizione di ricombinazione omologa con conseguente aumento di sensibilità ai farmaci che danneggiano il DNA

Tabella 4 – Classificazione delle principali classi di HDAC. Una parte della ricerca si è concentrata sulla identificazione di inibitori che avessero una particolare selettività per alcune isoforme specifiche. È di seguito indicata la classificazione delle diverse classi di HDAC, i tumori in cui sono iperespressi questi enzimi e i tumori per i quali esistono evidenze di attività antitumorali quando si silenzia geneticamente il gene. Non si specificano i meccanismi per i quali ognuna delle isoforme ha una sua specificità d'azione che riguarda sia la trascrizione genica che la modificazione post-traduzionale di proteine non istoniche (ad esempio l'isoforma 6 acetila la tubulina).

aggiunti⁽⁵³⁾. Mentre l'acetilazione modifica la carica della lisina, nel caso della metilazione il cambiamento riguarda la basicità e la idrofobicità, e la diversa localizzazione dei residui di lisina nella sequenza aminoacidica dell'istone può attivare o reprimere la trascrizione⁽⁵⁹⁾. Per esempio la tri-metilazione della lisina in posizione 27 dell'istone H3 (H3K27me3) è associata alla repressione della trascrizione, mentre quella della posizione 4 (H3K4 me3) si trova generalmente vicino al sito di inizio di trascrizione di geni che sono attivamente espressi. Anche la metilazione della lisina 79 dell'istone H3 (H3K79) è associata all'attivazione trascrizionale, così come la metilazione della lisina 20 dell'istone H4⁽⁶⁰⁻⁶²⁾.

Come si può vedere nella tabella 5 due composti appartenenti a questa classe sono in studio in clinica. La sperimentazione è stata iniziata in tumori ematologici in quanto in alcuni di essi sono state identificate mutazioni ricorrenti di regolatori della cromatina; ad esempio, mutazioni di EZH2 aumentano i livelli di metilazione della lisina 27 (H3K27me3). Accanto a questi studi stanno comunque iniziando sperimentazioni anche in molti tumori solidi.

Inibitori dei bromodomain

Un aspetto importante della biologia cellulare riguarda le modificazioni post-traduzionali delle proteine e la presenza di sistemi proteici che fungono da lettori di queste modificazioni. Le proteine istoniche sono modificate da scrittori, come le HDAC o enzimi chinasi. Le acetil-lisine presenti negli istoni H3 e H4 possono essere riconosciute da una famiglia di proteine conservate nell'evoluzione, denominate bromodomain, perché identificate per la prima volta nel gene Brahma della drosophila. Nelle cellule umane vi sono 61 bromodomain in 42 diverse proteine, e alcune proteine possono contenere fino a sei bromodomain⁽⁶³⁾. Lo studio della struttura tridimensionale di molti membri della famiglia dei bromodomain ha permesso di dimostrare che queste proteine contengono una tasca idrofobica ben conservata che può contenere le catene laterali di acetil-lisina⁽⁶⁴⁻⁶⁸⁾.

Inibitori dei bromodomain BRD2, BRD3 e BRD4 costituiscono dei potenziali farmaci epigenetici, agendo sulla regolazione della trascrizione. È da notare come i bromodomain siano presenti soprattutto a livello delle sequenze dette *superenhancer*, che incorpo-

CLASSI DI FARMACI	TIPO DI TUMORE	STATO
Inibitori delle DNA metiltransferasi		
Azacitidina	Sindrome mielodisplastica	Approvato
Decitabina	Sindrome mielodisplastica	Approvato
Inibitori delle istone deacetilasi		
Vorinostat	Linfoma T cutaneo	Approvato
Romidepsina	Linfoma T cutaneo	Approvato
Panobinostat	Mieloma	Approvato
Inibitori delle istone demetilasi		
EPZ-7438	Linfoma non Hodgkin	Fase I/II
EPZ-5676	Leucemia con riarrangiamento MLL	Fase I/II
Inibitori dei bromodomain		
OTX-015 / MK-8628	Tumori ematologici	Fase I/II
GSK-525762	NUT midline carcinoma (NMC)	Fase I

Tabella 5 – Farmaci epigenetici.

rano alti livelli di fattori trascrizionali e cofattori in grado di modulare l'espressione di geni importanti per l'oncogenesi e la progressione tumorale^(69, 70). Gli inibitori dei bromodomain hanno mostrato attività antitumorale in diversi modelli preclinici di tumori solidi ed ematologici e uno di essi, denominato OTX-015, ha mostrato attività in leucemie e linfomi in fasi iniziali di sperimentazione clinica⁽⁷¹⁾.

Altri inibitori della trascrizione

Alcuni composti naturali, come le mitramicine⁽⁷²⁾ e le ecteinascidine⁽⁷³⁾, sembrano poter influenzare il legame di fattori trascrizionali a sequenze regolatorie⁽⁷³⁾. Gli studi più estesi sono stati condotti con trabectedina, un composto naturale di origine marina, originariamente estratto dal tunicato *Ecteinascidia turbinata* e poi ottenuto per sintesi chimica, approvato per l'impiego clinico nella terapia di sarcomi e tumori dell'ovaio. Per alcuni sarcomi con traslocazioni che causano l'espressione di proteine chimeriche, come FUS-CHOP nel liposarcoma mixoide o EWS-FLI1 nel sarcoma di Ewing, questo farmaco è in grado di bloccare l'attività transattivante di questi fattori trascrizionali neutralizzando il loro effetto oncogenico^(74, 75). Nel caso del liposarcoma mixoide questo meccanismo induce sia in vitro che in vivo un differenziamento adipocitico altamente specifico, con scomparsa della trama vascolare^(74, 76). Lo stesso farmaco modifica la trascrizione e la produzione di citochine, chemochine e fattori angiogenici, prodotti sia dal tumore che da cellule presenti nel tumore, come macrofagi associati al tumore^(77, 78).

Terapie indirizzate ai checkpoint del sistema immunitario

L'instabilità genomica dei tumori e la conseguente presenza di un gran numero di mutazioni geniche portano all'espressione di una varietà di proteine antigeniche, che dovrebbero essere riconosciute dal sistema immunitario. Nonostante ciò, i tumori non vengono rigettati dal sistema immunitario perché sono in grado di promuovere una serie di meccanismi che sopprimono la risposta immune contro il tumore. Ricerche mirate al potenziamento delle risposte immunitarie contro il tumore per alcuni decenni non hanno prodotto risultati terapeutici di grande rilievo. Recentemente però sono state sviluppate nuove terapie immunologiche mirate ai *checkpoints* del sistema immunitario, cioè ai freni che non permettono ai T linfociti citotossici di esercitare le loro funzioni e di uccidere le cellule tumorali. La scoperta che il blocco del *checkpoint* operato dal *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) porta a regressione di tumori murini ha infatti aperto la strada allo sviluppo clinico e alla rapida approvazione di un anticorpo anti-CTLA4, denominato ipilimumab per il trattamento di pazienti con melanoma in fase avanzata. Successivamente sono stati sviluppati altri anticorpi contro un altro *checkpoint*, operato dalla proteina PD-1 (*programmed cell death-1*) e dal suo ligando PD-1L. Questi anticorpi hanno mostrato attività clinica non solo nel melanoma metastatico (come nel caso del pembrolizumab, recentemente approvato per questa indicazione), ma anche contro altri tumori, come i carcinomi del polmone, per il quale è stato re-

centemente approvato l'anticorpo umano nivolumab. Questa strategia terapeutica sembra molto promettente, in quanto in una frazione di casi le risposte terapeutiche sono di lunga durata. Mentre la strategia terapeutica si sta affinando sulla base dell'identificazione di altri *checkpoints* da colpire e della possibilità di inibire in modo combinato diversi *checkpoints* si stanno anche cercando di chiarire le basi dell'elevata variabilità della risposta osservata. Sembra infatti che la potenziale risposta del sistema immunitario possa venire neutralizzata da meccanismi soppressivi non ancora ben definiti. Anche per l'immunoterapia si prevede per i prossimi anni lo sviluppo di combinazioni mirate che, colpendo simultaneamente diversi meccanismi soppressivi, risultino efficaci in molte malattie neoplastiche.

Tossicità dei farmaci a bersaglio

Le tossicità sono differenti da quelle dei farmaci antitumorali convenzionali. I principali effetti collaterali includono tossicità dermatologica, diarrea, ipotiroidismo, proteinuria, cardiotoxicità ed epatotossicità.

Alcune di queste tossicità sono correlate al meccanismo d'azione e sono quindi relative all'inibizione di *pathway* che non sono importanti soltanto nel tumore, ma anche in alcuni tessuti normali. In questo caso si avrà una similarità di effetti collaterali utilizzando piccole molecole o anticorpi che inibiscono lo stesso target; ad esempio, sia anticorpi che piccole molecole che inibiscono EGFR causano tossicità dermatologica con rash cutanei e il grado della tossicità è associato all'entità della risposta terapeutica. In altri casi si osservano invece effetti indipendenti dalla specifica inibizione del target farmacologico e quindi è lecito attendersi che vi siano differenze tra la tossicità causata dagli anticorpi diretti contro un particolare target e quella causata da piccole molecole che agiscono inibendo lo stesso target, ma con un grado minore di specificità.

La tossicità dermatologica è un effetto collaterale comune a diversi inibitori chinasi, anche se vi sono differenze nell'entità e nel tipo. Ad esempio, mentre gli inibitori di EGFR causano un rash acneiforme sul viso, gli inibitori di PI3K/AKT/mTOR generalmente causano un rash maculo-papulare sul tronco. Probabilmente nella patogenesi di questo rash vi è un interessamento delle citochine a livello locale e questo tipo di effetto collaterale sembra indipendente dall'effetto terapeutico antitumorale.

La diarrea è un effetto collaterale a volte anche grave dei farmaci che agiscono come inibitori di EGFR, mentre è piuttosto raro dopo somministrazione di anticorpi contro lo stesso target, come cetuximab. È interessante l'osservazione che la diarrea causata da farmaci che inibiscono tirosine chinasi può essere alleviata con la somministrazione concomitante di steroidi non assorbibili come il budesonide, probabilmente attraverso un meccanismo antiinfiammatorio locale. Un'altra osservazione interessante è che alcuni polimorfismi di geni che codificano per il trasportatore ABCG2 o del promoter del gene EGFR possono influenzare la suscettibilità alla diarrea

indotta da inibitori di tirosine chinasi. I farmaci antiangiogenici che interferiscono con il VEGF o i suoi recettori, che si tratti di anticorpi o piccole molecole, causano ipertensione. La patogenesi dell'ipertensione sembra dovuta ad una diminuita produzione di ossido nitrico e prostaciclina, alla rarefazione vascolare e ad una tossicità renale associata a questi trattamenti. L'ipertensione sembra essere correlata all'effetto terapeutico delle terapie anti-angiogeniche e vi sono evidenze che alcuni polimorfismi del gene che codifica per VEGF influenzino la suscettibilità alla ipertensione.

Antiangiogenici che agiscono inibendo i recettori di VEGF possono inoltre causare ipotiroidismo. Questo effetto collaterale è invece relativamente raro quando si utilizzano degli anticorpi contro VEGF. Questa discrepanza ci dice che probabilmente questo effetto collaterale non è correlato all'effetto anti-angiogenico, ma che la soppressione dell'attività recettoriale ha altri effetti che non sono riscontrabili quando si elimina il ligando con anticorpi specifici.

Molti inibitori tirosin-chinasi causano un allungamento dell'intervallo QT, che nella maggioranza dei casi non è clinicamente rilevante. Si pensa che questo effetto elettrocardiografico sia dovuto all'inibizione della trasmissione dei segnali, ma il meccanismo non è stato ancora chiarito con precisione.

La tossicità epatica è variabile per i diversi inibitori chinasi, può variare da circa il 10% per molti inibitori come il gefitinib al 50% per il pazopanib. Non si sono osservate correlazioni tra il grado di epatotossicità ed effetto antitumorale.

Molti inibitori delle chinasi causano tossicità oculare. Gli inibitori di EGFR, quali erlotinib o cetuximab, causano congiuntiviti, blefariti, disturbi della visione e erosioni corneali, verosimilmente dovuti all'inibizione del recettore del fattore di crescita. Gli inibitori di MEK causano disturbi della visione, della percezione dei colori, retinopatia centrale e occasionalmente occlusione della vena retinica con perdita della vista. I meccanismi patogenetici della retinopatia non sono chiari; si ipotizza che la tossicità sia attribuibile ad una soppressione combinata della trasduzione dei segnali che coinvolgono diversi fattori, quali FGFR, RAS, RAF e MEK, che giocano un ruolo nello sviluppo, mantenimento e riparo della retina.

Gli inibitori del *pathway* PI3K/AKT/mTOR causano iperglicemia e dislipidemia in un'alta percentuale di casi ed alcune osservazioni suggeriscono che queste tossicità metaboliche siano associate all'attività terapeutica.

Conclusioni

In questo articolo sono state riassunte alcune delle principali classi di composti sviluppate recentemente per la terapia dei tumori con l'intento di inibire in modo specifico dei bersagli molecolari importanti per processi biologici associati alle malattie neoplastiche.

Certamente la scoperta degli oncogeni e dei geni soppressori e la comprensione di alcune vie di trasmissione dei segnali iperattivati in diversi tumori hanno permesso di identificare e sviluppare nuovi

principi attivi con meccanismo d'azione del tutto nuovo rispetto a quello dei farmaci convenzionali.

Come si è discusso in modo dettagliato, l'impiego di alcuni farmaci trova il razionale in aberrazioni specifiche per particolari tipi e sottotipi tumorali, e questo porta con sé la necessità di disporre di *bio-markers* che permettano di valutare la probabilità di risposta del paziente a un dato trattamento. In alcuni casi la predizione di attività dei farmaci in base a specifiche mutazioni è ben dimostrata, e questo consente di personalizzare il trattamento, così come si fa da molti anni per la terapia anti-estrogenica per i tumori della mammella che esprimono i recettori per gli estrogeni.

Nella pratica clinica oncologica si applicano protocolli terapeutici in base alla patologia, allo stadio ed ad alcune caratteristiche anatomopatologiche del tumore. Per alcuni nuovi farmaci diventa quindi necessario affiancare indagini di patologia molecolare che consentano di prevedere quali siano i farmaci con la maggiore probabilità di successo. Si è recentemente ipotizzato che valutazioni molecolari specifiche potrebbero indirizzare il trattamento con un farmaco, indipendentemente dal tipo di tumore o dalle sue caratteristiche anatomopatologiche, ma in base alla espressione e/o attivazione di un certo *pathway*. Sono in corso sperimentazioni di questo tipo che vanno sotto il nome di *basket studies* ed è ancora presto trarre delle conclusioni sull'efficacia di questo approccio.

Quello che emerge da più di un decennio di sperimentazioni con alcuni dei farmaci specifici per una varietà di bersagli molecolari è la frequente insorgenza di resistenza, con il predominare di cloni cellulari che esprimono bersagli non più sensibili al trattamento, ad esempio per ulteriori mutazioni, o che attivano vie alternative, aggirando il blocco indotto dal farmaco. Gli studi più recenti, che si avvalgono di metodiche di sequenziamento del DNA molto più sensibili di quelle utilizzate in passato, fanno ritenere che nella maggioranza dei casi già all'inizio del trattamento siano presenti nel tu-

more cloni cellulari resistenti, a volte in una piccola proporzione rispetto a quelli sensibili, e non si tratti quindi di una induzione della resistenza da parte del trattamento, ma semplicemente di un processo di selezione. Questo problema è intimamente connesso alla propensione della maggioranza dei tumori solidi ad essere instabili dal punto di vista genetico e può essere affrontato in due modi:

- diagnosticare i tumori in fase più precoce, in quanto maggiore è il numero di cellule tumorali, maggiore è la probabilità di eterogeneità molecolare dei cloni cellulari presenti nel tumore;
- utilizzare combinazioni di farmaci che possono avere maggiori probabilità di agire sia sui cloni sensibili che su quelli resistenti. Anche queste combinazioni potrebbero essere guidate da caratterizzazioni biologiche che permettano di sfruttare al massimo la presenza di difetti in grado di conferire una vulnerabilità specifica per attuare il trattamento più appropriato.

È sempre più evidente come sia necessario utilizzare combinazioni di farmaci convenzionali che colpiscono il DNA, che rimane comunque il bersaglio più importante della maggioranza delle terapie antitumorali, con farmaci che modulino la risposta sia a livello citoplasmatico che nucleare. Nei prossimi anni si svilupperanno certamente molti nuovi composti il cui meccanismo è indirizzato alla modulazione della trascrizione e ci auguriamo che questo possa sostanzialmente migliorare la specificità dei trattamenti antineoplastici. Le ricerche biologiche più recenti ci indicano inoltre l'importanza del microambiente tumorale, e questo porterà allo sviluppo sempre maggiore di combinazioni di farmaci indirizzati sia alle cellule tumorali che a quelle normali presenti nel tumore come macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali. Infine, I più recenti risultati nel campo della immunoterapia ed in particolare degli inibitori dei *checkpoints* del sistema immunitario apriranno la via a nuove terapie immunologiche che potranno essere integrate alle terapie farmacologiche.

Bibliografia

1. Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Schumaker AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against tumors and other biological systems. *Cancer Chemother Rep* 1972;(3):1-103.
2. Monks A, Scudiero DA, Johnson GS, Paull KD, Sausville EA. The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets. *Anticancer Drug Des* 1997;12(7):533-41.
3. Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, Friend SH, Fornace AJ, Jr., Kohn KW, et al. An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* 1997;275(5298):343-9.
4. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science* 2002;297(5578):63-4.
5. Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 1997;337(4):242-53.
6. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 2012;481(7381):287-94.
7. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005;434(7035):917-21.
8. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361(2):123-34.
9. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* 2011;12(9):852-61.
10. Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res* 2012;72(21):5588-99.
11. Murai J, Zhang Y, Morris J, Ji J, Takeda S, Doroshow JH, et al. Rationale for poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in combination therapy with camptothecins or temozolomide based on PARP trapping versus catalytic inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;349(3):408-16.
12. Wright S, Dobzhansky T. Genetics of Natural Populations. Xii. Experimental Reproduction of Some of the Changes Caused by Natural Selection in Certain Populations of *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics* 1946;31(2):125-56.
13. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434(7035):913-7.[Erratum, *Nature* 2007;447:346].

14. Steckel M, Molina-Arcas M, Weigelt B, Marani M, Warne PH, Kuznetsov H, et al. Determination of synthetic lethal interactions in KRAS oncogene-dependent cancer cells reveals novel therapeutic targeting strategies. *Cell Res* 2012;22(8):1227-45.
15. Pourdehnad M, Truitt ML, Siddiqi IN, Ducker GS, Shokat KM, Ruggero D. Myc and mTOR converge on a common node in protein synthesis control that confers synthetic lethality in Myc-driven cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(29):11988-93. [Erratum, *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110: 1760].
16. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. Garland Science, New York, NY, USA; 2014.
17. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
19. Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, et al. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(20):1641-50.
20. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, Frapoli R, Verga M, Bungaro S, et al. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2003;9(2):625-32.
21. Pemovska T, Johnson E, Kontro M, Repasky GA, Chen J, Wells P, et al. Axitinib effectively inhibits BCR-ABL1(T315I) with a distinct binding conformation. *Nature* 2015;519(7541):102-5.
22. Yang JC, Wu YL, Schuler M, Sebastian M, Popat S, Yamamoto N, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 2015;16(2):141-51.
23. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med* 2012;18(4):521-8.
24. Burns MC, Sun Q, Daniels RN, Camper D, Kennedy JP, Phan J, et al. Approach for targeting Ras with small molecules that activate SOS-mediated nucleotide exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(9):3401-6.
25. Shima F, Yoshikawa Y, Ye M, Araki M, Matsumoto S, Liao J, et al. In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(20):8182-7.
26. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 2013;503(7477):548-51.
27. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010;464(7287):431-5.
28. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010;464(7287):427-30.
29. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* 2014;4(1):94-109.
30. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 2011;480(7377):387-90.
31. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2012;367(18):1694-703.
32. Long GV, Fung C, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Hyman J, et al. Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat Commun* 2014;5:5694.
33. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008;118(9):3065-74.
34. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.
35. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246(4935):1306-9.
36. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473(7347):298-307.
37. Smith NR, Baker D, Farren M, Pommier A, Swann R, Wang X, et al. Tumor stromal architecture can define the intrinsic tumor response to VEGF-targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2013;19(24):6943-56.
38. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(6):417-27.
39. Van der Veldt AA, Lubberink M, Bahce I, Walraven M, de Boer MP, Greuter HN, et al. Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. *Cancer Cell* 2012;21(1):82-91.
40. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8(8):592-603.
41. Sitohy B, Nagy JA, Jaminet SC, Dvorak HF. Tumor-surrogate blood vessel subtypes exhibit differential susceptibility to anti-VEGF therapy. *Cancer Res* 2011;71(22):7021-8.
42. Leite de Oliveira R, Hamm A, Mazzone M. Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat-implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Mol Aspects Med* 2011;32(2):71-87.
43. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 2014;17(3):471-94.
44. Rapisarda A, Melillo G. Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9(7):378-90.
45. Selvakumaran M, Amaravadi RK, Vasilevska IA, O'Dwyer PJ. Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. *Clin Cancer Res* 2013;19(11):2995-3007.
46. Tough DF, Lewis HD, Rioja I, Lindon MJ, Prinjha RK. Epigenetic pathway targets for the treatment of disease: accelerating progress in the development of pharmacological tools: IUPHAR Review 11. *Br J Pharmacol* 2014;171(22):4981-5010.
47. Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14(11):1025-40.
48. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99(3):247-57.
49. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999;274(46):33002-10.
50. Carey N, Marques CJ, Reik W. DNA demethylases: a new epigenetic frontier in drug discovery. *Drug Discov Today* 2011;16(15-16):683-90.
51. D'Incalci M, Covey JM, Zaharko DS, Kohn KW. DNA alkali-labile sites induced by incorporation of 5-aza-2'-deoxycytidine into DNA of mouse leukemia L1210 cells. *Cancer Res* 1985;45(7):3197-202.
52. Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* 1993;268(1):305-14.
53. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128(4):693-705.
54. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest* 2014;124(1):30-9.
55. Saji S, Kawakami M, Hayashi S, Yoshida N, Hirose M, Horiguchi S, et al. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene* 2005;24(28):4531-9.
56. Marquard L, Gjerdrum LM, Christensen JJ, Jensen PB, Sehested M, Ralfkiaer E. Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. *Histopathology* 2008;53(3):267-77.
57. Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 2000;408(6810):377-81.
58. Duan H, Heckman CA, Boxer LM. Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas. *Mol Cell Biol* 2005;25(5):1608-19.

59. Migliori V, Phalke S, Bezzi M, Guccione E. Arginine/lysine-methyl/methyl switches: biochemical role of histone arginine methylation in transcriptional regulation. *Epigenomics* 2010;2(1):119-37.
60. Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, et al. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* 2002;12(12):1052-8.
61. Steger DJ, Lefterova MI, Ying L, Stonestrom AJ, Schupp M, Zhuo D, et al. DOT1L/KMT4 recruitment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2008;28(8):2825-39.
62. Kim SK, Jung I, Lee H, Kang K, Kim M, Jeong K, et al. Human histone H3K79 methyltransferase DOT1L protein [corrected] binds actively transcribing RNA polymerase II to regulate gene expression. *J Biol Chem* 2012;287(47):39698-709.
63. Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, et al. Brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNE2/SWI2. *Cell* 1992;68(3):561-72.
64. Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 2000;288(5470):1422-5.
65. Nakamura Y, Umehara T, Nakano K, Jang MK, Shirouzu M, Morita S, et al. Crystal structure of the human BRD2 bromodomain: insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4. *J Biol Chem* 2007;282(6):4193-201.
66. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010;468(7327):1067-73.
67. Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, Keates T, Lambert JB, Barsyte-Lovejoy D, et al. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* 2012;149(1):214-31.
68. Filippakopoulos P, Knapp S. The bromodomain interaction module. *FEBS Lett* 2012;586(17):2692-704.
69. Loven J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 2013;153(2):320-34.
70. Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-Andre V, Sigova AA, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* 2013;155(4):934-47.
71. Boi M, Gaudio E, Bonetti P, Kwee I, Bernasconi E, Tarantelli C, et al. The BET Bromodomain Inhibitor OTX015 Affects Pathogenetic Pathways in Preclinical B-cell Tumor Models and Synergizes with Targeted Drugs. *Clin Cancer Res* 2015;21(7):1628-38.
72. Malek A, Nunez LE, Magistri M, Brambilla L, Jovic S, Carbone GM, et al. Modulation of the activity of Sp transcription factors by mithramycin analogues as a new strategy for treatment of metastatic prostate cancer. *PLoS One* 2012;7(4):e35130.
73. D'Incalci M, Galmarini CM. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol Cancer Ther* 2010;9(8):2157-63.
74. Di Giandomenico S, Frapolli R, Bello E, Ubaldi S, Licandro SA, Marchini S, et al. Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas. *Oncogene* 2014;33(44):5201-10.
75. Amaral AT, Garofalo C, Frapolli R, Manara MC, Mancarella C, Ubaldi S, et al. Trabectedin efficacy in Ewing sarcoma is greatly increased by combination with anti-IGF signaling agents. *Clin Cancer Res* 2015;21(6):1373-82.
76. Frapolli R, Tamborini E, Viridis E, Bello E, Tarantino E, Marchini S, et al. Novel models of myxoid liposarcoma xenografts mimicking the biological and pharmacologic features of human tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16(20):4958-67.
77. Allavena P, Signorelli M, Chieppa M, Erba E, Bianchi G, Marchesi F, et al. Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Res* 2005;65(7):2964-71.
78. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liguori M, et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 2013;23(2):249-62.

Parole Chiave

Farmaci antitumorali, terapia a bersaglio molecolare, inibitori trasduzione dei segnali, inibitori angiogenesi, epigenetica

Indirizzi per la corrispondenza

Maurizio D'Incalci

Dipartimento di Oncologia, IRCCS

Istituto Mario Negri - Milano

Tel. (+39) 02 39014473

Fax (+39) 02 39014734

E-mail: maurizio.dincalci@marionegri.it

Leucemia mieloide cronica



Fabrizio Pane, Roberta Della Pepa, Barbara Izzo e Luigia Luciano

Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli studi di Napoli Federico II, e CEINGE Biotecnologie Avanzate

Introduzione

I recenti progressi nelle conoscenze sui meccanismi patogenetici e nella terapia della leucemia mieloide cronica (LMC) rappresentano senza dubbio uno dei più importanti successi della medicina moderna: il trasferimento alla pratica clinica delle acquisizioni sulla patogenesi molecolare di questa malattia è culminato nello sviluppo del primo farmaco a bersaglio molecolare intracellulare per la terapia di una neoplasia, l'imatinib⁽¹⁻⁵⁾. Questo farmaco, il primo di una classe di farmaci ad attività inibitoria per le tirosin-chinasi intracellulari, ha trasformato la LMC, che sino agli anni '90 aveva un decorso quasi inevitabilmente fatale, in una patologia cronica controllabile nella maggior parte dei casi con una terapia orale compatibile con lo svolgimento delle normali attività quotidiane e con una buona qualità di vita. Va sottolineato che queste acquisizioni hanno assunto una importanza che va anche oltre i confini della gestione e cura della LMC. È stata questa, infatti, la prima dimostrazione del concetto che il trattamento di una malattia neoplastica può essere basato sulla approfondita conoscenza delle sue caratteristiche biologiche e sullo sviluppo di agenti farmacologici che vanno ad interagire specificamente con esse, supportando ulteriormente l'interesse dei ricercatori accademici e delle industrie farmaceutiche allo studio dei meccanismi molecolari della trasformazione neoplastica.

Il percorso che ha portato agli inibitori di tirosin-chinasi, non è stato né breve né facile. La malattia, descritta per la prima volta a metà dell'800, è stata curata sino a quasi la fine del '900 con radioterapia e con chemioterapia, secondo il vecchio principio di terapia anti-neoplastica della eradicazione dell'ultima cellula tumorale. Bisognò aspettare la fine del secolo scorso, per avere la prova che con il trapianto allogenico di cellule staminali o con la terapia con interferone- α ricombinante (rIFN α) la guarigione era un traguardo raggiungibile per alcuni pazienti⁽¹⁻⁵⁾. Il trapianto allogenico di cellule staminali è in un certo senso la estremizzazione del principio di eradicazione dell'ultima cellula tumorale, in quanto la guarigione era ottenuta con l'eliminazione della componente neoplastica staminale da parte della combinazione di chemio e radioterapia della terapia

di condizionamento cui fa seguito il controllo di tipo immunologico sull'eventuale residuo di staminali neoplastiche da parte del sistema immunitario trapiantato nel paziente.

Questa procedura, nonostante non costituisca un trattamento tumore-specifico, è ancora la principale terapia con dimostrata capacità eradicante della LMC. Tuttavia, nonostante i progressi fatti in questo campo, la mortalità e, ancor di più, la morbidity cronica legata alla procedura sono ancora molto importanti e limitano l'applicazione a tutti i pazienti di questa terapia⁽⁶⁾.

La terapia con rIFN α , introdotta nella terapia della LMC nel 1983 dimostrò, anche un po' inaspettatamente, un elevato grado di attività, sia pur limitato tuttavia a circa il 50% dei pazienti. Purtroppo è anch'esso gravato da significativa tossicità che esita in una compliance al trattamento del tutto insoddisfacente nella gran parte dei pazienti. Nonostante una piccola percentuale di pazienti lungo sopravvissuti al trattamento sia riuscito ad interrompere il trattamento in remissione completa di malattia, e può quindi essere considerato guarito dalla terapia, la terapia non può essere considerata specificamente diretta verso le cellule Ph+, ed a distanza di molti anni dalla sua larga diffusione avuta durante tutti gli anni '90, bisogna ammettere che il meccanismo di azione di questo farmaco nella LMC non è mai stato chiarito^(4,7,8). È quindi chiaro che l'imatinib, un farmaco finalmente specifico per la oncoproteina BCR/ABL delle cellule leucemiche, ha costituito un progresso assoluto nella storia di questa malattia e della moderna terapia oncologica⁽⁹⁾.

La dimostrazione pratica di ciò è stato il rapido sviluppo clinico, dopo l'imatinib, di altri quattro farmaci della classe degli inibitori di tirosin-chinasi per la terapia della LMC: il dasatinib, il nilotinib, il bosutinib, ed il ponatinib⁽¹⁰⁻¹³⁾. Questi farmaci hanno una struttura chimica abbastanza simile tra loro e sono ora registrati per l'uso nella LMC, pur con differenti restrizioni nelle indicazioni nei vari paesi occidentali. Tuttavia i quattro farmaci di nuova generazione, tutti più efficaci del capostipite imatinib nell'inibire in vitro l'attività chinasi della proteina oncogenica BCR/ABL e nel determinare nei pazienti risposte cliniche rapide e di ottima qualità, non sono identici

tra loro. Le differenze riguardano infatti il loro metabolismo e quindi le proprietà farmacocinetiche, ma anche la loro farmacodinamica, particolarmente in relazione alle differenze nella capacità di interagire con le forme mutate della proteina oncogenica BCR-ABL e nella affinità di legame e di inibizione di altri bersagli intracellulari costituiti da differenti classi di proteine tirosin-chinasi (SRC chinasi etc.). Queste differenze si riflettono ovviamente nel variabile profilo di tossicità a breve e medio termine che hanno dimostrato questi farmaci nell'impiego clinico. È chiaro che la disponibilità di farmaci alternativi all'imatinib ha avuto, come immediata e logica conseguenza il sollievo dei pazienti (e dei medici) di essere dipendenti per la sopravvivenza da un singolo farmaco.

Non più di 10 anni fa, quando era ancora breve l'esperienza clinica con l'imatinib, era rilevante la domanda relativa alla durata nel tempo degli effetti della nuova terapia della LMC, e forte la preoccupazione sullo sviluppo di resistenze intrinseche al farmaco nel clone leucemico Ph+ nei pazienti con il perdurare del trattamento^(7,14). Ormai sappiamo invece che il beneficio clinico ottenuto con imatinib è duraturo ed anzi tende a migliorare nel tempo e la comparsa di mutazioni, che conferiscono resistenza al farmaco, descritte nei primi anni 2000, tendono a ridursi con il trascorrere degli anni di terapia, ed addirittura una certa percentuale di pazienti ottengono riduzioni estremamente significative della massa leucemica (superiori a 4 o 4 logaritmi e mezzo) tanto da poter interrompere la terapia senza veder ripresentarsi la malattia, e da poter essere considerati guariti^(3,5,15,16). La disponibilità di alternative terapeutiche, pur in presenza di differenze nel profilo di attività e di tossicità, dà pertanto la possibilità ai medici di poter ottimizzare il trattamento nei singoli pazienti non solo sui dati di efficacia ma anche quelli di tollerabilità del farmaco da adoperare in relazione alla specifica situazione clinica del paziente. La elevatissima efficacia di tutti i farmaci della classe degli inibitori di tirosin-chinasi utilizzati per la terapia della LMC, rende tuttavia molto importante la considerazione della tollerabilità del trattamento non solo a breve termine, ma anche a medio-lungo-termine: in tal senso la qualità di vita dei pazienti sta assumendo infatti un'importanza sempre maggiore⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Scopo di questo articolo è di passare in rassegna i dati più significativi che supportano le scelte di trattamento nei pazienti con LMC ed i criteri per giudicare la efficacia delle scelte terapeutiche.

Inibitori di tirosin-chinasi per il trattamento di prima linea

Dieci anni fa la terapia iniziale della LMC era consolidata su una singola opzione di trattamento cui, in modo sufficientemente concordemente, andavano a convergere le opinioni degli esperti: tutti i pazienti erano trattati in prima linea con imatinib e, per quelli che mostravano una risposta ritenuta insoddisfacente e che mostravano quindi un elevato rischio di andare incontro a progressione, l'unica alter-

nativa terapeutica valida era il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. Da allora, nuovi agenti farmacologici appartenenti alla classe degli inibitori di tirosin-chinasi, disegnati in modo da adattarsi con più facilità al sito catalitico della proteina oncogenica BCR-ABL e quindi più potenti di imatinib, sono entrati nell'uso clinico andando progressivamente a rimpiazzare il trapianto di cellule staminali emopoietiche in seconda e a volte anche in terza linea terapeutica. Due dei nuovi inibitori di tirosin-chinasi, il nilotinib ed il dasatinib, sono ora registrati anche per la terapia di prima linea della LMC in seguito a due studi registrativi in cui il trattamento con l'inibitore di seconda generazione era randomizzato verso la terapia standard con imatinib^(10,11).

Sia nilotinib che dasatinib dimostravano nei rispettivi studi registrativi una maggiore attività rispetto ad imatinib per l'ottenimento dell'end-point primario dello studio (la percentuale di pazienti in risposta molecolare maggiore a 12 mesi o in risposta citogenetica completa, per il nilotinib ed il dasatinib rispettivamente). Non sono tuttavia ancora disponibili evidenze cliniche definitive che possano orientare in modo deciso nella pratica clinica la scelta iniziale del trattamento del paziente con LMC.

La evoluzione degli obiettivi del trattamento hanno anzi reso sempre più complessa la scelta della terapia. Non vi è alcun dubbio che un paziente affetto da LMC, qualunque sia la sua età, debba ricevere come terapia iniziale un inibitore di tirosin-chinasi^{4,5,7}. Tuttavia, la situazione clinica, l'età, le aspettative di vita dei singoli pazienti possono indurre a considerare come obiettivo del trattamento la remissione libera da trattamento (*treatment free remission* - TFR) o, alternativamente e più realisticamente in altri casi, la cronicizzazione della malattia neoplastica^(5,20).

Nel primo caso, è necessario programmare un trattamento sufficientemente prolungato ed intensivo per indurre nel paziente una riduzione del numero di cellule leucemiche ben superiore a 4 logaritmi rispetto a quello misurato all'esordio della malattia (risposta molecolare) che venga mantenuta per un periodo sufficientemente lungo e sicuro superiore ad un anno^(15,21).

Il secondo caso è quello tipico di un paziente, con varie comorbidità e magari anziano, che è spesso obbligato a riduzioni o interruzioni del dosaggio del farmaco, di conseguenza mostra una risposta che spesso è decisamente meno pronunciata in termini quantitativi (riduzione delle cellule leucemiche Ph+ inferiore a 4 logaritmi), ed è destinato a convivere con un numero abbastanza limitato di cellule leucemiche residue. Questi pazienti hanno una bassa, ma non assente, probabilità di recidiva ed il residuo leucemico è in grado di riprodurre la malattia alla sospensione del trattamento specifico. In questi casi, non la malattia e gli effetti di essa, ma la terapia continuata e destinata a prolungarsi per tutta la vita, pongono problemi di gestione clinica e di tollerabilità a lungo termine, che possono impattare sulla qualità di vita. In tal senso la LMC è uno dei primi esempi di patologia neoplastica in cui, accanto alla efficacia, un posto

rilevante nella scelta della terapia viene occupato dalla sua tollerabilità a lungo termine.

Rimane quindi per molti versi complessa la scelta della terapia di prima linea per un paziente affetto da LMC, scelta sui cui pesano, e vanno valutati, numerosi fattori quali l'attività dei farmaci disponibili nei confronti della malattia, principalmente misurata attraverso i marcatori surrogati di risposta clinica, come la risposta citogenetica o molecolare, l'efficacia clinica, cioè la probabilità di sopravvivenza o di sopravvivenza libera da eventi o progressione (meno frequentemente disponibile negli studi clinici pubblicati), la tollerabilità dei vari farmaci in particolare in termini di effetti collaterali di grado basso a lungo termine, età e comorbidità del paziente, ed infine fattori di rischio cardiovascolare.

Risposta citogenetica e risposta molecolare

Nei primi studi clinici sul trattamento della LMC con farmaci inibitori di tirosin-chinasi, i marcatori di risposta utilizzati erano quelli storicamente adoperati nell'era del trattamento citoreducente basato sulla chemioterapia e della terapia con interferone⁽²²⁾. Il primo obiettivo del trattamento era la percentuale di risposta ematologica completa, definita come la normalizzazione dei parametri dell'esame emocromocitometrico ed in particolare del numero dei leucociti, oltre alla scomparsa dei segni clinici di malattia, in particolare la sple-

nomegalia. La percentuale di cellule Ph+ alla analisi cariotipica con bandeggio convenzionale (risposta citogenetica) rappresentava, a quei tempi, il principale indice su cui misurare la riduzione della massa leucemica. Obiettivi primari del trattamento in termini di risposta citogenetica erano la risposta maggiore (MCyR), definita come la presenza del cromosoma Ph in una percentuale compresa tra 1-35% di 20 metafasi analizzate, e la risposta completa (CCyR) definita come la assenza di cellule con il cromosoma Ph in almeno 20 metafasi analizzate. La soglia definita come CCyR era concordemente indicata come un obiettivo che cambiava in modo significativo la storia clinica della malattia nei pazienti⁽²²⁻²⁵⁾ (Figura 1).

Durante i primi trial con imatinib, fu però subito chiaro che un ampio numero di pazienti raggiungeva e sorpassava la soglia della CCyR. Nel monitoraggio dei pazienti in trattamento con imatinib, per definire il livello di riduzione della taglia leucemica, fu perciò introdotta la misura del numero di trascritti del gene ibrido BCR-ABL presente sul cromosoma Ph mediante tecnica di PCR quantitativa nei campioni di midollo o di sangue periferico. Il gene ibrido BCR-ABL codifica per la proteina oncogenica ad attività tirosin-chinasi costitutivamente attivata ed oltre all'importante e riconosciuto ruolo patogenetico nella malattia, costituisce un marcatore molecolare delle cellule leucemiche in grado di dare una stima accurata della quantità di cellule leucemiche Ph+ presenti in un determinato cam-

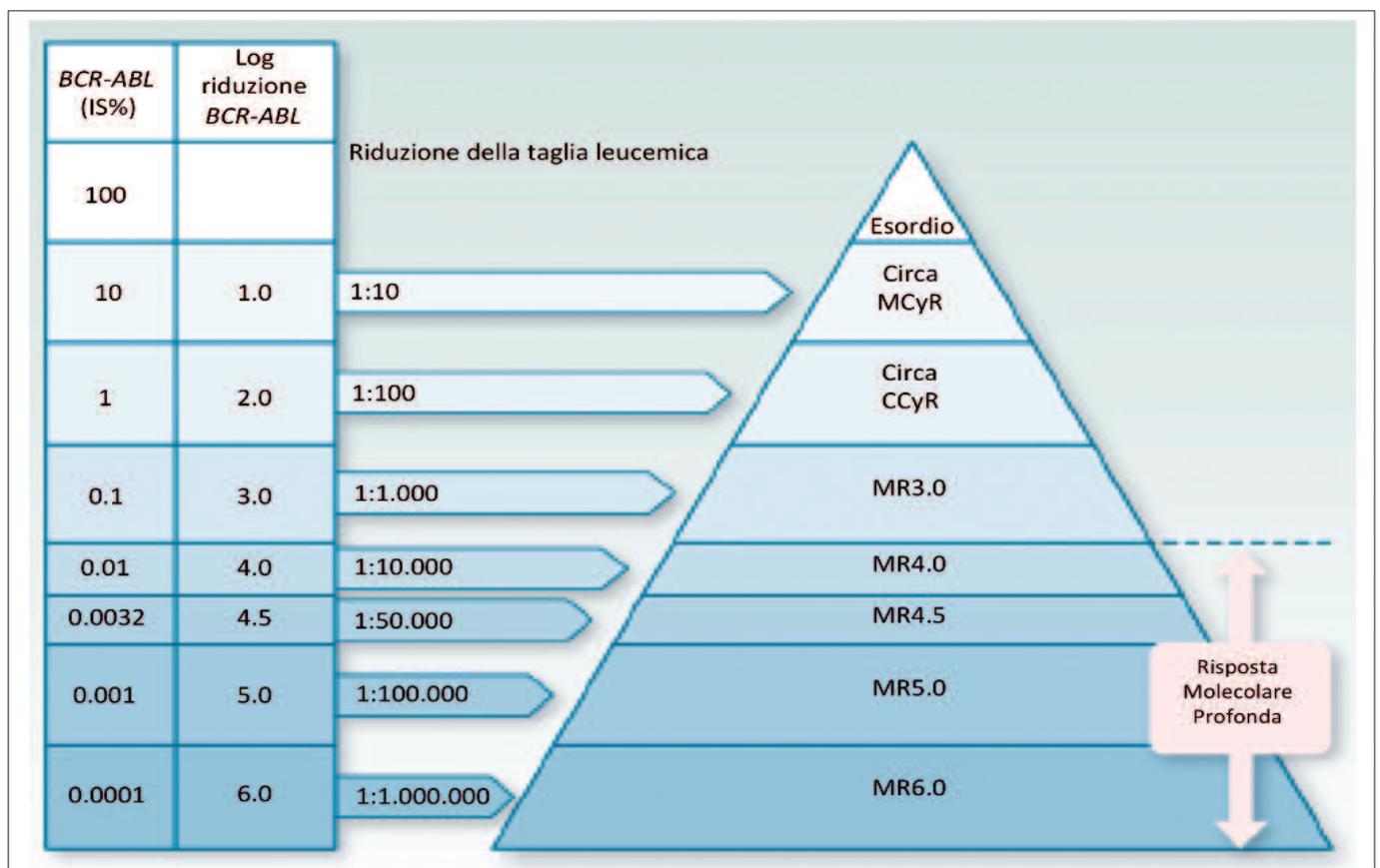


Figura 1 – Riduzione della taglia leucemica Ph+ con i corrispondenti livelli di risposta citogenetica e molecolare. MCyR = risposta citogenetica maggiore, CCyR = risposta citogenetica completa, MR = risposta molecolare.

pione biologico^(26,27). La tecnica di analisi, basata sulla reazione di amplificazione a catena, conferisce all'indagine una sensibilità analitica molto elevata, che già negli anni '90 fu utilizzata come prova di principio, per dimostrare la presenza di un residuo di malattia dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche⁽²⁸⁾. Nell'era degli inibitori di tirosin-chinasi, ed inizialmente con l'imatinib, la tecnologia si diffuse e dimostrò la sua validità per effettuare una stima accurata dei livelli di malattia residua nei pazienti che avevano già raggiunto la CCyR⁽⁹⁾. Per compensare le differenze tra i risultati prodotti nei vari laboratori, è stata poi rapidamente sviluppata una scala di misura standardizzata diffusasi rapidamente nei principali laboratori interessati al monitoraggio della LMC come scala standardizzata di riferimento per l'espressione dei risultati della misura della malattia residua con la PCR quantitativa⁽²⁹⁾. La scala di misura internazionale era basata su di un valore fisso del 100% corrispondente al numero di trascritti BCR-ABL attesi in media nei pazienti con LMC alla diagnosi della malattia e prima del trattamento, ed un valore corrispondente alla riduzione di 3 logaritmi della massa leucemica (1000 volte) che nella scala di misura corrispondeva a valore di 0,1% (Figura 1)^(30,31).

La analisi dei dati clinici dei primi trial che adoperavano l'imatinib dimostrò rapidamente che i malati con risposta al trattamento che superava la soglia di 0,1% avevano una probabilità significativamente più bassa degli altri di perdere la risposta al trattamento o di progredire alle fasi più avanzate della malattia⁽³²⁾. Questi dati furono rapidamente confermati dal monitoraggio a lungo termine dei pazienti ed il livello di 0,1% divenne un importante traguardo della terapia e fu definito come risposta molecolare maggiore (MMoR o MR3.0)^(1,7,31) (Figura 1). Con il prolungarsi dei tempi di monitoraggio dei pazienti in trattamento, iniziò ad essere evidente che, quando la terapia iniziava in fase cronica precoce ed in particolare con i farmaci di seconda generazione come nilotinib, dasatinib e bosutinib, un ampio numero di pazienti oltrepassava la soglia della MMoR dopo alcuni anni di trattamento^(10,11,33); pertanto attualmente molto più della risposta ematologica completa, ormai la regola, e della CCyR, raggiunta dalla maggior parte dei pazienti, i livelli di risposta molecolare successivi alla MMoR costituiscono i veri obiettivi del trattamento con inibitori di tirosin-chinasi.

Le tecnologie per le analisi molecolari sono attualmente molto evolute ed ormai pienamente affidabili, e le moderne strumentazioni basate sulla *real time* PCR permettono di tracciare, misurandola con sufficiente accuratezza, livelli di malattia residua fino a 4, 4,5 e 5 logaritmi inferiori rispetto a quello atteso alla diagnosi della malattia. Pertanto, tutti quei livelli di malattia residua che nel recente passato venivano coperti dal generico termine di remissione molecolare completa (CMR) o remissione molecolare profonda (DMR) e che corrispondevano in modo piuttosto grossolano ai livelli di malattia residua inferiori al valore soglia della MMoR, sono ora quantizzabili ed oggetto di definizioni metodologiche precise e ulteriormente migliorate negli ultimi mesi^(34,35). La valutazione accurata

di livelli anche molto bassi di malattia residua (meno di 4 e 4,5 log di riduzione) ha assunto notevole importanza perché consente di individuare i pazienti che hanno raggiunto i requisiti minimi per tentare, senza correre un rischio di recidiva clinica della malattia, l'interruzione del trattamento (vedi oltre).

L'impiego degli inibitori di tirosin-chinasi ha notevolmente prolungato la sopravvivenza dei pazienti con LMC e reso molto meno frequenti e precoci le progressioni alle fasi avanzate, accelerata o blastica, della malattia. Pertanto il livello di riduzione delle cellule leucemiche misurato a vari intervalli temporali dall'inizio del trattamento con esame citogenetico o molecolare è stato oggetto di numerosi studi, e discussioni, per cercare di identificare correlazioni clinicamente utili con la prognosi clinica allo scopo di utilizzare i livelli di risposta citogenetica o molecolare come marcatori surrogati precoci o tardivi di efficacia terapeutica. In tal senso i risultati del trial IRIS, il primo studio registrativo in cui la terapia di associazione tra interferone e basse dosi di citosina arabinoside (IFN + LDAC), a quei tempi considerato lo standard terapeutico per la LMC, era comparata in modo randomizzato alla terapia con imatinib in pazienti con LMC in fase cronica precoce e non trattati in precedenza. I primi risultati indicavano che il raggiungimento della CCyR dopo 12 ed anche 18 mesi di trattamento si associava ad una sopravvivenza libera da progressione a fase accelerata o blastica (PFS) significativamente più lunga rispetto ai pazienti i cui livelli di risposta citogenetica erano inferiori agli stessi tempi⁽⁹⁾ (Figura 2).

Un'ulteriore analisi dei dati effettuata successivamente indicava che la stessa protezione dalle progressioni si aveva nei pazienti che mostravano le cosiddette risposte citogenetiche tardive e cioè arrivavano a superare la soglia della CCyR dopo i 18 mesi di trattamento^(32,36). Il trial IRIS prevedeva accanto alla valutazione della risposta al trattamento con analisi citogenetica, anche l'analisi molecolare.

Pertanto, i primi dati sulla ricaduta clinica dei dati quantitativi molecolari sono stati ottenuti da una serie di analisi retrospettive di questo studio clinico. Questi dati indicavano che l'ottenimento della MMoR dopo 12 mesi di trattamento era associato ad una sopravvivenza libera da eventi (EFS) e da progressioni (PFS)⁽³²⁾.

Una rianalisi dello stesso trial effettuata in tempi successivi e su dati più maturi per quanto riguarda il tempo di osservazione mediano dei pazienti in studio, dimostrava tuttavia che la MMoR a 18 mesi, e non a 12 mesi come indicato dalla prima analisi statistica, si associava ad un vantaggio in termini di PFS e EFS. Inoltre, la perdita della CCyR era osservata nel 3% contro il 26% dei pazienti che ottenevano la MMoR a 18 mesi rispetto a quelli che non raggiungevano la suddetta soglia^(31,37).

Proseguendo il trattamento, tuttavia, si osserva una ulteriore e progressiva riduzione della massa leucemica con risposte che in termini molecolari arrivano al livello di risposta definito come MR4.0 e MR4.5 in un gruppo non limitato di pazienti. In uno studio condotto in Germania su 1194 pazienti in cui la terapia iniziale era costituita da imatinib con ottimizzazione della dose del farmaco in

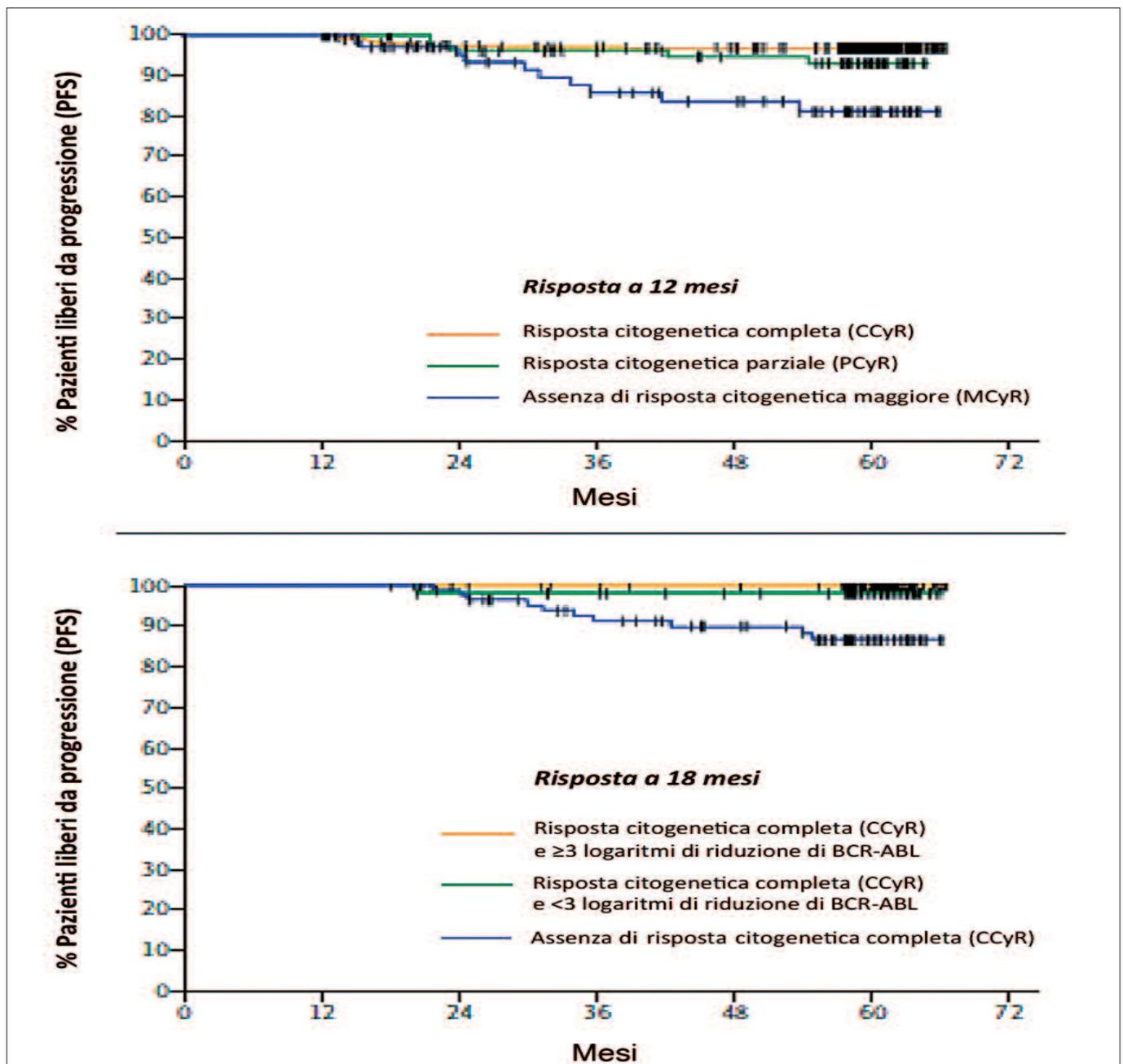


Figura 2 – Gli obiettivi prognosticamente significativi del trattamento nello studio IRIS: la risposta citogenetica completa a 12 mesi e la risposta molecolare maggiore a 18 mesi di trattamento.

caso di risposta non soddisfacente, i pazienti che ottenevano la risposta qualificata come MR4.0 o MR4.5 dopo quattro anni di trattamento mostravano una probabilità di sopravvivenza uguale a quella di soggetti non malati di pari età. Solo 4 su 792 pazienti (0,5%) che avevano una risposta MR4.0 erano andati incontro a progressione di malattia (Figura 3) ⁽³⁸⁾.

Imatinib

Il primo studio clinico, lo studio IRIS ⁽⁹⁾, in cui imatinib è stato utilizzato nella terapia di prima linea della LMC, ha iniziato l'arruolamento nel giugno del 2000, a soli due anni di distanza dall'inizio del

primo studio clinico sull'uomo con questo farmaco, allora ancora noto con la sigla STI571 ⁽³⁹⁾ e l'anno seguente rispetto allo studio di fase 2 aperto ai pazienti resistenti ad interferone α ⁽⁴⁰⁾. Abbiamo quindi accumulato 15 anni di esperienza nel trattamento con imatinib di prima linea dei pazienti affetti da LMC, e varie centinaia di migliaia di pazienti in tutto il mondo sono stati trattati con questo farmaco. I risultati dello studio IRIS dimostrarono rapidamente la enorme superiorità dell'imatinib nei confronti della terapia standard, rIFN α in combinazione con LDAC, rivoluzionando così il trattamento della LMC: la quasi totalità (96%) dei pazienti inclusi nel braccio imatinib otteneva la remissione completa con il trattamento (55% in quelli

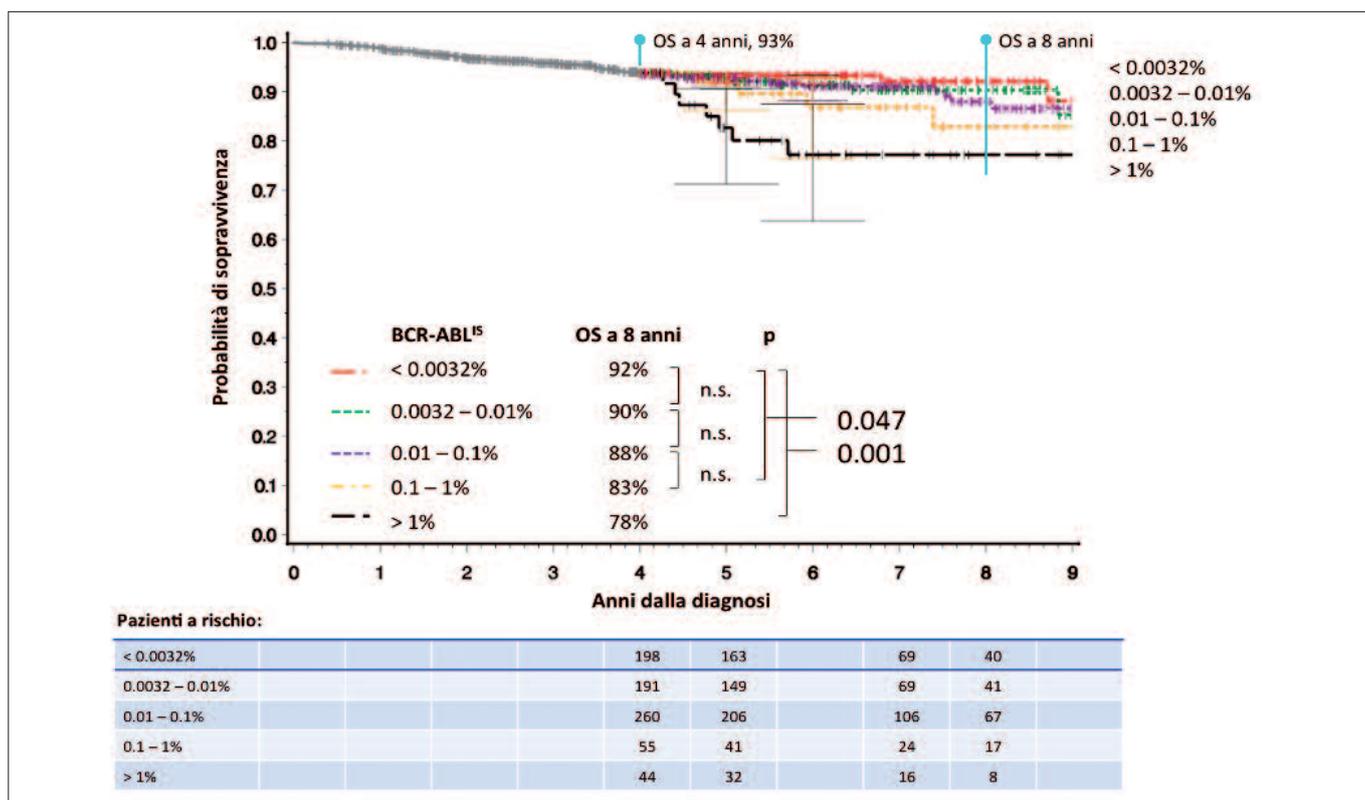


Figura 3 – Significato prognostico, in termini di probabilità di sopravvivenza, della risposta molecolare profonda.

trattati con la combinazione di interferone α e LDAC) e dopo 18 mesi il 74% dei pazienti trattati con imatinib era in CCyR (il 15% tra quelli del braccio di controllo dello studio)⁽⁹⁾ ed il 40% in MMolR (il 2% tra i pazienti trattati con interferone ed LDAC). La differenza di efficacia era così evidente a favore dell'imatinib che l'89% dei pazienti randomizzati inizialmente a ricevere il trattamento standard con interferone e LDAC cambiarono il trattamento ed iniziarono la terapia con imatinib entro i 24 mesi dall'inizio dello studio.

È importante sottolineare che i dati dello studio IRIS sono stati progressivamente confermati da una serie di altri studi indipendenti pubblicati i cui risultati sono stati resi noti negli anni successivi e presentati sinteticamente nella Tabella 1^(10-12, 38,41-49). Il trattamento con imatinib è pertanto diventato, già nei primi anni 2000, lo standard terapeutico della terapia di prima linea della LMC⁽⁷⁾. L'ultimo aggiornamento sui pazienti arruolati nello studio, mostrava che dopo 8 anni di follow up mediano la EFS e la PFS dei pazienti inizialmente randomizzati a ricevere il trattamento con imatinib era del 81% e 92% rispettivamente⁽³⁷⁾. Tuttavia, gli aggiornamenti disponibili sui pazienti arruolati nello studio dimostravano anche che, dopo 5 anni di follow up, circa il 63% dei pazienti era ancora in trattamento con imatinib³² e dopo 8 anni la percentuale scendeva al 55%⁽³⁷⁾.

Le ragioni principali dell'interruzione del trattamento erano dovute a ridotta efficacia, cioè resistenza primaria, o perdita di risposta, cioè resistenza secondaria, ma anche intolleranza al trattamento. A tal riguardo, si sono andati accumulando nel tempo numerosi dati

sperimentali che descrivono una serie di meccanismi, non necessariamente esclusivi tra loro, che sono alla base della resistenza primaria o secondaria al trattamento con imatinib (ed altri inibitori di tirosin-chinasi). Questi comprendono l'amplificazione del locus genico BCR-ABL, l'iperespressione di glicoproteine della famiglia MDR (*multidrug resistance*) e la bassa espressione di proteine di membrana in grado di trasportare all'interno della cellula il farmaco come la proteina OCT-1 o le proteine c-ABC⁽⁵⁰⁻⁵⁴⁾. Tuttavia, i meccanismi più frequenti e più studiati di resistenza primaria e secondaria sono costituiti dalla presenza di mutazioni del gene ibrido BCR-ABL in corrispondenza delle sequenze codificanti il sito catalitico della corrispondente proteina oncogenica che riducono l'affinità di legame dell'imatinib al sito catalitico della proteina oncogenica, riducendone l'attività nei confronti del bersaglio terapeutico^(14,55,56). Le mutazioni della proteina oncogenica BCR-ABL a livello del sito catalitico tirosin-chinasi di ABL sono state per la prima volta identificate nel 2001 in 11 pazienti con LMC in fase accelerata o blastica che avevano ricevuto la terapia con imatinib ed avevano evidenziato resistenza secondaria al trattamento. Sei di essi dimostravano un'identica sostituzione di una citosina ad una timidina al nucleotide 944 di ABL che determina una sostituzione amminoacidica in posizione 315, successivamente denominata mutazione T315I⁽⁵⁵⁾. Sono state attualmente descritte circa 90 differenti sostituzioni amminoacidiche, tuttavia 15 di esse sono nettamente più frequenti e coprono circa l'85% delle mutazioni osservate nella

STUDIO/FONTE BIBLIOGRAFICA	DOSE IMATINIB, Mg	N. PAZIENTI	N. PAZIENTI AD ALTO RISCHIO (SOKAL, EURO)	CCyR	MMoIR
AIRIS / (15,16)	400	553	18% (S)	68%	38%
HAMMERSMITH / (21)	400	224	30% (S)	57%	18%
TOPS / (26)	400	157	27% (S)	66%	40%
FRENCH SPIRIT / (28)	400	159	24% (S)	58%	38%
ENESTnd / (35)	400	283	28% (S)	65%	22%
NORTHAMERICA/CANADA / (33)	400	123	28% (S)	69%	44%
DASISION / (38)	400	260	19% (E)	72%	28%
BELA / (34)	400	252	18% (S)	68%	27%
GIMEMA / (29)	400*	559	22% (S)	77%	58%
SEOUL, St. Mary Hospital / (32)	400#	363	22% (S)	73%	27%
GERMAN LMC STUDY IV /	400	325	12% (E)	49%	34%
HOUSTON / (25)	800§	258	8% (S)	77%	NR
TIDEL / (23)	800	103	33% (S)	88%	47%
TOPS / (26)	800	319	23% (S)	70%	46%
GERMAN LMC STUDY IV / (31)	800	338	14% (E)	63%	46%

* Imatinib 600-800 mg nel 23% dei pazienti; § 6-800 mg nel 17% dei pazienti; # 400 mg nel 19% dei pazienti; NR = Non riportato nello studio

Tabella 1 – Principali trial clinici con imatinib in prima linea per il trattamento della LMC in fase cronica precoce.

pratica clinica in pazienti con resistenza primaria o secondaria ad imatinib o altri inibitori di tirosin-chinasi (Figura 4) ^(14,56). La rilevanza funzionale delle singole mutazioni non è ancora completamente chiara. Per alcune di esse, come la T315, vi è una evidente dimostrazione che modificano la conformazione sterica del sito di legame del farmaco alla proteina oncogenica contribuendo in modo significativo alla riduzione di efficacia della terapia ed alla progressione della malattia (*driver mutations*), mentre altre potrebbero essere semplicemente dei marcatori surrogati di instabilità genomica tipici

delle fasi più avanzate della malattia (*passenger mutations*) (Tabella 2). È anche poco chiaro il meccanismo che causa queste mutazioni e che conferisce il vantaggio di crescita al subclone Ph⁺ in cui si origina la mutazione. Probabilmente non sono causate direttamente dalla terapia con inibitore di tirosin-chinasi che svolge, invece, un ruolo di selezione nei confronti del clone mutato. Tuttavia, allo stato attuale delle nostre conoscenze, la ricerca della eventuale presenza di mutazioni in pazienti di nuova diagnosi e prima del trattamento non sembra avere un significato sulla probabilità di risposta

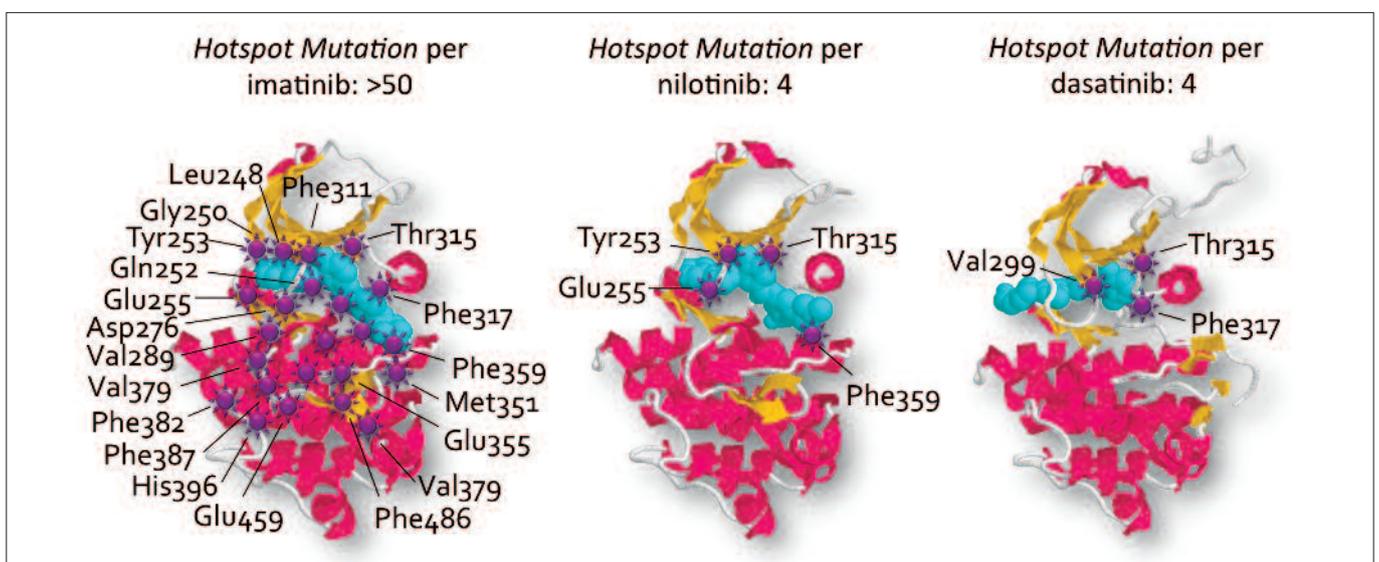


Figura 4 – Struttura molecolare del sito catalitico di ABL con le mutazioni più frequenti (Hotspot) rilevate nei pazienti con resistenza primaria o secondaria al trattamento

alla terapia nei pazienti in fase cronica. Tuttavia la ricerca delle mutazioni deve essere sempre effettuata quando si cambia il trattamento sostituendo un inibitore con un altro per resistenza primaria o secondaria, in quanto le varie mutazioni hanno un effetto differente sulla attività dei vari inibitori di tirosin-chinasi nei confronti della proteina oncogenica BCR/ABL (Tabella 2) ^(5,14).

Inibitori di tirosin-chinasi di seconda generazione

Oltre l'imatinib, altri due farmaci della categoria degli inibitori di tirosin-chinasi, il dasatinib ed il nilotinib, sono utilizzabili in Italia per la terapia di prima linea della LMC in fase cronica. Lo sviluppo di entrambi ha tratto notevoli benefici dai progressi delle conoscenze sulla struttura molecolare del sito catalitico delle tirosin-chinasi e di

Bcr-Abl1	IMATINIB IC ₅₀ , range (nM)	NILOTINIB IC ₅₀ , range (nM)	DASATINIB IC ₅₀ , range (nM)	BOSUTINIB IC ₅₀ (nM)	PONATINIB IC ₅₀ (nM)
Non mutato	260 - 678	<10 - 25	0.8 - 1.8	41.6	1.1
M244V*	1,600 - 3,100	38 - 39	1.3	147.4	2.2
L248V	1,866 - 10,000	49.5 - 919	9.4	N.A.	N.A.
G250E*	1,350 - >20,000	48 - 219	1.8 - 8.1	179.2	4.1
Q252H	734 - 3,120	16 - 70	3.4 - 5.6	33.7	2.2
Y253F	>6,400 - 8,953	182 - 725	6.3 - 11	40	2.8
Y253H*	>6,400 - 17,700	450 - 1,300	1.3 - 10	N.A.	6.2
E255K*	3,174 - 12,100	118 - 566	5.6 - 13	394	14
E255V	6,111 - 8,953	430 - 725	6.3 - 11	230.1	36
D276G	1,147	35.3	2.6	25	N.A.
E279K	1,872	36.5 - 75	3	39.7	N.A.
V299L	540 - 814	23.7	15.8 - 18	1,086	N.A.
F311L	480 - 1,300	23	1.3	N.A.	N.A.
T315I*	>6,400 - >20,000	697 - >10,000	137 - >1,000	1,890	11
T315A	125	N.A.	760	N.A.	1.6
F317L*	810 - 7,500	39.2 - 91	7.4 - 18	100.7	1.1
F317V	500	350	N.A.	N.A.	10
M351T*	880 - 4,900	7.8 - 38	1.1 - 1.6	29.1	1.5
F359V*	1,400 - 1,825	91 - 175	2.2 - 2.7	38.6	10
V379I	1,000 - 1,630	51	0.8	N.A.	N.A.
L384M*	674 - 2,800	39 - 41.2	4	19.5	N.A.
L387M	1,000 - 1,100	49	2	N.A.	N.A.
H396R*	1,750 - 5,400	41 - 55	1.3 - 3	33.7	N.A.
H396P	850 - 4,300	41 - 43	0.6 - 2	18.1	1.1
F486S	2728 - 9100	32.8 - 87	5.6	96.1	N.A.
CONCENTRAZIONE PLASMATICA DEL FARMACO					
Cmin	2062 ± 1334	1923 ± 1233	5.5 ± 1.4	268 (30 - 1533)	113 ± 51
Cmax	4402 ± 1272	2329 ± 772	133 ± 73.9	392 (80-1858)	256 ± 128

Tabella 2 – Sensibilità in vitro della forma non mutata e delle principali forme mutate di BCR-ABL ad imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib, e ponatinib. La concentrazione del farmaco che inibisce al 50% la vitalità della linea cellulare linfoblastoide Ba/F3 trasfettata con i differenti mutanti della proteina BCR-ABL è considerata universalmente come una misura della sensibilità dei mutanti agli inibitori di tirosin-chinasi.

ABL, che ha reso possibile nei primi anni 2000 una ricostruzione tridimensionale molto precisa dei domini proteici che compongono il sito catalitico di ABL e che ne vanno a determinare la caratteristica forma bilobata⁽⁵⁷⁾. La diretta conseguenza è stata la sintesi di due farmaci, il dasatinib ed il nilotinib, disegnati razionalmente al computer per adattarsi al sito catalitico della proteina oncogenica BCR-ABL con maggiore affinità rispetto ad imatinib. Infatti, sia la concentrazione inibente il 50% dell'attività dell'enzima *in vitro* (IC₅₀ biochimica) sia la concentrazione inibente il 50% della crescita delle cellule Ph+ in colture cellulari (IC₅₀ cellulare) dei due farmaci di seconda generazione è nettamente inferiore a quella di imatinib (Tabella 2)⁽⁵⁾. Inoltre, la identificazione e caratterizzazione di subcloni Ph+ con mutazioni a livello della proteina oncogenica (vedi paragrafo precedente) nei pazienti con resistenza primaria o secondaria all'imatinib, hanno condotto a programmare la struttura dei due farmaci per adattarsi al meglio anche in molte delle forme mutate della proteina BCR-ABL⁽⁵⁾. Due studi indipendenti di fase 2, condotti su di un numero di pazienti non elevato, indicarono la elevata attività in termini clinici e la capacità di indurre risposte rapide e profonde in termini di riduzione della massa leucemica residua del nilotinib, l'altro inibitore di tirosin-chinasi di seconda generazione registrato per il trattamento *front-line* della LMC, aprendo la strada alla sperimentazione e poi alla registrazione di questi nuovi farmaci nella terapia di prima linea^(58,59). Come conseguenza, nel 2010 sia il dasatinib che il nilotinib sono stati registrati per il trattamento di prima linea dei pazienti con LMC avendo dimostrato superiorità clinica rispetto ad imatinib in due studi randomizzati di fase 3 (DASISION e ENESTnd rispettivamente) in cui i due farmaci di seconda generazione erano comparati al braccio di controllo dello studio costituito da imatinib (Figura 5)^(10,11). Gli end-point dei due studi erano diversi, la MMolR dopo 12 mesi di trattamento per lo studio

ENESTnd del nilotinib e la CCyR dopo 12 mesi di terapia per lo studio DASISION per il dasatinib, ma in entrambi gli studi, e negli aggiornamenti più recentemente pubblicati sul monitoraggio a medio termine dei pazienti arruolati, erano raccolti i dati di efficacia in termini di marcatori surrogati ed indici clinici di risposta^(10,11,60-62). Il dato che emerge da entrambi gli studi in modo molto netto è che i farmaci di seconda generazione mostrano una netta rapidità nell'indurre risposte profonde, in termini di riduzione della massa leucemica, rispetto ad imatinib. Nello studio DASISION la probabilità cumulativa di CCyR, MMolR, MR4.5 dopo 2 anni di trattamento con dasatinib era rispettivamente del 86%, 64% e 17%, rispettivamente, mentre era del 82%, 46% e 8% nei pazienti arruolati nel braccio imatinib⁽¹⁰⁾. Dopo tre anni di trattamento si registrava ancora un vantaggio statisticamente significativo in termini di probabilità di risposta molecolare nei pazienti del braccio dasatinib, con una percentuale di MR4.0 e MR4.5 di 35% e 22% per il trattamento con dasatinib contro il 22% e 12% per il trattamento con imatinib^(61,63). Da un punto di vista clinico, uno dei risultati attesi del trial era la capacità di ridurre il numero delle progressioni precoci osservate in una piccola ma significativa percentuale di pazienti trattati con imatinib che era registrata in tutti gli studi sino allora pubblicati.

Le progressioni a fasi avanzate della malattia erano il 2,2% nei pazienti trattati con dasatinib ed il 5% in quelli trattati con imatinib, ma la differenza non era tuttavia statisticamente significativa^(10,61,63). Dati simili erano ottenuti in studi indipendenti di disegno sperimentale simile. I risultati del trattamento di prima linea dei pazienti in fase cronica precoce con nilotinib, non mostrano grandi differenze in particolare per quanto riguarda gli indici surrogati di profondità della risposta. Nello studio ENESTnd, in cui la terapia con nilotinib nei due bracci sperimentali che testavano le dosi di 300mg BID o

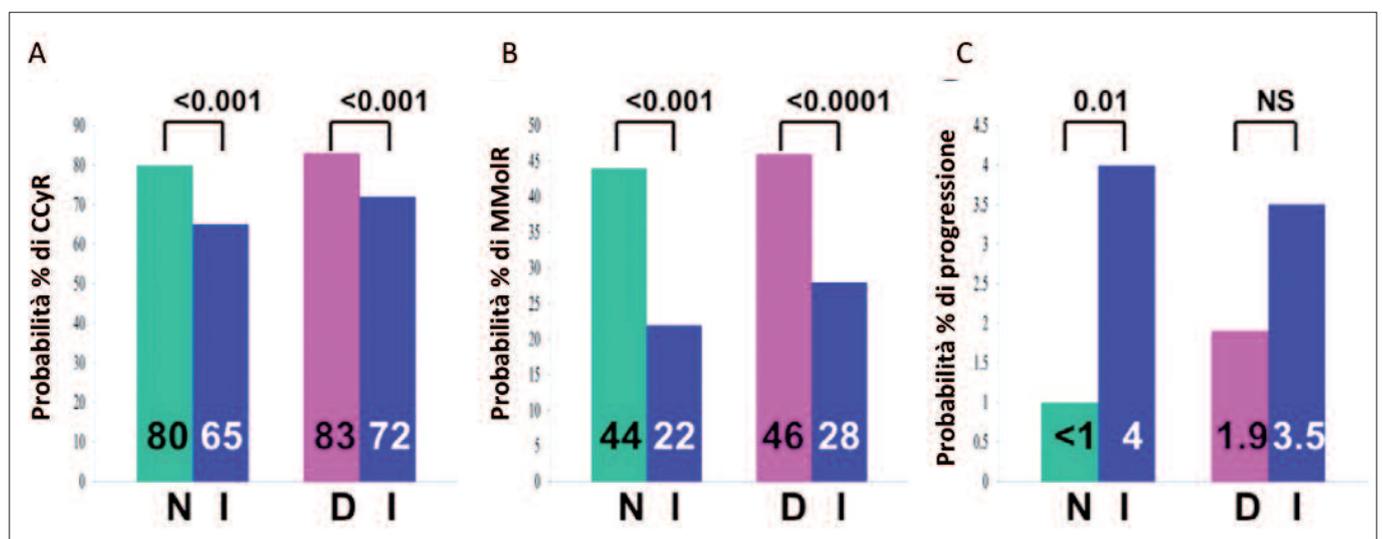


Figura 5 – Risposte alla terapia con Nilotinib (n) e Dasatinib (d) confrontate con quelle ottenute con Imatinib (I) negli studi ENESTnd e DASISION^{10,11}. Nei riquadri A e B sono mostrate le probabilità di risposta citogenetica completa (CCyR) e molecolare (MMR) ottenute a 12 mesi. Il riquadro C mostra le progressioni a fasi accelerate o blastiche con nilotinib (N) e dasatinib (D) rispetto ad imatinib (I), alla conclusione dei primi 12 mesi di follow up.

400mg BID era comparata con imatinib, le risposte ottenute con nilotinib erano superiori a quelle dei pazienti randomizzati nel braccio imatinib, mentre non erano rilevate differenze significative di efficacia tra i due differenti dosaggi di nilotinib comparati nello studio. Il dosaggio più alto (400 mg/BID) dimostrava, tuttavia, una maggiore tossicità in termini di effetti collaterali precoci ⁽¹¹⁾. Dopo due anni di trattamento, la probabilità cumulativa di CCyR era dell'87% nei pazienti che avevano ricevuto nilotinib 300 mg/BID, significativamente superiore a quella (77%) verificata nei pazienti trattati con imatinib ⁽¹¹⁾. Dopo tre anni di trattamento, la probabilità cumulativa di MR4.0 e MR4.5 era del 73% e 32% rispettivamente nel caso di trattamento con nilotinib (300 mg/BID) significativamente superiore rispetto a quella, 53% e 15%, osservata nei pazienti trattati con imatinib ⁽⁶⁴⁾. La differenza nella probabilità di progressione a fasi avanzate della malattia, 0,7% per nilotinib 300 mg/BID e 4,2% per imatinib, era significativamente a vantaggio dei pazienti del braccio di trattamento con nilotinib ^(11,64).

I principali dati ottenuti a lungo termine con dasatinib e nilotinib sono sintetizzati nella tabella 3 ^(10,44,61,63). Nonostante gli inibitori di seconda generazione dimostrino una superiorità in termini di efficacia nei confronti diretti (studi randomizzati) ed indiretti (confronto con serie storiche e studi indipendenti) con imatinib, quest'ultimo viene ancora largamente utilizzato in tutti i paesi occidentali per la

terapia di prima linea dei pazienti in fase cronica precoce ⁵. Numerosi sono i motivi di ciò, tra cui la assenza di una chiara dimostrazione di un vantaggio in termini di sopravvivenza totale del trattamento con farmaci di seconda generazione ma anche per la assenza, ad un follow up che ormai raggiunge più di 14 anni nei primi pazienti trattati con questo farmaco, di eventi avversi severi ed inattesi.

Il valore della cinetica iniziale per valutare la risposta

Dopo l'inizio del trattamento con un inibitore di tirosin-chinasi, i pazienti con LMC mostrano un decremento piuttosto rapido della malattia residua e la gran parte raggiunge il traguardo della CCyR entro i primi 12 mesi di trattamento. Negli ultimi anni, con la disponibilità di farmaci più potenti di imatinib per la terapia di prima linea della LMC, e quindi con la possibilità (e la necessità!) di scegliere tra vari farmaci la terapia di prima linea, sono stati compiuti una serie di tentativi atti ad identificare il più precocemente possibile quel più piccolo numero di pazienti che, al contrario, non mostrano una altrettanto rapida risposta al trattamento con i nuovi farmaci a bersaglio molecolare. Al momento non esistono però metodi per la stadiazione prognostica pre-trattamento dotati di affidabilità adatta ad un uso clinico routinario, ad eccezione dei tradizionali indici prognostici clinici, come il Sokal ⁽⁶⁵⁾, l'EURO score ⁽⁶⁶⁾ ed il più recente

	DASISION	ENEST [#]
Pazienti totali (n)	258	282
Pazienti in trattamento a 4 anni dall'arruolamento	66%	66%
Probabilità cumulativa di CCyR a 12 mesi	83%	80%
Probabilità cumulativa di MMoR		
- 12 mesi	46%	50%
- 36 mesi	68%	73%
- 48 mesi	74%	76%
Probabilità cumulativa di MR4.0		
- 12 mesi	12%	15%
- 36 mesi	35%	50%
- 48 mesi	47%	56%
Probabilità cumulativa di MR4.5		
- 12 mesi	3%	13%
- 36 mesi	22%	32%
- 48 mesi	34%	40%
Probabilità di sopravvivenza libera da progressione	90.0%	92.7%
Probabilità di sopravvivenza totale	92.9%	94.3%

[#]: I dati si riferiscono ai pazienti del braccio di trattamento con nilotinib alla dose di 300 mg BID

Tabella 3 – Studi registrativi di fase III con nilotinib e dasatinib in pazienti affetti da LMC in fase cronica precoce.

score EUTOS ⁽⁶⁷⁾, che comunque danno una indicazione piuttosto debole della probabilità di risposta alla terapia con inibitori di tirosin-chinasi e, di fatto, non vengono adoperati per la scelta del trattamento ⁽⁵⁾. Negli ultimi anni numerosi studi hanno concordemente indicato che la velocità di riduzione iniziale della massa neoplastica, e cioè rilevata nei primi 3 - 6 mesi di trattamento, può essere considerato un indice prognostico di risposta al trattamento piuttosto attendibile, denominato risposta molecolare precoce (EMR, *Early Molecular Response*). È da ricordare, a tal proposito, che già diversi anni fa, all'inizio degli anni duemila, le prime analisi della cinetica di risposta in piccoli sottogruppi di pazienti arruolati nello studio IRIS indicavano che il valore della risposta molecolare dopo 1 e 3 mesi di trattamento erano predittivi del successo, in termini di probabilità di MMolR, della terapia con imatinib e, cosa ancor più importante, consentivano di identificare i pazienti con bassa probabilità di ottenere risposte citogenetiche o molecolari di rilevante significato prognostico ^(31,68,69). Due studi indipendenti pubblicati molto più recentemente hanno poi definito in modo più accurato i valori soglia che possono essere utilizzati per l'uso prognostico della EMR, aprendo così un ampio dibattito sui tempi, i valori da considerare, il peso prognostico di quest'ultima e la utilità o la necessità di modificare il trattamento in quei pazienti che non mostrano la ottimale rapidità di riduzione iniziale del residuo malattia ^(70,71). In modo abbastanza sorprendente, entrambi gli studi indicavano il 10% di malattia residua misurato mediante analisi di QPCR sulla scala internazionale dopo tre mesi di trattamento, e cioè un logaritmo di riduzione della risposta rispetto ai valori attesi alla diagnosi (Figura 1), come soglia con valore prognostico nei pazienti trattati in fase cronica precoce (Figura 6). In entrambi gli studi i pazienti che mostravano un residuo di malattia superiore a 10% (9,68% nello studio di Marin et al) a tre mesi di trattamento, mostravano una probabilità di OS e PFS statisticamente inferiore rispetto ai pazienti con una riduzione più rapida della malattia ed un residuo inferiore al 10% allo stesso tempo ^(70,71). Inoltre, entrambi gli studi indicavano che la rapidità di risposta è un parametro prognostico importante quando valutata mediante metodi molecolari ma anche citogenetici. L'importanza del valore soglia del 10% è stato confermato piuttosto rapidamente in altri 10 studi pubblicati più recentemente e sintetizzati in Tabella 3 ^(49,61,72-79). In tutti gli studi, la percentuale di pazienti con malattia residua superiore a 10% a tre mesi è superiore nei pazienti trattati con imatinib alla dose standard di 400mg/die rispetto a quella mostrata dai pazienti trattati con inibitori di seconda generazione (24-67% vs 8,6-16%). I pazienti trattati con alte dosi di imatinib (600-800mg/die degli studi TIDEL I/II, RIGHT e SWOG) mostravano percentuali di raggiungimento del traguardo del 10% più vicine a quelle degli inibitori di seconda generazione (Tabella 4). Quando riportato, la probabilità di EMR era sempre inferiore per i pazienti a rischio Sokal alto. In 11 dei 12 studi la EMR correlava significativamente con la probabilità di OS e di EFS, ed era sempre

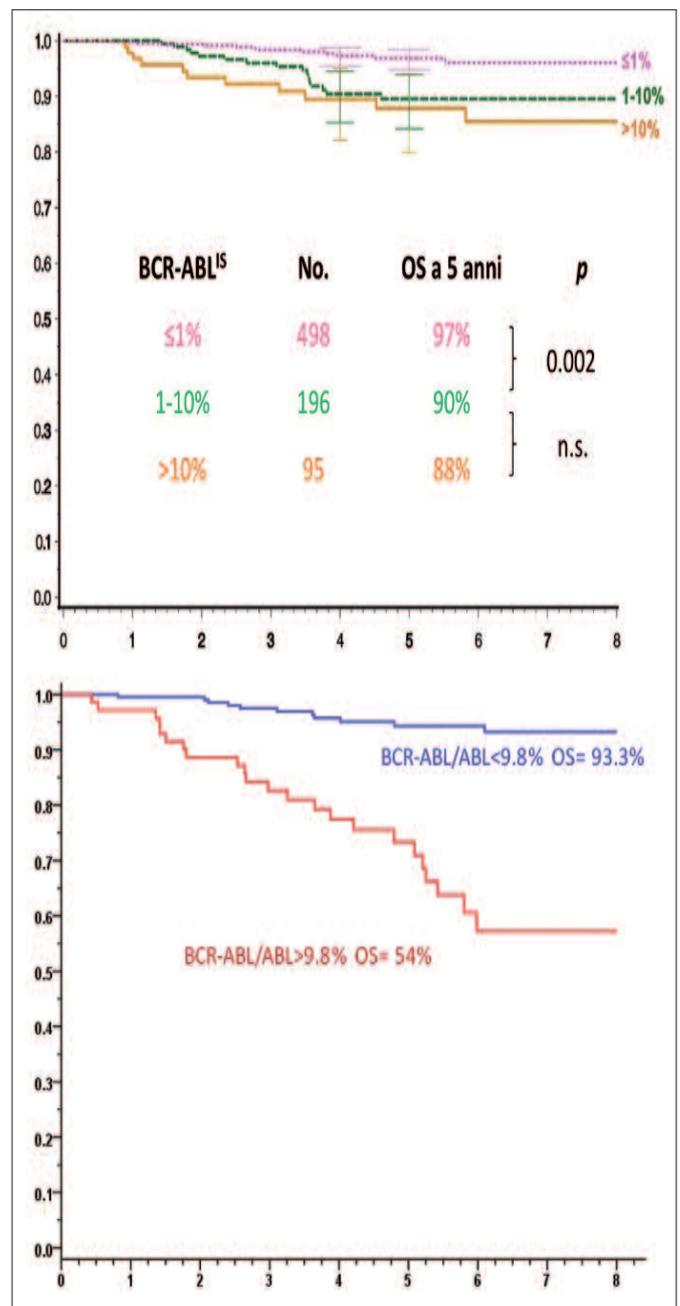


Figura 6 – Probabilità di OS per i pazienti trattati con Imatinib e stratificati rispetto alla risposta molecolare precoce (dopo tre mesi di terapia) negli studi pubblicati nel 2012 da Marin et al ⁽⁷⁰⁾ e da Hanfstein et al ⁽⁷¹⁾.

associata ad una maggiore probabilità di risposta molecolare e risposta molecolare profonda (MR3.0, MR4.0 e MR4.5) ^(49,61,70-79). Ad esempio, la probabilità di risposta MR4.5 nello studio ENESTnd trattati con nilotinib nel braccio 300 mg/BID era del 50% nei pazienti che avevano dopo tre mesi un residuo di malattia inferiore a 1% e del 4% in quelli con malattia residua superiore a 10% ⁽⁷³⁾. Non tutti i pazienti che falliscono la soglia per la EMR a tre mesi sono però destinati ad avere un'insoddisfacente risposta al trattamento; oltre al valore del 10% a tre mesi, infatti, anche il livello di malattia residua a 6 mesi ha un valore prognostico ^{80,81}. Ad esempio, in uno studio recentemente condotto in Canada, i pazienti che falliva-

STUDIO	TERAPIA (MG/D)	PAZIENTI CON BCR-ABL1 >10% A 3 MESI [% (N/N)]	OUTCOME DEL TRATTAMENTO STRATIFICATO PER I LIVELLI DI BCR-ABL A 3 MESI												
			MMOLR				OS				EFS/TFS/EFS†				
			≤10%			TEMPO (ANNI)	≤10%			TEMPO (ANNI)	≤10%			TEMPO (ANNI)	
			>10%	1%-10%	≤1%		>10%	1%-10%	≤1%		>10%	1%-10%	≤1%		
German LMC IV ⁷¹	IM400-800	28% (191/692)	20%	36%	73%**	1	87%	94%	97%*	5	87%	92%	96%*	5	
ENESTnd ⁷³	NIL300 BID	9.3% (24/258)	4%	40%	76%**	1	87%	97%*		4	83%	95%*		4	
	NIL400 BID	11% (28/260)	14%	38%	72%**		93%	97%			89%	97%*			
	IM400	33% (88/264)	2%	31%	71%**		84%	99%*			83%	98%*			
DASISION ⁶¹	DAS100	16% (37/235)	16%	59%	88%**	2	86%	96%*		3	68%	93%*		3	
	IM400	36% (85/239)	19%	60%	88%**		88%	96%*			75%	96%*			
BELA ⁷⁸	BOS500	14% (29/208)	17%	56%*		1	88%	99%*		2	83%	93%		2	
	IM400	35% (77/223)	5%	46%*			95%	99%*			85%	92%			
SWOG S0325 ⁷⁷	IM400	35% (19/55)	10%	41%		1	71%	91%		4	59%	88%		4	
	IM800	20% (11/56)	0%	74%*			100%	98%			100%	92%			
TIDEL-IP ⁹	IM600-800 → NIL800	12% (25/210)	16%	39%	75%**	1	84%	98%	98%	3	80%	96%	97%	3	
RIGHT ⁷⁵	IM800	11% (9/81)	33%	55%	80%	1.5	ND				ND				
TIDEL-I ⁴⁹	IM600-800	26% (25/95)	35%	62%	94%	2	ND				ND				
IRIS subgroup ⁷¹	IM400	25% (43/174)	ND					81%	93%	92%*	8	ND			
Marin et al ⁷⁰	IM400	24% (68/279)	0%	70%*		8	57%	93%*		8	56%	93%		8	
El-Metnawy et al ⁷⁶	IM400	60% (33/55)		ND			96%	100%		3	80%	100%*		3	
Kagita et al ⁷²	IM400	67% (28/42)		ND			96%	100%		2	96%	100%		2	
Marin et al ⁷⁴	DAS100	8.6% (11/128)	14%	80%*		2	ND				ND				

ND: dato non disponibile nella pubblicazione; IM, imatinib; BOS, bosutinib; NIL, nilotinib; DAS, dasatinib; OS, overall survival; TFS, treatment-free survival; EFS, event-free survival.
Le risposte sono stratificate per BCR-ABL >10%, <10% ma >1%, e <1% a 3 mesi quando il dato era disponibile nello studio.
Marin et al consideravano il valore soglia di BCR-ABL a 3 mesi del 9,84% e non del 10%.
*P < 0,05 dei pazienti con BCR-ABL >10% vs <10%; **P < 0,05 dei pazienti nei 3 gruppi con BCR-ABL >10%, <10% ma >1%, e <1% a 3 mesi.
†Le percentuali di PFS/TFS/EFS non sono comparabili tra i differenti studi per le diverse definizioni di essi utilizzate negli studi.

Tabella 4 – Probabilità di MMOLR, OS e PFS nei pazienti trattati con inibitori di tirosin-chinasi e stratificati per EMR.

no l'obiettivo della EMR a tre mesi, ma avevano una riduzione della malattia residua a sei mesi inferiore al 10%, mostravano una OS ed una PFS abbastanza simile a quelli che avevano già raggiunto la EMR a tre mesi⁽⁸¹⁾. Al contrario, i pazienti con un residuo leucemico superiore al 10% sia a 3 che 6 mesi di trattamento, mostravano un rischio particolarmente elevato di trasformazione⁽⁸¹⁾.

La cinetica individuale di risposta nei singoli pazienti, che misura la riduzione percentuale della massa leucemica in relazione al livello di espressione del trascritto BCR-ABL misurato nel paziente prima della terapia, sembra dare alcuni vantaggi rispetto alla valutazione della cinetica di risposta misurata come di uso sinora con la scala internazionale. Le oscillazioni interindividuali del valore pretrattamento della quantità di BCR-ABL sono infatti piuttosto ampie e pertanto la misura individualizzata descrive con maggior precisione la cinetica precoce di risposta al trattamento. Di conseguenza, in uno studio piuttosto recente, Branford et al⁽⁸⁹⁾ hanno dimostrato che la misura del tempo di dimezzamento individualizzato della massa leucemica iniziale nei pazienti che falliscono la EMR misurata con metodiche tradizionali, riesce ad identificare i pazienti (quelli con tempo di dimezzamento superiore a 76 giorni) con più elevata probabilità di

fallire il trattamento. A risultati simili sono giunti in uno studio condotto dal gruppo cooperatore tedesco per la LMC in cui è stata misurata la velocità individuale di riduzione della massa leucemica⁽⁷¹⁾. Non è tuttavia chiaro se un potenziale cambio di strategia terapeutica nei pazienti che falliscono la EMR a tre o sei mesi può recuperare la prognosi del singolo paziente, aiutando quindi la scelta del farmaco da utilizzare in prima linea di trattamento. Le linee guida proposte dal NCCN in Nord America e le raccomandazioni del *European LeukemiaNet* propongono soluzioni differenti a tal riguardo, ed in particolare sull'opportunità di cambiare il trattamento dei pazienti con cinetica precoce insoddisfacente (Tabella 5)^(5,82).

Risposte molecolari profonde e interruzione del trattamento

Nell'era della terapia con inibitori di tirosin-chinasi, si è diffuso, e poi progressivamente meglio definito, il concetto di risposta molecolare. Abbastanza rapidamente è stata fissata la definizione di MMoIR, cui corrisponde la riduzione di 3 logaritmi della massa leucemica residua. Successivamente, l'osservazione che in molti pazienti la MMoIR non solo si mantiene per lungo tempo durante la terapia,

TEMPI	NCCN	ELN	THE FUTURE?
3° mese	Se >10% IS o >35% Ph+: • Aumentare la dose di Imatinib • Continuare il trattamento se iniziato con Nilotinib o Dasatinib • Cambio di TKI	Se non ottenuta CHR or >95% Ph+: • Cambio di TKI Se >10% IS o >35% Ph+: • Aumentare frequenza monitoraggio	Halving time >75-90 giorni Livello di trascritto BCR-ABL <0.35-volte al baseline
6° mese	Se >10% IS o >35% Ph+: • Cambio di TKI	Se >10% IS o >35% Ph+: • Cambio di TKI Se 1%-10% IS o 1%-35% Ph+: • Aumentare frequenza monitoraggio	>6% IS con GUS (vs ABL) come gene di controllo >0% Ph+ se terapia con nilotinib o dasatinib
12° mese	Se non in CCyR or MMoIR: • Citogenetica e mutazioni nel BM Se 1%-35% Ph+: • Aumentare la dose di Imatinib • Continuare il trattamento se iniziato con nilotinib o dasatinib • Cambio di TKI Se >35% Ph+: • Cambio di TKI	Se >1% IS o >0% Ph+: • Cambio di TKI Se 0,1-1% IS: • Aumentare frequenza monitoraggio	
18° mese	Se non in CCyR or MMoIR: • Citogenetica e mutazioni nel BM Se >0% Ph+: • Cambio di TKI e rianalisi dei risultati precoce		
In qualsiasi momento		CCA/Ph- (-7, o 7q-) • Citogenetica e mutazioni nel BM Perdita di CHR, CCyR, o perdita confermata di MMoIR, (+) mutazioni o CCA/Ph+: • Cambio di TKI	

Tabella 5 – Punti decisionali nelle raccomandazioni e linee guida sulla LMC di NCCN82, ELN5, e possibili scenari futuri.

ma, addirittura, il residuo leucemico tende a ridursi ulteriormente ha portato alla necessità di definire in modo più preciso quella che inizialmente veniva definita risposta molecolare completa (CMR). L'affinarsi delle tecniche di indagine consente attualmente di tracciare con un buon livello di accuratezza la riduzione della massa leucemica fino anche a 5 logaritmi, indicate ora come MR4.0 (BCR-ABL1 $\leq 0,01\%$), MR4.5 (BCR-ABL1 $\leq 0,0032\%$), e MR5 (BCR-ABL1 $\leq 0,001\%$), mediante un sistema ormai standardizzato per bilanciare l'effetto dell'eventuale degradazione del campione biologico sulla sensibilità dell'analisi ^(34,35) (Figura 1). La logica conseguenza dell'osservazione di un numero sempre crescente di risposte profonde, MR4.0 o migliori, nei pazienti in trattamento, ha portato alle fine del decennio scorso alla discussione sul paradigma inizialmente affermatosi per il trattamento della LMC: una terapia iniziale orale che induce la remissione clinica in praticamente tutti i pazienti, seguita da un mantenimento della risposta alla terapia iniziale (terapia primaria o di induzione) con lo stesso farmaco senza modifiche del dosaggio che deve essere proseguito indefinitamente. In alcuni pazienti con risposte molecolari profonde che per vari motivi dovevano interrompere il trattamento con l'inibitore di tirosin-chinasi fu notato, infatti, che la sospensione del trattamento non si associava necessariamente alla ricrescita del clone neoplastico con la ricomparsa della malattia, mentre, al contrario, la sospensione del trattamento in pazienti con risposte molecolari inferiori alla MMoIR e che avevano inoltre un ridotto tempo di trattamento totale determinava invariabilmente la ripresa della crescita leucemica ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. Queste osservazioni in qualche modo confermavano i dati ottenuti sui pazienti trattati con interferone α negli anni novanta: il piccolo gruppo di pazienti in CCyR stabile dopo un lungo periodo di trattamento poteva provare ad interrompere la terapia, e la probabilità di mantenere la risposta citogenetica era proporzionale alla durata della terapia ed in particolare al tempo di persistenza in CCyR ⁽⁸⁶⁾. Questi dati sembravano quindi contraddire il paradigma iniziale della terapia ed indicare la possibilità di raggiungere, almeno in un gruppo di pazienti, una remissione profonda mantenuta dopo la sospensione del trattamento (TFR) che in qualche modo corrispondeva a quella che iniziò ad essere definita una cura funzionale della LMC. Durata della terapia e profondità di risposta sembravano essere i prerequisiti della cura funzionale. Uno studio pilota condotto in Francia da Rousselot et al, in 12 pazienti che avevano ottenuto e mantenuto la CMR per almeno due anni, dimostrò che la metà di essi manteneva la risposta completa anche dopo la sospensione del trattamento con un tempo di osservazione superiore a 18 mesi ⁽⁸⁷⁾. Questi risultati aprirono la strada ad un *trial*, denominato STIM, sempre condotto in Francia, che ha arruolato 100 pazienti con LMC trattati con imatinib in fase cronica e che avevano una malattia residua

non rilevabile da una metodologia basata sulla PCR e dotata di una sensibilità di circa logaritmi, che doveva essere mantenuta per almeno due anni ⁽¹⁵⁾. I pazienti erano monitorati prospettivamente mediante con Q-PCR effettuate ad intervalli mensili su sangue periferico e la recidiva era definita come la conversione alla positività dell'analisi in due controlli successivi. In caso di recidiva molecolare il trattamento con imatinib era ripreso allo stesso dosaggio. La prima analisi dei risultati dopo un monitoraggio mediano di 12 mesi indicò una probabilità di TFR del 41%, con la maggior parte delle recidive molecolari rilevate nei primi sei mesi dalla interruzione del trattamento ¹⁵. È importante notare che tutti i pazienti in recidiva molecolare mostravano responsabilità alla ripresa del trattamento con imatinib, dimostrando così che la interruzione del trattamento, qualora esiti in un fallimento non compromette la risposta globale alla terapia del singolo paziente ⁽¹⁵⁾. Un aggiornamento successivo dello studio confermava che la TFR era stabile nel tempo; dopo 36 mesi di monitoraggio, il 39% dei pazienti si manteneva in TFR con soli tre casi di recidive molecolari tardive registrate a 19, 20 e 22 mesi ⁽⁸⁸⁾. Includendo il trial SPIRIT, sono stati pubblicati sette studi prospettici e 2 retrospettivi che studiano la possibilità di interrompere il trattamento nei pazienti con LMC (Tabella 6).

I criteri di arruolamento nei differenti studi sono piuttosto variabili per quanto riguarda il tempo di trattamento totale, il livello di risposta molecolare e la sua durata ^(15,21,87-95). I criteri di ingresso agli studi erano in genere piuttosto stringenti con il requisito di una risposta tipo CMR sostenuta per almeno due anni in sei degli studi pubblicati sinora (Tabella 6). Inoltre, anche i criteri di soglia per iniziare il ritrattamento sono variabili, ed in due studi il ritrattamento era iniziato quando i pazienti oltrepassavano la soglia della MMoIR ^(93,94). Il commento generale è comunque che la sospensione della terapia è possibile senza correre eccessivi rischi in un sottogruppo di pazienti e la probabilità di TFR è vicina al 45% in questi pazienti. Ancora da definire nel dettaglio sono, però, la percentuale di pazienti che arrivano a raggiungere la TFR ed i criteri minimi per iniziare la sospensione. Tra questi le analisi multivariate hanno identificato il rischio Sokal, la durata del trattamento e della CMR.

Tollerabilità ed effetti collaterali

In generale, i cinque inibitori di tirosin-chinasi disponibili in commercio hanno un profilo di tossicità abbastanza sovrapponibile. Sono tuttavia riscontrabili alcune chiare ed importanti differenze tra di loro che vanno conosciute perché possono giocare un ruolo importante nella scelta del farmaco più appropriato alla terapia nei singoli pazienti.

Quando l'imatinib era l'unico farmaco disponibile per il trattamento dei pazienti la maggior parte degli effetti collaterali era gestita

	French STIM Trial ¹⁵	ALLG CML8/TWISTER ^{21,89}	Keio STIM Study ⁹²	Goh et al ⁹³	Yhim et al (retrospettivo) ⁹⁰	Rousselot et al ⁸⁷	Takahashi et al (retrospettivo) ⁹¹	Rea et al ⁹⁴	Korean KIDS Study et al ⁹⁵
N	100	40	40	20	14	12	43	34 (valutabili)	74
M/F %	48/52	48/52		35/65	29/71	50/50	44/56	44/56	46/54
Età mediana, anni	63	58 (IM) 62 (IM+IFN)	54	44	60	70	57	58	45
Criteri per la interruzione	CMR > 2 anni	CMR > 2 anni	CMR > 2 anni	CMR > 2 anni	CMR > 1 anno	CMR > 2 anni		CMR > 2 anni	CMR > 1 anno
Durata mediana della terapia con TK	50 mesi (36-90)	70 mesi	98 mesi (24-126)	91 mesi (40-112)	56.4 mesi (26,2-82)	45 mesi (32-56)	45,2 mesi (4,5-92,7)	79 mesi (30-133); Tempo mediano con TKI di seconda generazione: 35 mesi (21-72) 86.5 mesi	(17,7-129,5)
Definizione di CMR	MR5.0 - IS	MR4.5 - IS	Q-PCR e PCR qualitativa negative†	MR4.5	< 0.0046% - IS	BCR-ABL non rilevabile†	< 0.01% IS	BCR-ABL non rilevabile†	BCR-ABL non rilevabile†
Precedente terapia con IFN	51%*	53%*		50%*	0%	83%*	58%	35%	*
Sokal score	Basso: 54% interm.: 35% alto: 13%	Basso: 50% interm.: 40% alto: 10%	Basso: 60% interm.: 25% alto: 7.5%	Basso: 30% interm.: 30% alto: 15% sconos.: 25%;	Basso: 7% interm.: 43% alto: 50%	Basso: 42% interm.: 42% alto: 8% sconos.: 8%	Basso: 58% interm.: 35% alto: 7%	Basso: 56% interm.: 24% alto: 11% sconos.: 9%	Basso: 38% interm.: 31% alto: 18% sconos.: 14%
Definizione di recidiva molecolare	> MR 5 ed incremento di un log in 2 misure successive	> MR4.5 in 2 misure successive o perdita della MMoR (> 0.1%) in una	Valore Q-PCR superiore a 100 copie	Perdita di MMoR in 2 misure successive	>0.0046% in 2 misure successive	RQ-PCR positiva in 2 misure successive	Rilevabilità di trascritti BCR-ABL	Perdita di MMoR in 1 misura successiva	Rilevabilità di trascritti BCR-ABL o perdita di MMoR in 2 misure successive
Recidiva Molecolare % (N)	61% (61)	55% (22)	45% (18)	0%	71% (10)	50% (12)	44% (19)	44% (15)	17% (1 incluso i pazienti trapiantati)
Indicazioni al ritrattamento	>MR 5 ed incremento di un log in 2 misure successive	>MR4.5 in 2 misure successive o perdita della MMoR (> 0.1%) in una	Valore Q-PCR superiore a 100 copie	Perdita di MMoR in 2 misure successive	QPCR positiva (> 0.0046%) in 2 misure successive	Positive RQ-PCR in 2 misure successive	-	Perdita di MMoR	Perdita di MMoR
End-point	Probabilità di CMR stabile: 39% a 36 mesi	TFR: 47% a 24 mesi	TFR: 55.4% a 12 mesi	Probabilità di CMR stabile: 90% a 7 mesi	Probabilità di CMR stabile: 28.6% a 12 mesi	Probabilità di CMR stabile: 50% a 18 mesi	Sopravvivenza libera da recidiva a 6 mesi: 47%	TFR: 58% a 12 mesi	Probabilità di MMoR CMR stabile a 12 mesi: 80.3% e 76,6%
Outcome dopo il ritrattamento	56/61 riottennero la CMR	16/19 riottennero la CMR dopo 24 mesi	17/18 riottennero la CMR	Non disponibili dati sul ritrattamento	7/10 riottennero la CMR	2/6 riottennero la CMR	Ritrattati 17/19 13/17 riottennero la CMR 4/17 la MMoR	10/15 riottennero la CMR 5/15 la MMoR	7/13 riottennero la CMR 4/13 la MMoR

*Alcuni pazienti avevano ricevuto il trapianto di cellule staminali emopoietiche.

†Sensibilità della tecnica non riportata.

‡Il trial includeva anche 23 pazienti che avevano ricevuto trapianto di cellule staminali e 3 pazienti che erano stati trattati con inibitori di seconda generazione per intolleranza ad Imatinib

Tabella 6 – Studi prospettici e retrospettivi di interruzione del trattamento in pazienti in risposta molecolare profonda

mediante brevi interruzioni o riduzioni del dosaggio del farmaco, e terapia di supporto. Ad esempio le citopenie osservate prevalentemente nelle fasi iniziali del trattamento erano affrontate con la somministrazione di fattori di crescita (epoietina e G-CSF), i rash cutanei e incremento delle transaminasi venivano spesso risolti mediante la somministrazione di basse dosi di steroidi. Attualmente, con la disponibilità di varie scelte tra gli agenti ad attività tirosin-chinasi per la terapia di prima e seconda linea, la tossicità di grado 3 o 4 viene in genere risolta cambiando il farmaco, sfruttando la ridotta intolleranza crociata che mostrano gli agenti di questa categoria di farmaci. Molto più problematico è l'approccio ai pazienti con effetti collaterali di grado inferiore (1 o 2) ma prolungato o concomitante che può impattare in modo significativo sulla qualità di vita e sulla compliance generale del singolo paziente al trattamento prolungato⁽⁹⁶⁾. In questi casi il timore che cambi di farmaco troppo affrettati possano determinare nel tempo una riduzione delle possibili scelte terapeutiche fa da contrappeso al desiderio di assicurare al paziente la massima tollerabilità del trattamento⁽⁹⁶⁾.

Negli ultimi anni sono riportati in letteratura alcuni eventi avversi di una certa gravità in pazienti in trattamento con farmaci inibitori di tirosin-chinasi di seconda e terza generazione⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾. Questi farmaci possono infatti determinare eventi avversi di tipo cardiovascolare dopo alcuni anni di terapia in pazienti che iniziano il trattamento con una storia clinica pregressa di eventi cardiovascolari⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾. Il dasatinib ed il bosutinib con minor frequenza possono determinare insorgenza di un versamento pleurico di tipo essudativo, che in genere viene ben controllato ricorrendo a riduzione della dose del farmaco, ma talvolta possono indurre a cambiare trattamento^(97,100). Il dasatinib può associarsi alla comparsa di ipertensione polmonare che non sempre è revertita con la sospensione del trattamento⁽¹⁰¹⁾.

Un lieve incremento del rischio di eventi cardiovascolari di tipo tromboembolico sia a carico del distretto arterioso e venoso, è osservato nei pazienti in trattamento a lungo termine con nilotinib e ponatinib^(98,99). Il controllo glicemico può migliorare durante la terapia con imatinib e dasatinib ma, sorprendentemente, si riduce e può peggiorare durante il trattamento con nilotinib⁽¹⁰²⁾.

Resistenza alla terapia: il trattamento di seconda e successive linee

Complessivamente, i pazienti con LMC che iniziano la terapia con imatinib hanno una probabilità di rimanere in trattamento con lo stesso farmaco ed in remissione citogenetica completa del 40-45%, dato confermato in numerosi studi indipendenti completati successivamente allo studio IRIS (tabella 1) ed in un recente aggiornamento negli archivi del LMC WP del GIMEMA^(15,16). Il cambio di terapia è dovuto alla comparsa di resistenza primaria o secondaria dimostrata dai pazienti prevalentemente du-

rante i primi due o tre anni di terapia, ma più frequentemente da ridotta compliance ad effetti collaterali anche di grado 1 o 2 protratti nel tempo. Pertanto una quota consistente di pazienti passa dal trattamento con imatinib ad un farmaco di seconda generazione, come nilotinib, dasatinib o bosutinib durante il corso della sua storia di malattia a causa di resistenza o intolleranza. La resistenza al trattamento nell'era degli inibitori di tirosin-chinasi è stata oggetto di specifiche raccomandazioni per la gestione del trattamento concordate in progressivi aggiornamenti da un panel di esperti del *European LeukemiaNet* inizialmente pubblicate nel 2006 e aggiornate nel 2009 e 2013^(4,5,7). La principale novità risiede nel fatto che la resistenza (o fallimento) del trattamento viene attualmente definita più che con la classica valutazione clinica di progressione alle fasi avanzate di malattia, con tecniche di laboratorio (citogenetica e molecolare) per la definizione della massa leucemica residua, ed in particolare dal mancato raggiungimento di specifiche soglie di riduzione della massa leucemica a determinati intervalli temporali (resistenza primaria), o la perdita degli obbiettivi raggiunti (resistenza secondaria). Con l'introduzione nella terapia di prima linea degli inibitori di seconda generazione, le soglie da raggiungere (e da mantenere) per definire la risposta alla terapia come ottimale sono state resi più stringenti (Tabella 7)⁽⁵⁾. La prognosi è ovviamente migliore in quest'ultimo caso. La probabilità di recuperare e mantenere nel tempo almeno la CCyR nei pazienti con resistenza/intolleranza alla terapia con imatinib iniziata in fase cronica precoce, è compresa tra il 45 ed il 60% utilizzando gli inibitori di seconda generazione^(60,103-106). Deve però essere sottolineato al riguardo, che gli studi citati sono stati condotti in un periodo in cui l'imatinib non aveva alternative di trattamento tra farmaci della classe degli inibitori di tirosin-chinasi e, di conseguenza, hanno arruolato pazienti con un tempo piuttosto prolungato di terapia e quindi con fase più avanzata di resistenza.

Molto più scarsi sono i dati relativi ai pazienti che mostrano resistenza al trattamento iniziale effettuato con nilotinib o dasatinib. Sinora, questi pazienti sono candidati ad un cambio di inibitore, generalmente un altro farmaco di seconda generazione. La probabilità di risposta non è però molto elevata e le percentuali di CCyR vanno dall'11 al 35% (Tabella 8)^(13,107-113,116). Altrettanto scarse sono le possibilità di ottenere la risposta in terza linea di trattamento utilizzando uno dei farmaci di seconda generazione. Una stima effettuata sommando i risultati di studi su pazienti che, dopo aver mostrato resistenza ad imatinib erano costretti a cambiare nuovamente il farmaco, ed in cui era considerato solo il cambio da dasatinib al nilotinib o viceversa e da dasatinib o nilotinib al bosutinib, la probabilità di ottenere la CCyR era del 22% per il bosutinib, del 24% per il dasatinib e del 26% per il nilotinib⁽¹¹⁴⁾. I cambi sequenziali di trattamento effettuati al manifestarsi di resi-

	OTTIMALE	WARNING	FALLIMENTO
Basale	NA	-Alto rischio, o -CCA/Ph+, via principale	NA
3 mesi	BCR-ABL1 \leq 10% e/o Ph+ \leq 35%	BCR-ABL1 > 10%, e/o Ph+ 36-95%	Non CHR, e/o Ph+ > 95%
6 mesi	BCR-ABL1 < 1% e/o Ph + 0	BCR-ABL1 1-10%, e/o Ph + 1-35%	BCR-ABL1 > 10%, e/o Ph + > 35%
12 mesi	BCR-ABL1 \leq 0.1%	BCR-ABL1 0.1-1 %	BCR-ABL1 > 1%, e/o Ph + \geq 1%
Successivamente, in qualsiasi momento	BCR-ABL1 \leq 0.1%	CCA/Ph- (-7, o 7q-), e/o mielodisplasia	Perdita di CHR Perdita di CCyR Perdita confermata di MMoIR* Mutazioni CCA/Ph +

* In due test consecutivi, dei quali uno con livelli di trascritto BCR-ABL \geq 1%. NA = Non Applicabile.
MMoIR = BCR-ABL1 \leq 0.1% = MR 3.0 o meglio

Tabella 7 – Definizioni della risposta alla terapia di prima linea con tutti i TKI secondo le raccomandazioni LeukemiaNet⁽⁵⁾.

STUDIO, FARMACO UTILIZZATO	N ^a	TEMPO MEDIANO DI MONITORAGGIO (MESI)	MUTAZIONE T315I (%)	RISPOSTA OSSERVATA (%)	
				MCyR	CCyR
Khoury et al, Bosutinib ¹⁰⁸	118	29	6	30	22
Quintas-Cardama et al, Dasatinib ¹⁰⁹	4	9	9	–	0
Giles et al, Nilotinib ¹¹⁰	37	12	11	43	24
Nicolini et al, Nilotinib ¹¹¹	218	–	–	41	28
Cortes (PACE) et al, Ponatinib ¹¹⁶	91 ^b	15.3	24	69	58
Cortes (Phase I) et al, Ponatinib ¹³	43 ^b	19.4	29	72	65
Garcia-Gutierrez et al, Dasatinib o Nilotinib ¹¹²	31	9	–	–	29 Ibrahim et al,
Dasatinib or Nilotinib ¹⁰⁷	26	22	–	50	35

–, non riportata nello studio; CCyR, risposta citogenetica completa; CP, fase cronica; MCyR, risposta citogenetica maggiore.
^a Numero di pazienti arruolato nello studio con i criteri considerati (fase cronica, fallimento del trattamento di prima linea con un inibitore di seconda generazione).
^b Lo studio ha arruolato solo pazienti resistenti a due linee di trattamento con inibitori di tirosin-chinasi.

Tabella 8 – Principali studi sul trattamento di seconda linea dopo trattamento iniziale con inibitori di seconda generazione.

stenza al nuovo farmaco impiegato sono comunque caratterizzati da un progressiva perdita di efficacia del trattamento⁽⁵⁾. È stato recentemente introdotto in terapia un nuovo tipo di inibitore di tirosin-chinasi, il ponatinib che lega il bersaglio molecolare, cioè la oncoproteina BCR-ABL, in un differente sito rispetto agli inibitori di prima e seconda generazione ed inibisce l'attività di questa con più elevata efficacia rispetto ai farmaci di precedente generazione⁽¹¹⁵⁾. Questo

farmaco inibisce sia le forme *wild type* che quelle mutate della proteina oncogenica BCR-ABL incluso quelle che hanno la mutazione tipo T315I, completamente resistenti a tutti gli altri 4 inibitori⁽¹¹⁵⁾. La probabilità di ottenere una CCyR in seconda linea di trattamento con ponatinib nei pazienti resistenti ad altri inibitori di seconda generazione incluso quelli con mutazione tipo T315I è del 60%^(12,116).

Bibliografia

1. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007;370(9584):342-50.
2. Bjorkholm M, Ohm L, Eloranta S, Derolf A, Hultcrantz M, Sjoberg J, et al. Success story of targeted therapy in chronic myeloid leukemia: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2008. *J Clin Oncol* 2011;29(18):2514-20.
3. Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, Garcia-Manero G, Quintas-Cardama A, Shan J, et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* 2012;119(9):1981-7.
4. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009;27(35):6041-51.
5. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013;122(6):872-84.
6. Pavlu J, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood* 2011;117(3):755-63.
7. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006;108(6):1809-20.
8. Talpaz M, Hehlmann R, Quintas-Cardama A, Mercer J, Cortes J. Re-emergence of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2013;27(4):803-12.
9. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348(11):994-1004.
10. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;362(24):2260-70.
11. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;362(24):2251-9.
12. Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM, Brummendorf TH, Dyagil I, Griskevicius L, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J Clin Oncol* 2012;30(28):3486-92.
13. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2012;367(22):2075-88.
14. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011;118(5):1208-15.
15. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 2010;11(11):1029-35.
16. Shami PJ, Deininger M. Evolving treatment strategies for patients newly diagnosed with chronic myeloid leukemia: the role of second-generation BCR-ABL inhibitors as first-line therapy. *Leukemia* 2012;26(2):214-24.
17. Efficace F, Baccarani M, Breccia M, Alimena G, Rosti G, Cottone F, et al. Health-related quality of life in chronic myeloid leukemia patients receiving long-term therapy with imatinib compared with the general population. *Blood* 2011;118(17):4554-60.
18. Valent P. Severe adverse events associated with the use of second-line BCR/ABL tyrosine kinase inhibitors: preferential occurrence in patients with comorbidities. *Haematologica* 2011;96(10):1395-7.
19. Steegmann JL, Cervantes F, le Coutre P, Porkka K, Saglio G. Off-target effects of BCR-ABL1 inhibitors and their potential long-term implications in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012;53(12):2351-61.
20. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol* 2012;87(11):1037-45.
21. Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwazer AP, Arthur C, Yeung DT, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 2013;122(4):515-22.
22. Interferon α -2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 1994;330(12):820-5.
23. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, Shan J, Giles FJ, Rios MB, et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer* 2003;97(4):1033-41.
24. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, Guerci A, Harousseau JL, Maloisel F, et al. Interferon α -2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N Engl J Med* 1997;337(4):223-9.
25. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, Mason PJ, van Rhee F, et al. Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 1996;87(4):1549-55.
26. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17(12):2318-57.
27. Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol* 1999;107(3):587-99.
28. Martiat P, Maisin D, Philippe M, Ferrant A, Michaux JL, Cassiman JJ, et al. Detection of residual BCR/ABL transcripts in chronic myeloid leukaemia patients in complete remission using the polymerase chain reaction and nested primers. *Br J Haematol* 1990;75(3):355-8.
29. Baccarani M, Pane F, Saglio G. Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2008;93(2):161-9.
30. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006;108(1):28-37.
31. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, Muller MC, Kaeda JS, Foroni L, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood* 2010;116(19):3758-65.
32. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006;355(23):2408-17.
33. Branford S, Seymour JF, Grigg A, Arthur C, Rudzki Z, Lynch K, et al. BCR-ABL messenger RNA levels continue to decline in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib for more than 5 years and approximately half of all first-line treated patients have stable undetectable BCR-ABL using strict sensitivity criteria. *Clin Cancer Res* 2007;13(23):7080-5.
34. Cross NC, White HE, Muller MC, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2012;26(10):2172-5.
35. Cross NC, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following

- treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2015;29(5):999-1003.
36. Vigil CE, Griffiths EA, Wang ES, Wetzler M. Interpretation of cytogenetic and molecular results in patients treated for CML. *Blood Rev* 2011;25(3):139-46.
 37. Deininger M, O'Brien S, Guilhot F, et al. International randomized study of interferon vs STI571 (IRIS) 8-year follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with Imatinib. *ASH Annual Meeting Abstracts Blood*. 2009;(22):1126.
 38. Hehlmann R, Muller MC, Lauseker M, Hanfstein B, Fabarius A, Schreiber A, et al. Deep molecular response is reached by the majority of patients treated with imatinib, predicts survival, and is achieved more quickly by optimized high-dose imatinib: results from the randomized CML-study IV. *J Clin Oncol* 2014;32(5):415-23.
 39. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344(14):1031-7.
 40. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;346(9):645-52.
 41. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2008;26 (20):3358-63.
 42. Cortes JE, Baccarani M, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Kim DW, et al. Phase III, randomized, open-label study of daily imatinib mesylate 400 mg versus 800 mg in patients with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase using molecular end points: tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity study. *J Clin Oncol* 2010;28(3):424-30.
 43. Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE, Guerci-Bresler A, Rigal-Huguet F, Ma-loisel F, et al. Imatinib plus peginterferon α -2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;363(26):2511-21.
 44. Radich JP, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Kamel-Reid S, Stock W, Malnassy G, et al. A randomized trial of dasatinib 100 mg versus imatinib 400 mg in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2012;120(19):3898-905.
 45. Gugliotta G, Castagnetti F, Palandri F, Breccia M, Intermesoli T, Capucci A, et al. Frontline imatinib treatment of chronic myeloid leukemia: no impact of age on outcome, a survey by the GIMEMA CML Working Party. *Blood* 2011;117 (21):5591-9.
 46. Kim D, Goh HG, Kim SH, Choi SY, Park SH, Jang EJ, et al. Comprehensive therapeutic outcomes of frontline imatinib mesylate in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia patients in Korea: feasibility assessment of current ELN recommendation. *Int J Hematol* 2012;96(1):47-57.
 47. Hehlmann R, Lauseker M, Jung-Munkwitz S, Leitner A, Muller MC, Pletsch N, et al. Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon-alpha in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29(12):1634-42.
 48. Cortes JE, Kantarjian HM, Goldberg SL, Powell BL, Giles FJ, Wetzler M, et al. High-dose imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: high rates of rapid cytogenetic and molecular responses. *J Clin Oncol* 2009;27 (28):4754-9.
 49. Hughes TP, Branford S, White DL, Reynolds J, Koelmeyer R, Seymour JF, et al. Impact of early dose intensity on cytogenetic and molecular responses in chronic-phase CML patients receiving 600 mg/day of imatinib as initial therapy. *Blood* 2008;112(10):3965-73.
 50. le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 2000;95(5):1758-66.
 51. Weisberg E, Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 2000;95 (11):3498-505.
 52. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000;96(3):1070-9.
 53. White DL, Radich J, Soverini S, Saunders VA, Frede AK, Dang P, et al. Chronic phase chronic myeloid leukemia patients with low OCT-1 activity randomized to high-dose imatinib achieve better responses and have lower failure rates than those randomized to standard-dose imatinib. *Haematologica* 2012;97(6):907-14.
 54. Angelini S, Soverini S, Ravegnini G, Barnett M, Turrini E, Thornquist M, et al. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica* 2013;98(2):193-200.
 55. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293(5531):876-80.
 56. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007;8(11):1018-29.
 57. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* 2002;62(15):4236-43.
 58. Rosti G, Palandri F, Castagnetti F, Breccia M, Levato L, Gugliotta G, et al. Nilotinib for the frontline treatment of Ph(+) chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009;114 (24):4933-8.
 59. Cortes JE, Jones D, O'Brien S, Jabbour E, Konopleva M, Ferrajoli A, et al. Nilotinib as front-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase. *J Clin Oncol* 2010;28(3):392-7.
 60. Kantarjian H, Pasquini R, Levy V, Jootar S, Holowiecki J, Hamerschlak N, et al. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R). *Cancer* 2009;115(18):4136-47.
 61. Jabbour E, Kantarjian HM, Saglio G, Steegmann JL, Shah NP, Boque C, et al. Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* 2014;123(4):494-500.
 62. Hjorth-Hansen H, Stenke L, Soderlund S, Dreimane A, Ehrencrona H, Gedde-Dahl T, et al. Dasatinib induces fast and deep responses in newly diagnosed chronic myeloid leukaemia patients in chronic phase: clinical results from a randomised phase-2 study (NordCML006). *Eur J Haematol* 2015;94(3):243-50.
 63. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS, et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* 2012;119(5):1123-9.
 64. Larson RA, Hochhaus A, Hughes TP, Clark RE, Etienne G, Kim DW, et al. Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow up. *Leukemia* 2012;26(10):2197-203.
 65. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984;63 (4):789-99.
 66. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon α . Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(11):850-8.
 67. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood* 2011;118(3):686-92.
 68. Branford S, Rudzki Z, Harper A, Grigg A, Taylor K, Durrant S, et al. Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon α plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia* 2003;17(12):2401-9.
 69. Wang L, Pearson K, Ferguson JE, Clark RE. The early molecular response to imatinib predicts cytogenetic and clinical outcome in chronic myeloid leukaemia.

- Br J Haematol 2003;120(6):990-9.
70. Marin D, Ibrahim AR, Lucas C, Gerrard G, Wang L, Szydlo RM, et al. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol* 2012;30(3):232-8.
 71. Hanfstein B, Muller MC, Hehlmann R, Erben P, Lauseker M, Fabarius A, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia* 2012;26(9):2096-102.
 72. Kagita S, Jiwtani S, Uppalapati S, Linga VG, Gundeti S, Digumarti R. Early molecular response in chronic myeloid leukemia patients predicts future response status. *Tumour Biol* 2014;35(5):4443-6.
 73. Hughes TP, Saglio G, Kantarjian HM, Guilhot F, Niederwieser D, Rosti G, et al. Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib. *Blood* 2014;123(9):1353-60.
 74. Marin D, Hedgley C, Clark RE, Apperley J, Foroni L, Milojkovic D, et al. Predictive value of early molecular response in patients with chronic myeloid leukemia treated with first-line dasatinib. *Blood* 2012;120(2):291-4.
 75. Akard LP, Cortes JE, Albitar M, Goldberg SL, Warsi G, Wetzler M, et al. Correlations between cytogenetic and molecular monitoring among patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: post hoc analyses of the Rationale and Insight for Gleevec High-Dose Therapy study. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(9):1186-92.
 76. El-Metnawy WH, Mattar MM, El-Nahass YH, Samra MA, Abdelhamid HM, Abdelfattah RM, et al. Predictive Value of Pretreatment BCR-ABL(IS) Transcript level on Response to Imatinib Therapy in Egyptian Patients with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia (CPCML). *Int J Biomed Sci* 2013;9(1):48-53.
 77. Deininger MW, Kopecky KJ, Radich JP, Kamel-Reid S, Stock W, Paietta E, et al. Imatinib 800 mg daily induces deeper molecular responses than imatinib 400 mg daily: results of SWOG S0325, an intergroup randomized PHASE II trial in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2014;164(2):223-32.
 78. Brummendorf TH KH, Gambacorti-Passerini C, et al. Assessment of early molecular response as a predictor of long-term clinical outcomes in the phase 3 BE-LEA study. *Blood* 2012;120(21):69.
 79. Yeung D, Osborn M, White D, et al. Upfront imatinib therapy in CML patients with rapid switching to nilotinib for failure to achieve molecular targets or intolerance achieves high overall rates of molecular response and a low risk of progression: an update of the TIDEL-II trial. *ASH Annual Meeting Abstracts Blood*. 2011;118(21):451
 80. Nazha A, Kantarjian H, Jain P, Romo C, Jabbour E, Quintas-Cardama A, et al. Assessment at 6 months may be warranted for patients with chronic myeloid leukemia with no major cytogenetic response at 3 months. *Haematologica* 2013;98(11):1686-8.
 81. Kim DD, Hamad N, Lee HG, Kamel-Reid S, Lipton JH. BCR/ABL level at 6 months identifies good risk CML subgroup after failing early molecular response at 3 months following imatinib therapy for CML in chronic phase. *Am J Hematol* 2014;89(6):626-32.
 82. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Chronic Myelogenous Leukemia, Version 1. National Comprehensive Cancer Network 2015.
 83. Cortes J, O'Brien S, Kantarjian H. Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response. *Blood* 2004;104(7):2204-5.
 84. Mauro MJ, Druker BJ, Maziarz RT. Divergent clinical outcome in two CML patients who discontinued imatinib therapy after achieving a molecular remission. *Leuk Res* 2004;28 (Suppl 1)S71-3.
 85. Merante S, Orlandi E, Bernasconi P, Calatroni S, Boni M, Lazzarino M. Outcome of four patients with chronic myeloid leukemia after imatinib mesylate discontinuation. *Haematologica* 2005;90(7):979-81.
 86. Mahon FX, Delbrel X, Cony-Makhoul P, Faberes C, Boiron JM, Barthe C, et al. Follow up of complete cytogenetic remission in patients with chronic myeloid leukemia after cessation of interferon α . *J Clin Oncol* 2002;20(1):214-20.
 87. Rousselot P, Huguet F, Rea D, Legros L, Cayuela JM, Maarek O, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* 2007;109(1):58-60.
 88. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini FE, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia who have maintained complete molecular response: update results of the STIM study. *ASH Annual Meeting Abstracts Blood*. 2011;118:603.
 89. Branford S, Yeung DT, Ross DM, Prime JA, Field CR, Altamura HK, et al. Early molecular response and female sex strongly predict stable undetectable BCR-ABL1, the criteria for imatinib discontinuation in patients with CML. *Blood* 2013;121(19):3818-24.
 90. Yhim HY, Lee NR, Song EK, Yim CY, Jeon SY, Shin S, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia who have received front-line imatinib mesylate therapy and achieved complete molecular response. *Leuk Res* 2012;36(6):689-93.
 91. Takahashi N, Kyo T, Maeda Y, Sugihara T, Usuki K, Kawaguchi T, et al. Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2012;97(6):903-6.
 92. Matsuki E, Ono Y, Tonegawa K, Sakurai M, Kunimoto H, Ishizawa J, et al. Detailed investigation on characteristics of Japanese patients with chronic phase CML who achieved a durable CMR after discontinuation of imatinib—an updated result of the Keio STIM study. *ASH Annual Meeting Abstracts Blood*. 2012;120:2788.
 93. Goh H-G, Choi S-Y, Bang J-H, Kim S-H, Jang E-J, Kim D, et al. Discontinuation of imatinib therapy in chronic myeloid leukemia patients with sustained complete molecular response 4.5 (CMR4.5). *ASH Annual Meeting Abstracts Blood*. 2011;118:2763.
 94. Rea D, Rousselot P, Guilhot F, Tulliez M, Nicolini FE, Guerci-Bresler A, et al. Discontinuation of second generation (2G) tyrosine kinase inhibitors (TKI) in chronic phase (CP)-chronic myeloid leukemia (CML) patients with stable undetectable BCR-ABL transcripts. *ASH Annual Meeting Abstracts Blood*. 2012;120:916.
 95. Oh Y, Choi S, et al. Discontinuation of BCR-ABL1 tyrosinekinase inhibitor in CML patients with undetectable molecular residual disease for at least 1 year: including updated data from KIDS study. 18th European Hematology Association Congress Abstracts 2013;4401.
 96. Marin D, Bazeos A, Mahon FX, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol* 2010;28(14):2381-8.
 97. Fullmer A, Kantarjian H, Cortes J, Jabbour E. Dasatinib for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* 2011;4(3):253-60.
 98. Aichberger KJ, Herndlhofer S, Scherthaner GH, Schillinger M, Mitterbauer-Hohendanner G, Sillaber C, et al. Progressive peripheral arterial occlusive disease and other vascular events during nilotinib therapy in CML. *Am J Hematol* 2011;86(7):533-9.
 99. Kim TD, Rea D, Schwarz M, Grille P, Nicolini FE, Rosti G, et al. Peripheral artery occlusive disease in chronic phase chronic myeloid leukemia patients treated with nilotinib or imatinib. *Leukemia* 2013;27(6):1316-21.
 100. de Lavallade H, Punnialingam S, Milojkovic D, Bua M, Khorashad JS, Gabriel IH, et al. Pleural effusions in patients with chronic myeloid leukaemia treated with dasatinib may have an immune-mediated pathogenesis. *Br J Haematol* 2008; 141(5):745-7.
 101. Montani D, Bergot E, Gunther S, Savale L, Bergeron A, Bourdin A, et al. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation* 2012;125(17):2128-37.
 102. Agostino NM, Chinchilli VM, Lynch CJ, Koszyk-Szewczyk A, Gingrich R, Sivik J, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitors (sunitinib, sorafenib, dasatinib, and imatinib) on blood glucose levels in diabetic and nondiabetic patients in general clinical practice. *J Oncol Pharm Pract* 2011;17(3):197-202.
 103. Kantarjian HM, Cortes JE, Kim DW, Khoury HJ, Brummendorf TH, Porkka K, et al. Bosutinib safety and management of toxicity in leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2014;123(9):1309-18.

104. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley J, Lipton J, Goldberg S, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 2008;22(6):1200-6.
105. Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, Rea D, Dorlhiac-Llacer PE, Milone JH, et al. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26(19):3204-12.
106. Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, Pinilla-Ibarz J, Larson RA, Gattermann N, et al. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow up results. *Blood* 2011;117(4):1141-5.
107. Ibrahim AR, Paliompeis C, Bua M, Milojkovic D, Szydlo R, Khorashad JS, et al. Efficacy of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) as third-line therapy in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase who have failed 2 prior lines of TKI therapy. *Blood* 2010;116(25):5497-500.
108. Khoury HJ, Cortes JE, Kantarjian HM, Gambacorti-Passerini C, Baccarani M, Kim DW, et al. Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure. *Blood* 2012;119(15):3403-12.
109. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Jones D, Nicaise C, O'Brien S, Giles F, et al. Dasatinib (BMS-354825) is active in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia after imatinib and nilotinib (AMN107) therapy failure. *Blood* 2007;109(2):497-9.
110. Giles FJ, le Coutre PD, Pinilla-Ibarz J, Larson RA, Gattermann N, Ottmann OG, et al. Nilotinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: 48-month follow up results of a phase II study. *Leukemia* 2013;27(1):107-12.
111. Nicolini FE, Mauro MJ, Martinelli G, Kim DW, Soverini S, Muller MC, et al. Epidemiologic study on survival of chronic myeloid leukemia and Ph(+) acute lymphoblastic leukemia patients with BCR-ABL T315I mutation. *Blood* 2009;114 (26):5271-8.
112. Garcia-Gutierrez J, Maestro B, Casado L, Perez-Encinas M, Massague I, de Paz R, et al. Outcomes of chronic myeloid leukemia (CML) Patients who stopped second generation tyrosine kinase inhibitors (2GTKIs) as second line treatment. Results of the CML Spanish National Registry (RELMC). *ASH Annual Meeting Abstracts*. *Blood* 2012;3764.
113. Cortes J, Quintas-Cardama A, Jabbour E, O'Brien S, Verstovsek S, Borthakur G, et al. The clinical significance of achieving different levels of cytogenetic response in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia after failure to front-line therapy: is complete cytogenetic response the only desirable endpoint? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11(5):421-6.
114. Lipton JH, Bryden P, Sidhu MK, Huang H, McGarry LJ, Lustgarten S, et al. Comparative efficacy of tyrosine kinase inhibitor treatments in the third-line setting, for chronic-phase chronic myelogenous leukemia after failure of second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Res* 2015;39(1):58-64.
115. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;110(7):2242-9.
116. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2013;369(19):1783-96.

Parole Chiave

Leucemia mieloide cronica, inibitori di tirosin chinasi, malattia minima residua, remissione libera da malattia

Indirizzi per la corrispondenza

Fabrizio Pane

U.O. Ematologia e Trapianti di Midollo
Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli
Università di Napoli Federico II
Via S. Pansini 5 - 80131 Napoli
Tel. (+39) 081 7462068 (+39) 081 7462037
Fax (+39) 081 7462165
E-mail: fabpane@unina.it

Leucemia linfatica cronica



Maria Ciccone, Antonio Cuneo

Azienda Ospedaliero-Universitaria Arcispedale Sant'Anna, Sezione di Ematologia, Ferrara

Introduzione

La leucemia linfatica cronica (LLC) rappresenta la forma di leucemia più comune tra la popolazione adulta dei paesi occidentali⁽¹⁾. Negli ultimi decenni, la disponibilità di più avanzate metodologie di indagine molecolare e numerosi studi clinici hanno dimostrato che la presenza nelle cellule leucemiche di specifici marcatori genetici o immunofenotipici è in grado di prevedere la sopravvivenza media dei pazienti affetti da LLC (marcatori prognostici)⁽²⁻⁵⁾.

Ancor più interessante è l'evidenza che alcuni di questi marcatori sono in grado di predire la probabilità di risposta a specifiche combinazioni di farmaci o a singole molecole ad azione anti-leucemica (marcatori predittivi)⁽⁶⁻⁸⁾. Questa osservazione suggerisce che in alcuni sottogruppi di pazienti la maggiore efficacia di alcune molecole possa essere determinata dalla loro abilità di interferire selettivamente o prevalentemente ripristinando la fisiologica trasduzione di segnale intracellulare che, ad esempio, alcune mutazioni genetiche alterano, promuovendo la trasformazione clonale ovvero l'espansione del clone leucemico^(3,9). Dunque, le spinte verso la ricerca di cure personalizzate, che mirano cioè alle specifiche anomalie biologiche delle cellule leucemiche, hanno promosso l'applicazione di nuovi trattamenti con farmaci "a bersaglio"^(6, 10-13). Grazie a studi clinici prospettici è stata verificata l'efficacia oltre che la sicurezza di queste nuove molecole biologiche che differiscono dalla chemioterapia convenzionale proprio in quanto in grado di colpire in maniera sufficientemente selettiva una specifica cascata di segnali cellulari. Questi nuovi farmaci sono riusciti non soltanto a prolungare il periodo libero da trattamento ma, per la prima volta nella storia della LLC, ad ottenere la negativizzazione della malattia minima residua (MRD) ed il prolungamento della sopravvivenza globale⁽¹⁴⁻¹⁵⁾.

Tuttavia, se da un lato la diffusione dei farmaci bersaglio ha rivoluzionato positivamente la possibilità di cura dei pazienti affetti da LLC, dal lato opposto ha fatto emergere alcuni limiti che cercheremo di approfondire nel corso di questa trattazione. Innanzitutto, le cellule di LLC sono frequentemente caratterizzate dalla presenza di più di una anomalia genetica o di espressione di superficie^(3, 16).

Le differenti anomalie genetiche possono comparire in fasi diverse durante il processo di trasformazione clonale, alcune insorgono precocemente e sono essenziali per la trasformazione leucemica (anomalie primarie)⁽¹⁷⁾, altre invece si rivelano più tardivamente e favoriscono la trasformazione pur non essendo cruciali (anomalie secondarie)^(18, 19). Teoricamente un farmaco bersaglio sarà tanto più efficace quanto maggiore sarà la sua capacità di agire sui meccanismi cellulari sottesi alle anomalie primarie (Figura 1). Inoltre, numerosi studi hanno provato, anche nella LLC, il fenomeno della selezione clonale: nei pazienti affetti da LLC sarebbero presenti alla diagnosi più cloni leucemici, ciascuno caratterizzato da una specifica anomalia e da una diversa sensibilità ai trattamenti farmacologici⁽²⁰⁾. Nel corso della storia naturale dei pazienti con LLC, dunque, i trattamenti anti-leucemici favorirebbero la selezione dei cloni più instabili e resistenti che spiegherebbe la maggiore difficoltà ad ottenere risposte profonde e durature nei pazienti refrattari o ricaduti dopo più linee di terapia^(19, 21, 22). La questione importante è capire se i farmaci-bersaglio potrebbero ulteriormente promuovere questa selezione clonale facilitando l'emergere dei sub-cloni più resistenti. Terzo, la lezione della leucemia mieloide cronica (LMC) insegna che l'efficacia dei farmaci bersaglio può essere superata dalla comparsa di mutazioni della proteina bersaglio che determinano la deformazione sterica della tasca di interazione con il farmaco, impedendo di fatto l'interazione farmaco bersaglio e dunque la possibilità di un effetto farmacologico⁽²³⁾. Inoltre, nelle cellule di LLC, diversamente da quelle di LMC ed in aggiunta al meccanismo di mutazione della proteina-bersaglio, è stato osservato un fenomeno noto come *antigenic shaving* con il quale ci si riferisce alla rasatura di espressione di specifici antigeni-bersaglio che rende inefficace l'ulteriore utilizzo del farmaco-bersaglio corrispondente⁽²⁴⁾.

Per ultimo, ma non meno importante, alcuni dei farmaci-bersaglio, pur essendo più tollerati rispetto alle chemioterapie convenzionali, richiedono una assunzione cronica da parte dei pazienti, idealmente sino a progressione di malattia^(10, 13). La durata cronica del trattamento oltre che i consistenti costi di produzione, l'elevata prevalenza

della LLC tra la popolazione adulta ed il prolungamento dell'aspettativa di vita hanno indotto a riflettere sui costi e quindi sull'impatto dei nuovi farmaci sui sistemi sanitari nazionali e sul rischio conseguente di esclusione, dall'utilizzo di questi nuovi farmaci, da parte di pazienti provenienti da paesi economicamente più svantaggiati. In aggiunta, ciascun farmaco-bersaglio possiede caratteristiche che ne facilitano l'impiego e, dall'altra parte, ciascuno di essi si associa a specifici profili di tossicità di cui tener conto nel momento della scelta di opzione terapeutica da offrire a ciascun paziente (Tabella 1). In conclusione, il trattamento con farmaci-bersaglio rappresenta una sfida unica nella quale la presenza di specifici marcatori biologici non solo consentirà di selezionare i pazienti affetti da LLC che realmente necessitano di essere trattati rispetto a quelli per cui la strategia *wait&watch* rappresenterà ancora la scelta più appropriata, ma permetterà di personalizzare il trattamento, individuando per ciascun sottogruppo, definito da uno specifico marcatore biologico, la molecola più efficace tra una consistente rosa di opzioni terapeutiche.

Anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali (*Monoclonal Antibody*, MAb) si distinguono per la loro capacità di riconoscere specifici antigeni espressi sulla superficie delle cellule leucemiche determinandone poi successivamente l'eliminazione attraverso l'induzione della morte cellulare. I MAb possono essere distinti in base alla loro origine (chimerici o completamente umanizzati), al tipo di anticorpo (di classe I o II), al tipo di antigene che riconoscono (CD20, CD56, etc). Ciascun MAb promuove la morte della cellula-bersaglio attraverso l'induzione della citotossicità anticorpo mediata (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC), della morte cellulare complemento mediata (*Complement mediated cytotoxicity*, CDC) o della morte diretta. Più recentemente sono stati costruiti anticorpi bi-specifici, che contengono cioè una porzione che riconosce un antigene espresso sulla superficie dei linfociti B-clonali ed una seconda porzione capace di agganciare i linfociti T favorendo la citolisi cellula T-mediata della cellula leucemica ⁽²⁵⁾.

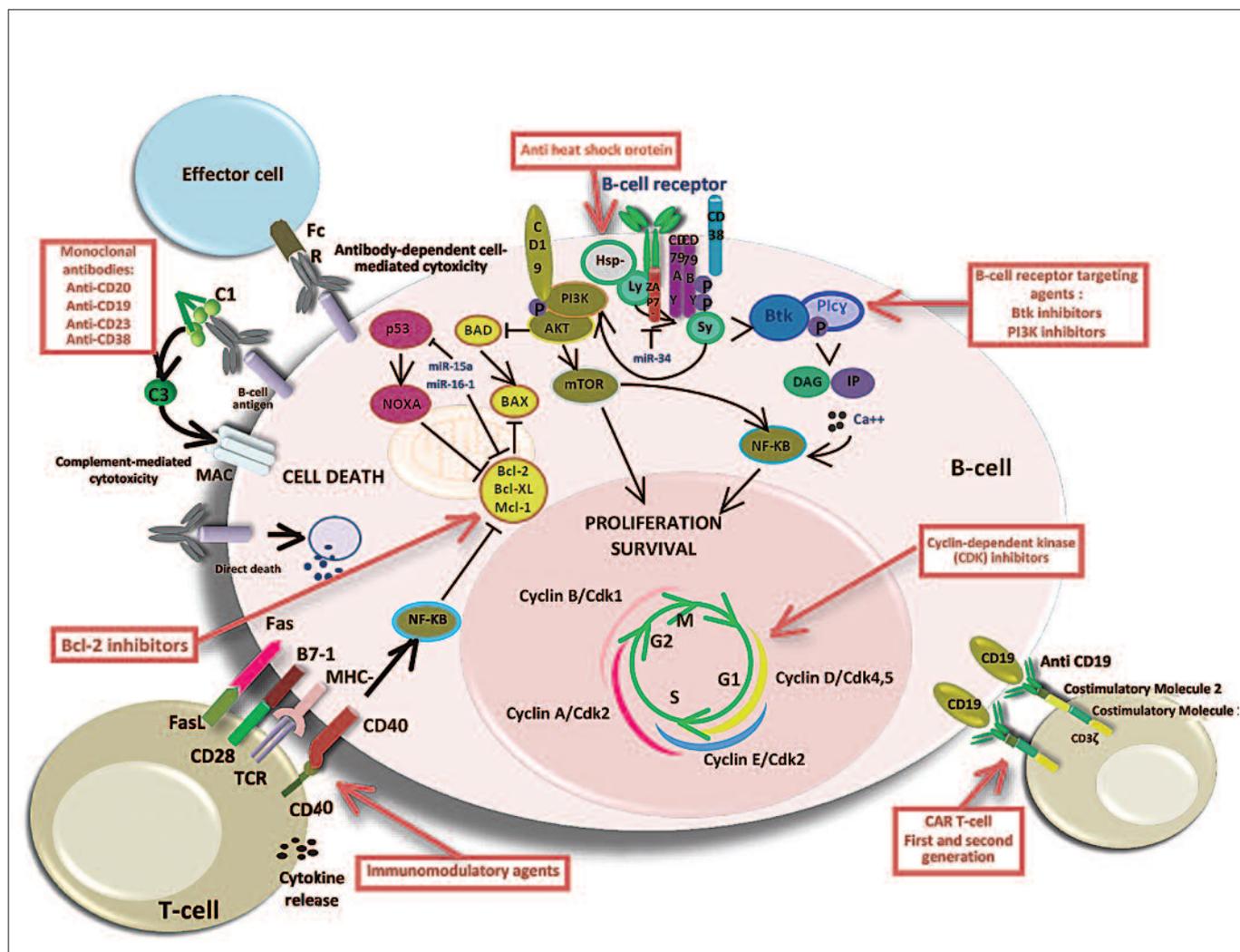


Figura 1 – Principali meccanismi molecolari dei farmaci-bersaglio utilizzati in pazienti affetti da LLC. I nuovi farmaci-bersaglio agiscono interferendo con numerosi meccanismi cellulari del linfocita B clonale oppure innescando la citotossicità mediata dal linfocita T e dalle cellule NK.⁽⁸⁰⁾

FARMACI BERSAGLIO	MECCANISMO DI AZIONE	PRO	CONTRO	TOSSICITÀ PIÙ COMUNE
Anticorpi monoclonali	ADCC, CDC, citolisi diretta	Dati di efficacia consolidati Monoterapia Ottimo profilo di tossicità	Somministrazione ev	Reazioni infusionali Neutropenia Riattivazione CMV *
Inibitori del segnale BCR	Interferenza con la cascata cellulare del BCR	Somministrazione per bocca Ottimo profilo di tossicità	Somministrazione cronica	Diarrea Sindrome da lisi tumorale
Anti-angiogenetici	Ripristino della sinapsi linfocita B-Linfocita T	Somministrazione per bocca Recupero della immunocompetenza	Sospetta aumentata incidenza di seconde neoplasie	<i>Tumor flair syndrome</i> Sindrome da lisi tumorale
Pro-apoptotici o inibitori ciclo cellulare	Promozione dell'apoptosi e inibizione del ciclo cellulare	Somministrazione per bocca	Dati clinici non ancora maturi	Piastrinopenia Sindrome da lisi tumorale
CAR-T	Citolisi	Alta specificità	Effetto transitorio Tecnologia complessa Mutagenesi	Reazioni infusionali Immunosoppressione

Abbreviazioni: ADCC, *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*; CDC, *complement dependent cytotoxicity*; e.v., endovenosa; BCR, *B-cell receptor*. (*con alemtuzumab)

Tabella 1 – Meccanismo d'azione, vantaggi e svantaggi dei farmaci bersaglio.

Il rituximab, un MAB chimerico, appartiene alla prima generazione di anticorpi monoclonali anti-CD20 che hanno trovato applicazione nel trattamento dei pazienti affetti da LLC (6, 26-30).

Lofatumumab e l'obinutuzumab (GA101) rappresentano invece la seconda generazione di anticorpi completamente umanizzati e si distinguono dal rituximab, il primo per la capacità di riconoscere un epitopo diverso del CD20, ed il secondo per l'aggiunta di un gruppo glucidico alla porzione costante dell'anticorpo (11,12).

La efficacia del rituximab in associazione alla chemioterapia è stata ampiamente dimostrato da numerosi studi clinici prospettici e randomizzati ed in pressoché tutte le categorie di pazienti affetti da LLC. Uno studio di fase 2 monocentrico condotto all'MD *Anderson Cancer Center* (MDACC) ha valutato per la prima volta l'efficacia e la sicurezza della combinazione del rituximab (R) con la fludarabina (F) e la ciclofosfamide (C) in 224 pazienti affetti da LLC e non precedentemente trattati (26). La remissione completa (RC) è stata osservata nel 70% dell'intera coorte, con una percentuale di risposta globale (remissione completa, risposta nodulare e risposta parziale) pari al 95%. In seguito, lo studio CLL8 del gruppo tedesco ha confermato gli impressionanti dati di efficacia dell'FCR confrontandolo con FC in uno studio prospettico randomizzato in cui si osservò che non solo la sopravvivenza libera da malattia (PFS) ma anche, e per la prima volta nella storia della LLC, la sopravvivenza globale (OS) sono significativamente migliorate dall'aggiunta del rituximab all'FC (PFS a 2 anni era 76,6% nel braccio FCR vs 62,3% nel braccio FC, $p = 0,01$; mentre la OS era 87% vs 83%, rispettivamente nel braccio FCR e FC) (6). Tuttavia, il trattamento con FCR aumenta il rischio di neutropenie severe e di infezioni (6, 31, 32) e non ha documentato significativa efficacia rispetto alla chemioterapia convenzionale nei pazienti con del (17p) (6).

Più recentemente, il gruppo dell'MDACC ha dimostrato che tra i pazienti trattati in prima linea con FCR coloro che progrediscono entro tre anni dal raggiungimento della remissione hanno sopravvivenze più brevi indipendentemente dal regime di salvataggio ricevuto (33). Quest'ultimo risultato rappresenta un dato interessante dal momento che solitamente si considera la progressione oltre i 24 mesi una indicazione al ritrattamento con lo stesso precedente regime (34). Gli ottimi risultati che l'aggiunta del rituximab ha permesso di ottenere in pazienti relativamente giovani e con buon *performance status*, ha indotto numerosi gruppi a valutare la possibilità di associare il rituximab a regimi chemioterapici meno tossici per valutarne l'efficacia tra la popolazione anziana che, a dire il vero, rappresenta la maggior parte dei pazienti affetti da LLC al momento della diagnosi (1). Foon et al hanno utilizzato uno schema che prevede la riduzione del 20% della fludarabina e della ciclofosfamide, rispetto all'originale FCR, con dosi incrementali e mantenimento con rituximab (FCR-*lite*). Con questo regime, la RC è stata ottenuta nel 77% dei pazienti, e la sua durata media è stata pari a 22,3 mesi (*range* da 5,2 a 42,5 mesi). Inoltre, la minore incidenza di neutropenia di grado 3/4 (13%) potrebbe in teoria rendere questo regime di chemioterapia più adatto alla popolazione anziana (35). Woyach et al hanno revisionato retrospettivamente i risultati degli studi del gruppo nordamericano CALGB (*Cancer and Leukemia Group B*) che includevano pazienti non precedentemente trattati, ed hanno osservato che, rispetto ai dati storici, la combinazione fludarabina con il rituximab è più efficace rispetto alla sola fludarabina, indipendentemente dall'età (36).

Molto interessanti sono i risultati di due studi indipendenti di fase 2 del gruppo cooperatore italiano (ML21445) e di quello inglese (CLL208) che hanno valutato l'efficacia e la tollerabilità dell'asso-

ciazione del clorambucile con il rituximab, rispettivamente con o senza mantenimento con rituximab ^(29,30). In entrambi gli studi l'età mediana era pari a 70 anni (aa) e le comorbidità aumentavano progressivamente con l'età. Nello studio ML21445, la risposta globale (ORR) era pari all'82,4% e non era influenzata dall'età anche se la maggior parte dei pazienti con età superiore ai 70 anni ha manifestato almeno un evento avverso nella fase di induzione ⁽³⁰⁾.

Simili risultati sono stati ottenuti nello studio inglese ⁽²⁹⁾. Questi due studi hanno rappresentato una importante novità nel panorama degli studi clinici riguardanti pazienti con LLC, dal momento che per la prima volta l'età mediana della popolazione-studio corrispondeva all'età mediana dei pazienti affetti da LLC nella vita reale. Questo è un punto cruciale, perché consente di poter applicare i risultati di questi studi alla corrente pratica clinica, che include pazienti al di fuori degli studi clinici.

La bendamustina (B), una molecola con caratteristiche intermedie tra gli alchilanti e gli analoghi purinici, ha dimostrato simili incoraggianti risultati in associazione con il rituximab ^(27, 28). Il gruppo tedesco GCLLSG (*German CLL Study Group*) ha condotto uno studio di fase 2 con BR in pazienti non precedentemente trattati registrando una ORR pari all'84,6% ed una PFS mediana di 37,6 mesi ⁽²⁷⁾. La tossicità di grado 3/4 è stata osservata in una piccola frazione di pazienti (7,7%) e la maggior parte degli effetti collaterali è stata di tipo ematologico. Lo stesso gruppo tedesco ha confrontato in uno studio di non-inferiorità i regimi FCR e BR includendo pazienti senza 17p-, di tutte le età e che fossero eleggibili a chemioimmunoterapia in relazione alla clearance della creatinina (ClCr) e le comorbidità misurate con lo score CIRS (*Cumulative Illness Rating Scale*) ⁽³⁷⁾.

Nonostante in pazienti con età inferiore ai 65 anni, il trattamento con FCR si associava a una più lunga PFS rispetto a BR (PFS mediana di FCR non raggiunta vs 36,5 mesi per BR, $p = 0,016$), non si è registrata alcuna differenza significativa tra quelli di età maggiore o uguale a 65 aa. Questi studi suggeriscono che il trattamento con BR può rappresentare una valida opzione terapeutica specie in pazienti anziani non candidabili a FCR ma eleggibili ad un trattamento che includa il rituximab ⁽³⁸⁾.

Gli anticorpi anti CD20 di nuova generazione hanno dimostrato simile, ed in alcuni casi superiore efficacia, rispetto al rituximab. Questi nuovi agenti, a differenza del rituximab, non stabilizzano la proteina CD20 all'interno delle cosidette *lipid rafts*, e persistono più a lungo sulla superficie dei linfociti B. Questo si traduce in una più facile interazione con il recettore della porzione Fc presente sulle cellule effettrici e quindi con una più potenziata ADCC. Inoltre, gli anticorpi monoclonali di tipo II sono capaci di indurre la morte diretta della cellula attraverso la riorganizzazione actina-dipendente del citoscheletro, determinando il rilascio dei radicali liberi e del contenuto lisosomiale ⁽³⁹⁾.

Se la ridotta stabilizzazione del CD20 all'interno dei *rafts* lipidici è

responsabile di una più potente ADCC, essa determina anche una più debole interazione con il fattore del complemento C1q e dunque una altrettanto meno potente CDC. Tuttavia, studi recenti *in vivo* sembrano suggerire che la maggiore attivazione della CDC da parte degli anticorpi di tipo I potrebbe diminuire progressivamente nel corso del trattamento a causa della aumentata espressione sulle cellule-bersaglio di fattori inibenti il complemento e sulla progressiva deplezione di proteine del complemento ⁽⁴⁰⁾.

L'ofatumumab è un anticorpo anti-CD20 umanizzato che riconosce un epitopo diverso rispetto a quello riconosciuto dal rituximab da cui consegue una maggiore affinità di legame, una più lenta dissociazione oltre che una più potente attività di CDC a fronte di simile potenza di ADCC.

L'ofatumumab è stato approvato dall'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) come trattamento in monoterapia in pazienti affetti da LLC che risultino refrattari alla fludarabina e all'alemtuzumab. Infatti, lo studio registrativo aveva incluso pazienti refrattari alla fludarabina o con malattia *bulky* (> 5 cm)⁽¹²⁾. In questa popolazione di pazienti con prognosi altamente sfavorevole, l'ofatumumab ha prodotto ORR pari al 51% nel gruppo di pazienti fludarabina-refrattari e al 44% nel gruppo con malattia *bulky*.

Curiosamente, l'efficacia dell'ofatumumab era indipendente dalla precedente esposizione al rituximab e dal rischio citogenetico come dimostrato dal 41% di risposte in pazienti refrattari alla fludarabina e all'alemtuzumab con del (17p)⁽¹²⁾.

Studi successivi hanno valutato la combinazione dell'ofatumumab con la chemioterapia convenzionale. In uno studio di fase 2, sono state valutate l'efficacia e la tollerabilità di due dosi di ofatumumab (500 mg e 1000 mg), in associazione con la fludarabina e la ciclofosfamide (O-FC) in 61 pazienti con LLC non precedentemente trattati, di cui il 13% con caratteristiche citogenetiche di alto rischio (17p-) e il 64% con livelli di $\beta 2$ -microglobulina $> 3,5$ mg/l. Il numero di RC è stato maggiore nei pazienti trattati con 1000 mg rispetto a quelli trattati con 500 mg (50% vs 32%) anche se non è stato possibile valutare l'eventuale beneficio in termine di PFS a causa di un corto follow up. La neutropenia ha rappresentato la tossicità di grado 3/4 più comune ⁽⁴¹⁾.

Nello studio multicentrico di fase 3 (complement I), l'associazione di ofatumumab (300 mg al giorno 1 e 1000 mg al giorno 8 del ciclo 1, in seguito 1000 mg al giorno 1 dei cicli 2-8) con il clorambucile (Clb) (10 mg/mq giorni 1-7 ogni 28 giorni) ha prolungato la PFS rispetto al clorambucile somministrato in monoterapia (22,4 vs 13,1 mesi, $p < 0,001$) in pazienti non precedentemente trattati ⁽⁴²⁾. La maggior parte dei pazienti aveva più di 65 anni (69%) ed almeno 2 comorbidità (70-73%). La ORR e le RC erano significativamente maggiori nel braccio Ofa+Clb rispetto al solo Clb (82 vs 69%, $p = 0,001$, e CR 12 vs 1%, rispettivamente). Con una mediana di follow up di 29 mesi, la OS mediana non era stata ancora raggiunta in entrambi i bracci ⁽⁴²⁾.

Un altro anticorpo monoclonale di seconda generazione ha superato con successo le fasi cliniche di sperimentazione. L'obinutuzumab, anche noto come GA101, è un anticorpo anti-CD20 umanizzato glicoingegnerizzato di tipo 2 che ha mostrato una più potente capacità di indurre sia la morte diretta delle cellule bersaglio che l'ADCC. Il gruppo tedesco GCLLSG ha recentemente pubblicato i risultati di uno studio multicentrico di fase 3 che ha confrontato tre bracci di trattamento: Clb, Clb+rituximab e Clb+obinutuzumab ⁽¹¹⁾.

I bracci dello studio randomizzato includevano esclusivamente pazienti con significative comorbidità (CIRS >6) o una clearance della creatinina (ClCr) compresa tra 30 e 69 ml/min. L'età mediana è stata di 73 anni, la ClCr mediana era di 62 ml/min, e lo score CIRS mediano al baseline era pari a 8. In generale, le caratteristiche cliniche dei pazienti inclusi in questo studio erano rappresentative della popolazione anziana affetta da LLC al di fuori di studi clinici ⁽¹⁾.

L'aggiunta dell'obinutuzumab al clorambucile ha migliorato significativamente la percentuale di pazienti con risposte clinicamente significative, il numero di pazienti che raggiungevano la negatività della malattia minima residua (MRD) e, per la prima volta in questa tipologia di pazienti, la durata della sopravvivenza mediana.

La combinazione di obinutuzumab o di rituximab con il clorambucile era associata ad un maggior rischio di neutropenia o, come prevedibile, di reazioni infusionali ⁽¹¹⁾. La superiorità della combinazione clorambucile obinutuzumab era evidente anche rispetto al braccio clorambucile e rituximab in termini di sopravvivenza libera da progressione, un dato confermato da un'analisi effettuata dopo un follow up più lungo, che ha evidenziato una PFS di 29,2 mesi vs 15,4 mesi (HR 0,40, 95% p <0,001) e un tempo al successivo trattamento di 42,7 mesi vs 32,7 mesi (HR 0,54, p <0,001) ⁽⁴³⁾.

In aggiunta agli anticorpi monoclonali che riconoscono come bersaglio il CD20, tra i pazienti con LLC possono trovare limitata applicazione anche anticorpi monoclonali diretti contro altri antigeni di superficie. L'alemtuzumab (Mab-Campath 1H) è un anticorpo monoclonale che riconosce il CD52 fortemente espresso sulle cellule di LLC. Questo anticorpo ha mostrato di essere in grado di indurre risposte sia in pazienti non precedentemente trattati (83-87% di ORR, 19-24% di CR) che in pazienti refrattari e/o ricaduti (33%-34% di ORR, 2-4% di CR) ⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾.

Lo studio CALGB 19901 prevedeva il consolidamento con Mab-Campath-1H (somministrato per via endovenosa o sottocutanea alla dose di 30 mg per 3 volte alla settimana per 6 settimane) in pazienti che dopo trattamento con fludarabina fossero in malattia stabile o avessero ottenuto almeno una PR ⁽⁴⁸⁾. Il consolidamento con Mab-Campath-1H migliorava significativamente le risposte oggettive, ma senza tradursi in un beneficio di sopravvivenza ⁽³⁶⁾. Al contrario, uno studio di fase 3 ha dimostrato che in pazienti non precedentemente trattati, il trattamento in monoterapia con alemtuzumab allungava la PFS (14,6 vs 11,7 mesi) ed il numero di risposte MRD negative rispetto al solo clorambucile ⁽⁴⁷⁾. Tuttavia, l'azione fortemente im-

munosoppressiva di questo farmaco e l'aumentato rischio di riattivazioni di infezioni da CMV, limitano di fatto il suo impiego ai pazienti con caratteristiche citogenetiche sfavorevoli (del 17p) in cui il trattamento con regimi contenenti-fludarabina ha dato risultati deludenti ⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾.

Infatti, in questo sottogruppo di pazienti la combinazione di alemtuzumab (30 mg 3 volte/settimana) e metilprednisolone ad alte dosi (1,0 g/mq per 5 giorni consecutivi ogni 4 settimane), ha determinato buone risposte e prolungamento della sopravvivenza libera da progressione rispetto ai dati storici in pazienti non trapiantati (ORR, RC, PFS e OS mediane rispettivamente pari a 85%, 36%, 11,8 mesi e 23,5 mesi) nonostante un 5% di mortalità associata al trattamento e la comparsa di infezioni severe (grado 3/4) nella metà della popolazione-studio costituita da 39 pazienti con 17p- con nessuna o più linee di precedenti trattamenti ⁽⁴⁹⁾. Occorre segnalare che l'introduzione dei nuovi farmaci ibrutinib e idelalisib in questo sottogruppo citogenetico di pazienti rappresenta oggi un trattamento di scelta (vide infra).

Infine, negli ultimi anni, risultati interessanti sono stati registrati in studi preclinici e di fase 1-2 con nuovi monoclonali somministrati come agenti singoli o in combinazione con chemioterapia. Tra tutti ricordiamo gli anti-CD40 che, peraltro, studi *in vitro* hanno dimostrato essere capaci di sensibilizzare le cellule di LLC all'azione degli anti-CD20, fornendo il razionale per un uso combinato ^(50,51).

Un altro anticorpo che attualmente è in fase di sperimentazione clinica è l'anticorpo anti-CD37 (otlertuzumab o TRU-016) il quale riconosce un antigene linea-specifico che è espresso pressochè esclusivamente dai linfociti B maturi normali e di LLC o linfoma non-Hodgkin ⁽⁵²⁾.

Purtroppo alcuni di questi anticorpi monoclonali non hanno confermato in fase di sperimentazione clinica l'efficacia suggerita dagli studi preclinici. Per esempio, lo studio randomizzato di fase 2/3 LUCID che confrontava FCR con o senza lumiliximab, un anticorpo chimerico anti-CD23, è stato interrotto anticipatamente per assenza di beneficio nel braccio che prevedeva l'aggiunta del farmaco sperimentale ⁽⁵³⁾.

Inibitori della trasduzione del segnale

L'attivazione delle immunoglobuline di superficie (*B-cell receptor*, BCR) da parte dell'antigene determina una cascata di eventi cellulari che sono responsabili dell'attivazione del linfocita B e della risposta contro l'antigene. Tuttavia, la trasduzione di questo segnale gioca un ruolo molto importante anche nella patogenesi della LLC ⁽⁵⁴⁾ ed è mediato da due chinasi: la Bruton tirosin-chinasi (Btk), il cui gene mutato causa la cosiddetta agammaglobulinemia di Bruton o *X-linked* agammaglobulinemia, e la fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3Kδ), la cui isoforma delta è altamente espressa nel tessuto linfoide e nelle cellule di LLC ⁽⁵⁵⁾.

Il ruolo cruciale di queste due chinasi è confermato dai risultati,

ormai consolidati, dei farmaci che specificatamente ne determinano lo spegnimento (inibitori).

L'ibrutinib, un inibitore orale covalente della Btk, è stato approvato dalla FDA nel febbraio 2014 per il trattamento di pazienti con LLC che abbiano ricevuto almeno un trattamento precedente, sulla scorta dei dati di Byrd et al che hanno dimostrato una sopravvivenza libera da progressione pari al 75% a 26 mesi in una serie di pazienti pesantemente pre-trattati⁽¹⁰⁾ ed un vantaggio in termini di sopravvivenza rispetto a ofatumumab in un trial randomizzato⁽⁵⁶⁾.

Numerosi studi hanno dimostrato risultati incoraggianti con l'impiego dell'ibrutinib in tutte le categorie di pazienti con percentuali impressionanti di risposte cliniche anche nei pazienti con del17p dove la somministrazione in monoterapia di ibrutinib ha prodotto il 97% e l'80% di risposte oggettive, rispettivamente in pazienti non precedentemente trattati e ricaduti/refrattari, pur non essendo stata registrata alcuna RC ad un follow up mediano di 24 mesi⁽⁸⁾.

Il farmaco è somministrato per bocca alla dose di 420 mg/die, sino a progressione di malattia o alla comparsa di tossicità severa ed induce tipicamente nelle prime settimane di assunzione un incremento della linfocitosi che è attribuito all'effetto di spremitura dei linfonodi⁽¹⁰⁾. Nelle successive 4-6 settimane la linfocitosi si risolve progressivamente anche se in alcuni pazienti sembra avere una durata maggiore pur non rappresentando, in questo caso, un fattore prognostico sfavorevole^(56,57). Il profilo di tossicità di questo farmaco, solitamente moderato ed autolimitantesi, lo ha reso molto adatto alla popolazione anziana che come detto in precedenza rappresenta una porzione consistente dei pazienti affetti da LLC^(57,58). Attenzione va posta in relazione alla possibile insorgenza di fibrillazione atriale fino all'8% dei pazienti⁽⁵⁹⁾ a causa di un effetto *off-target* sulla proteina chinasi TEC⁽⁶⁰⁾ e di sanguinamento a causa di un'inibizione dell'aggregazione piastrinica⁽⁶²⁾.

Più recentemente, si sta valutando l'efficacia e la sicurezza dell'associazione di ibrutinib con anticorpi monoclonali o chemioterapia^(62,63). Purtroppo, la comparsa di mutazioni a carico del gene della Btk può essere responsabile dell'insorgenza di resistenze e del fallimento del trattamento con ibrutinib⁽⁶⁴⁾.

In uno studio di fase 3 in pazienti con malattia ricaduta, è stata valutata l'efficacia della combinazione dell'inibitore orale della PI3K idelalisib con il rituximab⁽¹³⁾. In questo studio, 220 pazienti sono stati randomizzati a due bracci di cui uno prevedeva l'associazione rituximab (375 mg/m² al ciclo 1, e poi 500 mg/m² ai cicli 1-7) e idelalisib (150 mg BID) e l'altro rituximab e placebo.

Il 78% dei pazienti aveva una età ≥ 65 aa, ed aveva almeno una moderata insufficienza renale (ClCr < 60 ml/min) ed il 35% aveva insufficienza midollare (anemia, piastrinopenia o neutropenia di grado 3/4). Inoltre, l'85% dei pazienti aveva un numero di comorbidità CIRS ≥ 6 . L'81% dei pazienti ha raggiunto una risposta e nessuna differenza è stata osservata nei pazienti con età < 65 o ≥ 65 aa⁽¹³⁾. In

seguito, uno studio di fase 2, i cui risultati sono stati presentati preliminarmente al meeting IWCLL 2013, ha dimostrato che il 97% dell'intera coorte di studio ed il 100% dei pazienti con del (17p) ottenevano almeno una risposta parziale. La sopravvivenza libera di progressione mediana era pari a 19,4 mesi⁽⁶⁵⁾. Tra gli effetti collaterali meritano menzione la diarrea e la colite infiammatoria che può comparire tardivamente nel 3% dei casi e quadri di polmonite interstiziale (6% dei casi) a genesi poco chiara che richiede diagnosi differenziale con la polmonite batterica e pronto trattamento con steroidi⁽¹³⁾.

Agenti inducenti l'apoptosi e inibitori delle proteine del ciclo cellulare

La famiglia Bcl-2 include diverse proteine alcune delle quali ad azione pro-apoptotica ed altre invece in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare. BAX e BAK svolgono azione proapoptotica; al contrario BCL-2, BCL-XL, BCL-w, MCL-1 hanno tipicamente un effetto antiapoptotico. Le cellule di LLC esprimono alti livelli di Bcl-2 in parte a causa della mancata repressione da parte dei microRNA miR-15a e miR-16-1 che sono frequentemente deleti in pazienti con del (13q)⁽⁴⁾. Cellule di LLC con più alti livelli di proteina Bcl-2 sopravvivono più a lungo in coltura rispetto a quelle cellule con più bassa espressione⁽⁶⁶⁾. Con queste premesse, sono stati testati in pazienti affetti da LLC molecole in grado di contrastare l'azione della proteina Bcl-2. Mentre l'uso di un oligonucleotide antisense, oblimersen, non sembra aver prodotto alcun vantaggio di sopravvivenza⁽⁶⁷⁾, l'antagonista di Bcl-2 ABT-263 (navitoclax) sembra aver dato risultati più promettenti, anche se la comparsa di piastrinopenia causata dalla neutralizzazione di BCL-XL⁽⁶⁸⁾ e di sindrome da lisi tumorale severe hanno rallentato il processo di sperimentazione clinica⁽⁶⁹⁾. Più recentemente è stata dimostrata una notevole efficacia di ABT-199, che non determina piastrinopenia e produce oltre l'80% di risposte in fase avanzata di malattia. Attualmente questa molecola è in sperimentazione di fase 3 nel *trial* CLL14 del GCLLSG che paragona nel paziente *unfit* la combinazione clorambucile e l'obinutuzumab con ABT-199 e obinutuzumab⁽⁷⁰⁾. Il flavopiridol, un inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti, ha mostrato alcuni risultati incoraggianti, ma l'insorgenza di sindrome da lisi tumorale ne ha rallentato lo sviluppo anche se la sua associazione con agenti immunomodulanti, lenalidomide o rituximab^(71,72) sembra ridurre il rischio di insorgenza di sindrome da lisi tumorale di grado severo osservati in pazienti trattati con flavopiridolo come agente singolo⁽⁷³⁾.

Chimeric antigen receptor-modified T cells

L'ultima frontiera nel trattamento dei disordini linfoproliferativi è rappresentata da cellule T modificate che esprimono sulla propria superficie dei recettori che sono in grado di riconoscere specifici antigeni sulla superficie del linfocita B (solitamente il CD19) e con-

temporaneamente contengono molecole co-stimolatorie ed una frazione del recettore del linfocita T (TCR). Praticamente, i linfociti T autologhi del paziente vengono trasdotti con il metodo di infezione retrovirale, in modo che esprimano più o meno stabilmente il recettore chimerico. Questi linfociti T CAR (*chimeric antigen receptors*), dunque, sono potenzialmente in grado di riconoscere i linfociti B leucemici inducendo la morte linfocita T-mediata. La capacità dei T CAR di riconoscere specifici antigeni di superficie e la possibilità di potenziare la reazione T-mediata attraverso l'aggiunta di molecole co-stimolatorie rende questa procedura altamente innovativa. I limiti scaturiscono dal rischio di mutagenesi secondario a transfezione con retrovirus ricombinanti e dalla non ottimale stabilizzazione della trasduzione del recettore chimerico. Quest'ultimo problema sembra essere migliorato dall'uso di lentivirus in sostituzione dei retrovirus. Porter et al per primi hanno usato dei CAR in un paziente con LLC che raggiunse la remissione completa dopo aver sviluppato una sindrome da lisi tumorale e una tossicità di grado 3/4 ematologica (linfopenia e ipogammaglobulinemia)⁽⁷⁴⁾. Kalos et al hanno trattato 3 pazienti con LLC refrattaria a chemioterapia con una seconda generazione di linfociti T CAR+CD19-specifici. I CART-19 erano cellule autologhe trasdotte con un lentivirus che esprimevano il recettore chimerico comprendente il CD3, la molecola costimolatoria zand 4-1BB e che riconoscevano il CD19 sulle cellule di LLC. Tutti e tre i pazienti avevano ricevuto numerose linee di terapia, avevano la del (17p) e presentavano linfadenome-

galie diffuse ed estesa infiltrazione midollare. Le CART-19 sono state infuse in 3 giorni per ridurre il rischio di tempesta citochinica osservata in precedenza nei pazienti trattati con una unica infusione. In tutti e tre i pazienti si è registrata un'ottima risposta clinica (2 RC ed una RP). E rispetto agli studi precedenti questi Autori sono stati in grado di avere una maggiore espansione *in vivo* dei T CAR+ ed una persistenza superiore ai 6 mesi⁽⁷⁵⁾.

Conclusioni

L'impiego di farmaci-bersaglio (le cui principali schedule di somministrazioni sono riassunte nelle Tabelle 2 e 3) ha rappresentato una svolta nel trattamento della LLC per le seguenti ragioni:

- ha migliorato le percentuali di risposte cliniche oggettive e di sopravvivenza libera da trattamento determinando, in alcuni casi, anche benefici in termini di sopravvivenza globale e di negativizzazione della malattia minima residua, risultati mai ottenuti con le terapie tradizionali;
- ha permesso di trattare più agevolmente pazienti anziani o con comorbidità che rappresentano la maggior parte dei pazienti affetti da LLC nella popolazione non inclusa negli studi clinici;
- ha permesso di ottenere sopravvivenze libere da progressione prolungate nella maggior parte dei pazienti in fase avanzata di malattia e refrattari alla fludarabina indipendentemente dalla presenza di lesioni genetiche sfavorevoli, quali la delezione 17 o la mutazione di TP53;

FARMACO	DOSE	N° DOSI TOTALI O CICLI	REFERENZA
Ofatumumab	300 mg ev g 1 + 1000 mg g 8 ciclo 1; 1000 mg g 1 cicli 2-6 300 mg ev g 1, w +1; 2000 mg/settimana w 2-8; 2000 mg ogni 4 settimane w 9-16	6 12	Wierda et al ⁽⁴¹⁾ Byrd et al ⁽¹⁰⁾
Obinotuzumab	1000 mg ev g 1,8 e 15 ciclo 1 e g 1 cicli 2-6	6	Goede et al ⁽¹¹⁾
Mabcampath-1H	30 mg ev per 3 volte/settimana per 6 settimane 10-20 mg gg 1-3 per 6 cicli	18 18	Byrd et al ⁽⁴⁸⁾ Montillo et al ⁽⁷⁶⁾
Ibrutinib	420 mg/die po	(sino a progressione o tossicità non tollerabile)	Byrd et al ⁽⁵⁷⁾ O'Brien ⁽⁵⁸⁾
Idelalisib	Idelalisib 150 mg BID (or 300 mg BID) po	8	Furman et al ⁽¹³⁾

BID= bi-somministrazione giornaliera; ev = endovenosa; po = per bocca; sc = sotto cute.

Tabella 2 – Schedule di somministrazione dei farmaci-bersaglio approvati per uso clinico.

● ha facilitato la comprensione dei meccanismi biologici che sostengono il processo di trasformazione e di espansione clonale. Tuttavia, la disponibilità di queste nuove molecole ed i risultati incoraggianti di efficacia non supportano al momento il trattamento di pazienti con LLC che non abbiano segni di malattia attiva ⁽⁷⁷⁾.

Infine, sono necessari ulteriori studi clinici e più lunghi follow up per confermare gli ottimi risultati di efficacia e di sicurezza dimostrati sino ad ora da questi nuovi farmaci, il cui possibile collocamento nelle scenario terapeutico di prima linea odierno è rappresentato in Figura 2.

ASSOCIAZIONE DI FARMACI	DOSE	DURATA CICLO (GIORNI)	N° CICLI	REFERENZA
FCR	Fludarabina ev 25 mg/mq gg 1-3 Ciclofosfamide ev 250 mg/mq gg 1-3 Rituximab ev 375 mg/mq g 0, ciclo 1; 500 mg/mq g 1, cicli 2-6	28	6	Hallek et al ⁽⁶⁾
FCR-lite	Fludarabina ev 20 mg/mq gg 1-3 Ciclofosfamide ev 150 mg/mq gg 1-3 Rituximab ev 375 mg/mq g 0, ciclo 1; 500 mg/mq g 1, cicli 2-6	28	6	Foon et al ⁽³⁵⁾
BR	Bendamustina ev 70 mg/mq g 1-2 Rituximab ev 375 mg/mq g 0 ciclo 1, 500 mg/mq giorno 1 ciclo 2-6	28	6	Fisher et al ⁽²⁸⁾
OFC	Ofatumumab ev 300 mg g 1 ciclo 1, 1000 mg g 8 ciclo 1 e g 1 cicli 2-6 Fludarabina ev 25 mg/mq gg 1-3 Ciclofosfamide ev 250 mg/mq gg 1-3	28	6	Wierda et al ⁽⁴¹⁾
Ofa-C1b	Ofatumumab ev 300 mg g 1 ciclo 1, 1000 mg g 8 ciclo 1 e g 1 cicli 2-8 Clorambucile po 10 mg/mq/die gg 1-7, ciclo 1-6	28	8	Hillmen et al ⁽⁴²⁾
R-C1b	1) Rituximab ev 375 mg/mq g 0, ciclo 1; 500 mg/mq g 1, cicli 2-6 Clorambucile po 0.5 mg/kg gg 1 e 15	28	6	Goede et al ⁽¹¹⁾
	2) Rituximab ev 375 mg/mq g 1, ciclo 3; 500 mg/mq g 1, cicli 4-8* Clorambucile po 8 mg/mq/die gg 1-7 cicli 1-8	28	6 8(+12)*	Foà et al. ⁽³⁰⁾
	3) Rituximab ev 375 mg/mq g 0, ciclo 1; 500 mg/mq g 1, cicli 2-6 Clorambucile po 10 mg/mq/die gg 1-7, ciclo 1-6	28	6	Hillmen et al ⁽²⁹⁾
O-C1b	Obinotuzumab ev 1000 mg g 1,8 e 15 ciclo 1 e g 1 cicli 2-6 Clorambucile po Clorambucile 0.5 mg/kg gg 1 e 15	28	6	Goede et al ⁽¹¹⁾
FLUCAM	Fludarabina ev 40 mg/mq gg 1-3 Ciclofosfamide ev 250 mg/mq gg 1-3 MabCampath sc 10-20 mg gg 1-3	28	6	Montillo et al ⁽⁷⁶⁾
R-Idelalisib	Rituximab ev 375 mg/mq g 1, ciclo 1; 500 mg/mq g 1, cicli 2-8 Idelalisib po 150 mg bid (or 300 mg bid)	14 cicli 1-5; 28 cicli 6-8	8	Furman et al ⁽¹³⁾

* Nello studio ML21445 era prevista anche una randomizzazione al mantenimento con rituximab alla dose di 375 mg/mq ogni 8 settimane per 12 dosi totali. BID, Bi-somministrazioni giornaliera; ev: endovenosa; po, per bocca; sc, sotto cute. § La lenalidomide è stata somministrata sino a progressione di malattia o tossicità massima tollerabile.

Tabella 3 – Schedule di associazioni contenenti farmaci-bersaglio.

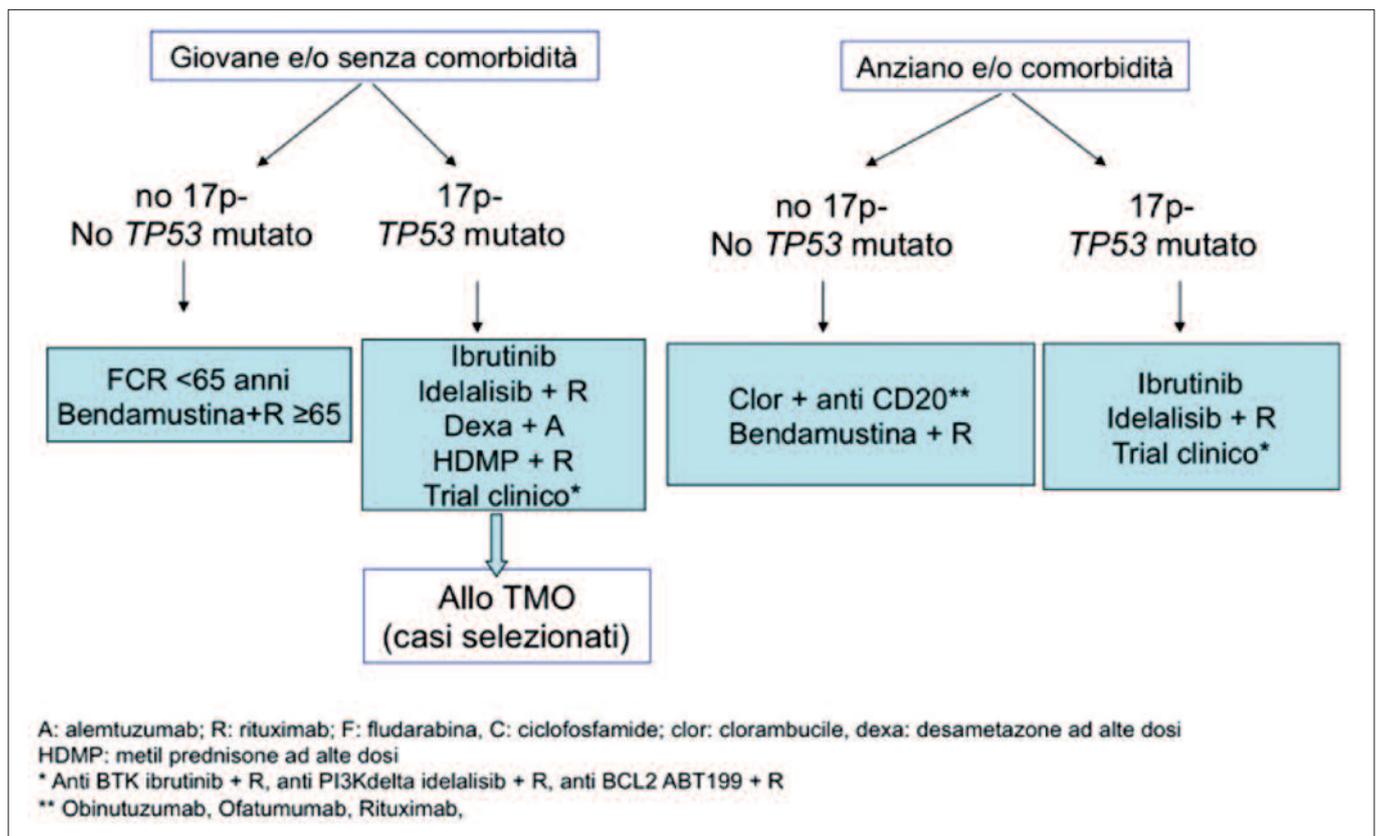


Figura 2 – Possibile ruolo della terapia bersaglio nell’algoritmo terapeutico di prima linea della LLC (Ematologia in Progress <http://www.ematologiainprogress.it/leucemia-linfatica-cronica>).

Bibliografia

- Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1999;86(12):2684-2692.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2000;343(26):1910-1916.
- Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2011;365(26):2497-2506.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2005;353(17):1793-1801.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2003;348(18):1764-1775.
- Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-1174.
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2004;351(9):893-901.
- Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(2):169-176.
- Woyach JA, Bojnjk E, Ruppert AS, Stefanovski MR, Goettl VM, Smucker KA, et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2014;123(8):1207-1213.
- Byrd JC, O'Brien S, James DF. Ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2013;369(13):1278-1279.
- 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 Eng J Med*. 2014;370(12):1101-1110.
- 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):1749-1755.
- Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med*. 2014;370(11):997-1007.
- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2013;88(9):803-816.
- Cuneo A, Cavazzini F, Ciccone M, Daghia G, Sofritti O, Saccenti E, et al. Modern treatment in chronic lymphocytic leukemia: impact on survival and efficacy in high-risk subgroups. *Cancer Med*. 2014;3(3):555-564.
- Landau DA, Wu CJ. Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome medicine*. 2013;5(5):47.
- Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer discovery*. 2014;4(9):1088-1101.
- Lopez C, Delgado J, Costa D, Villamor N, Navarro A, Cazorla M, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: analysis of correlations with IGHV mutational status, NOTCH1 mutations and clinical significance. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2013;52(10):920-927.
- Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia.

- Cell. 2013;152(4):714-726.
20. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-105.
 21. Puente XS, Lopez-Otin C. The evolutionary biography of chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*. 2013;45(3):229-31.
 22. Rigolin GM, Saccetti E, Rizzotto L, Ferracin M, Martinelli S, Formigaro L, et al. Genetic subclonal complexity and miR125a-5p down-regulation identify a subset of patients with inferior outcome in low-risk CLL patients. *Oncotarget*. 2014;5(1):140-149.
 23. Fama R, Bomben R, Rasi S, Dal Bo M, Ciardullo C, Monti S, et al. Ibrutinib-naïve chronic lymphocytic leukemia lacks Bruton tyrosine kinase mutations associated with treatment resistance. *Blood*. 2014;124(25):3831-3833.
 24. Beers SA, French RR, Chan HT, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood*. 2010;115(25):5191-5201.
 25. Loffler A, Gruen M, Wüchter C, Schriever F, Kufer P, Dreier T, et al. Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bi-specific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Leukemia*. 2003;17(5):900-909.
 26. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clinical Oncol*. 2005;23(18):4079-4088.
 27. Fischer K, Cramer P, Busch R, Bottcher S, Bahlo J, Schubert J, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clinical Oncol*. 2012;30(26):3209-3216.
 28. Fischer K, Cramer P, Busch R, Stilgenbauer S, Bahlo J, Schweighofer CD, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clinical Oncol*. 2011;29(26):3559-3566.
 29. Hillmen P, Gribben JG, Follows GA, Milligan D, Sayala HA, Moreton P, et al. Rituximab plus chlorambucil as first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia: Final analysis of an open-label phase II study. *J Clin Oncol*. 2014;32(12):1236-1241.
 30. Foa R, Del Giudice I, Cuneo A, Del Poeta G, Ciolli S, Di Raimondo F, et al. Chlorambucil plus rituximab with or without maintenance rituximab as first-line treatment for elderly chronic lymphocytic leukemia patients. *American Journal of Hematology*. 2014;89(5):480-486.
 31. Strati P, Wierda W, Burger J, Ferrajoli A, Tam C, Lerner S, et al. Myelosuppression after frontline fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia: analysis of persistent and new-onset cytopenia. *Cancer*. 2013;119(21):3805-3811.
 32. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do KA, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(4):975-980.
 33. Tam CS, O'Brien S, Plunkett W, Wierda W, Ferrajoli A, Wang X, et al. Long-term results of first salvage treatment in CLL patients treated initially with FCR (fludarabine, cyclophosphamide, rituximab). *Blood*. 2014;124(20):3059-3064.
 34. Mauro FR, Bandini G, Barosi G, Billio A, Brugiattelli M, Cuneo A, et al. SIE, SIES, GITMO updated clinical recommendations for the management of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*. 2012;36(4):459-466.
 35. Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, Marks S, Raptus A, Pietragallo L, et al. Chemoimmunotherapy with low dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):498-503.
 36. Woyach JA, Ruppert AS, Rai K, Lin TS, Geyer S, Koltz J, et al. Impact of age on outcomes after initial therapy with chemotherapy and different chemoimmunotherapy regimens in patients with chronic lymphocytic leukemia: results of sequential cancer and leukemia group B studies. *J Clin Oncol*. 2013;31(4):440-447.
 37. Eichhorst B, Fink AM, Busch R, Lange E, Koppler H, Khiel M, et al. Chemoimmunotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) versus bendamustine (B) and rituximab (BR) in previously untreated and physically fit patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL): results of a planned interim analysis of the CLL10 trial, an international, randomized study of the German CLL Study Group (GCLLSG). *ASH Annual Meeting Abstracts* 2013;526(624):220-222.
 38. Cuneo A, Marchetti M, Barosi G, Billio A, Brugiattelli M, Ciolli S, et al. Appropriate use of bendamustine in first-line therapy of chronic lymphocytic leukemia. Recommendations from SIE, SIES, GITMO Group. *Leukemia Research*. 2014;38(11):1269-1277.
 39. 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):3523-3533.
 40. 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 II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(22):4393-4402.
 41. Wierda WG, Kipps TJ, Durig J, Griskevicius L, Stilgenbauer S, Mayer J, et al. Chemoimmunotherapy with O-FC in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(24):6450-6458.
 42. Hillmen P, Robak T, Janssens A, Babu KG, Kloczko J, Grosicki S, et al. COMPLEMENT 1 Study Investigators. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet*. 2015;385(9980):1873-1883.
 43. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero LF, et al. Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia*. 2015;29(7):1602-1604.
 44. Keating M, Coutre S, Rai K, Osterborg A, Faderl S, Kennedy B, et al. Management guidelines for use of alemtuzumab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma*. 2004;4(4):220-227.
 45. Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D, Bühler A, Schlenk RF, Groner S, et al. German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. Subcutaneous Alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27(24):3994-4001.
 46. Lundin J, Kimby E, Björkholm M, Broliden PA, Celsing F, Hjalmar V, et al. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody Alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2002;100(3):768-773.
 47. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J, et al. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2007;25(35):5616-5623.
 48. Byrd JC, Peterson BL, Rai KR, Hurd D, Hohl R, Perry MC, et al. Fludarabine followed by alemtuzumab consolidation for previously untreated chronic lymphocytic leukemia: final report of Cancer and Leukemia Group B study 19901. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(10):1589-1596.
 49. Pettitt AR, Jackson R, Carruthers S, Dodd J, Dodd S, Oates M, et al. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(14):1647-1655.
 50. Byrd JC, Kipps TJ, Flinn IW, Cooper M, Odenike O, Bendiske J, et al. Phase I study of the anti-CD40 humanized monoclonal antibody lucatumumab (HCD122) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(11):2136-2142.
 51. Jak M, van Bochove GG, Reits EA, Kallemeijn WW, Tromp JM, Umana P, et al. CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101. *Blood*. 2011;118(19):5178-5188.
 52. Byrd JC, Pagel JM, Awan FT, Forero A, Flinn IW, Deauna-Limayo DP, et al. A phase I study evaluating the safety and tolerability of otlertuzumab, an anti-CD37 mono-specific ADAPTIR therapeutic protein in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(9):1302-1308.
 53. Awan FT, Hillmen P, Hellmann A, Robak T, Hughes SG, Trone D, et al. LUCID trial investigators. A randomized, open-label, multicentre, phase 2/3 study to evaluate the safety and efficacy of lumiliximab in combination with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide and rituximab alone in subjects

- with relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2014;167(4):466-477.
54. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;352(8):804-815.
 55. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase- δ inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood.* 2010;116(12):2078-2088.
 56. Woyach JA, Smucker K, Smith LL, Lozanski A, Zhong Y, Ruppert AS, et al. Prolonged lymphocytosis during ibrutinib therapy is associated with distinct molecular characteristics and does not indicate a suboptimal response to therapy. *Blood.* 2014;123(12):1810-1817.
 57. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al; RESONATE Investigators. ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371(3):213-223.
 58. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, Sharman JP, Burger JA, Blum KA, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):48-58.
 59. Byrd JC, Hillmen P, James DF. Response: Additional data needed for a better understanding of the potential relationship between atrial fibrillation and ibrutinib. *Blood.* 2015;125(10):1673.
 60. McMullen jr, Boey EJ, Ooi JY, Seymour JF, Keating MJ, Tam CS. Ibrutinib increases the risk of atrial fibrillation, potentially through inhibition of cardiac PI3K-Akt signaling. *Blood.* 2014;124(25):3829-3830.
 61. Kamel S, Horton L, Ysebaert L, Levade M, Burbury K, Tan S et al. Ibrutinib inhibits collagen-mediated but not ADP-mediated platelet aggregation. *Leukemia.* 2015;29(4):783-787.
 62. Maddocks K, Christian B, Jaglowski S, Flynn J, Jones JA, Porcu P, et al. A phase 1/1b study of rituximab, bendamustine, and ibrutinib in patients with untreated and relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2015;125(2):242-248.
 63. Brown JR, Barrientos JC, Barr PM, Flinn IW, Burger JA, Tran A, et al. The Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, ibrutinib, with chemioimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2015;125(19):2915-2922.
 64. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapotka M, Ruppert AS, Xue L, Li DH, Steggerda SM, Versele M, Dave SS, Zhang J, Yilmaz AS, Jaglowski SM, Blum KA, Lozanski A, Lozanski G, James DF, Barrientos JC, Lichter P, Stilgenbauer S, Buggy JJ, Chang BY, Johnson AJ, Byrd JC. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med.* 2014;370(24):2286-2294.
 65. Sharman JP, Coutre SE, Furman RR, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Second Interim analysis of a phase 3 study of idelalisib (Zydelig®) plus rituximab for relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL): efficacy analysis in patient subpopulations with del(17p) and other adverse prognostic factors. *ASH Annual Meeting Abstracts Blood* 2014;124:330.
 66. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1993;82(6):1820-1828.
 67. O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki AB, Koziner B, et al. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5208-5212.
 68. Green DR, Walczak H. Apoptosis therapy: driving cancers down the road to ruin. *Nat Med.* 2013;19(2):131-133.
 69. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med.* 2013;19(2):202-208.
 70. Seymour et al. ABT-199: Novel Bcl-2 specific inhibitor updated results confirm substantial activity and durable responses in high risk CLL. 19 EHA Annual Meeting 2014; Abstract S702.
 71. Stephens DM, Ruppert AS, Maddocks K, Andritsos L, Baiocchi R, Jones J, Johnson AJ, et al. Cyclophosphamide, alvociclib (flavopiridol), and rituximab, a novel feasible chemoimmunotherapy regimen for patients with high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2013;37(10):1195-1199.
 72. Maddocks K, Wei L, Rozewski D, Jiang Y, Zhao Y, Adusumilli M, et al. Reduced occurrence of tumor flare with flavopiridol followed by combined flavopiridol and lenalidomide in patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Am J Hematol.* 2015;90(4):327-333.
 73. Lin TS, Blum KA, Fischer DB, Mitchell SM, Ruppert AS, Porcu P, et al. Flavopiridol, fludarabine, and rituximab in mantle cell lymphoma and indolent B-cell lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):418-423.
 74. Porte DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365(8):725-733.
 75. 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.
 76. Montillo M, Tedeschi A, Petrizzi VB, Ricci F, Crugnola M, Spriano M, et al. An open-label, pilot study of fludarabine, cyclophosphamide, and alemtuzumab in relapsed/refractory patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118(15):4079-4085.
 77. Ciccone M, Ferrajoli A, Keating MJ, Calin GA. Snapshot: Chronic Lymphocytic leukemia. *Cancer Cell.* 2014;26(5):770.

Parole Chiave

Terapia-bersaglio, leucemia linfatica cronica, inibitori del segnale BCR, anticorpi monoclonali, farmaci anti-angiogenetici.

Indirizzi per la corrispondenza

Ciccone Maria
Sezione di Ematologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria
Arcispedale S. Anna, Ferrara
Tel. (+39) 0532 236212142
m.ciccone@ospfe.it

Neoplasie mieloproliferative Ph-



Alessandro M. Vannucchi, Lisa Pieri, Chiara Paoli, Paola Guglielmelli

CRIMM, Centro Ricerca e Innovazione per le Malattie Mieloproliferative. Azienda Ospedaliera-Universitaria Careggi, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica Università degli Studi di Firenze

Introduzione

Negli ultimi anni la patogenesi delle neoplasie mieloproliferative croniche classiche, che includono la policitemia vera, la trombocitemia essenziale e la mielofibrosi, è stata oggetto di numerosi studi che hanno dimostrato in primo luogo un'inattesa complessità molecolare, in secondo luogo come l'attivazione costitutiva della via di segnalazione JAK/STAT rappresenti un meccanismo comune e fondamentale per la genesi e l'espressione fenotipica di queste patologie. Tali scoperte hanno modificato l'approccio diagnostico, l'inquadramento prognostico ma, soprattutto, hanno stimolato l'esecuzione di studi clinici con molecole dotate della capacità di inibire la proteina JAK2 attivata, portando all'approvazione di un farmaco JAK2 (e JAK1) inibitore per il trattamento dei pazienti con mielofibrosi e con forme di policitemia vera resistenti o intolleranti alla terapia convenzionale con idrossiurea. Questi argomenti vengo-

no sviluppati nella rassegna per fare il punto sulle più recenti conoscenze molecolari e per discutere in maniera critica i risultati degli studi clinici, avendo uno sguardo già rivolto all'immediato futuro. Le neoplasie mieloproliferative croniche (MPN) sono disordini clonali della cellula staminale emopoietica caratterizzati dalla abnorme produzione di cellule mature del sangue circolante; sono patologie con un decorso tendenzialmente cronico, pur con significative differenze a seconda delle diverse forme cliniche⁽¹⁾. Originariamente riconosciute nel 1951 da William Dameshek², oggetto dei primi studi da parte del *Polycythemia Vera Study Group* (PVSG) negli anni '70-80, le MPN hanno vissuto alterne vicende circa l'interesse della ricerca di base, traslazionale e farmacologica sino ad una decina di anni fa, quando sono state descritte le prime mutazioni ricorrenti che hanno, a cascata, portato allo sviluppo di studi clinici di fase 3 con nuovi farmaci bersaglio, che hanno fatto seguito a pochi, ma importanti, precedenti studi clinici controllati (Figura 1).

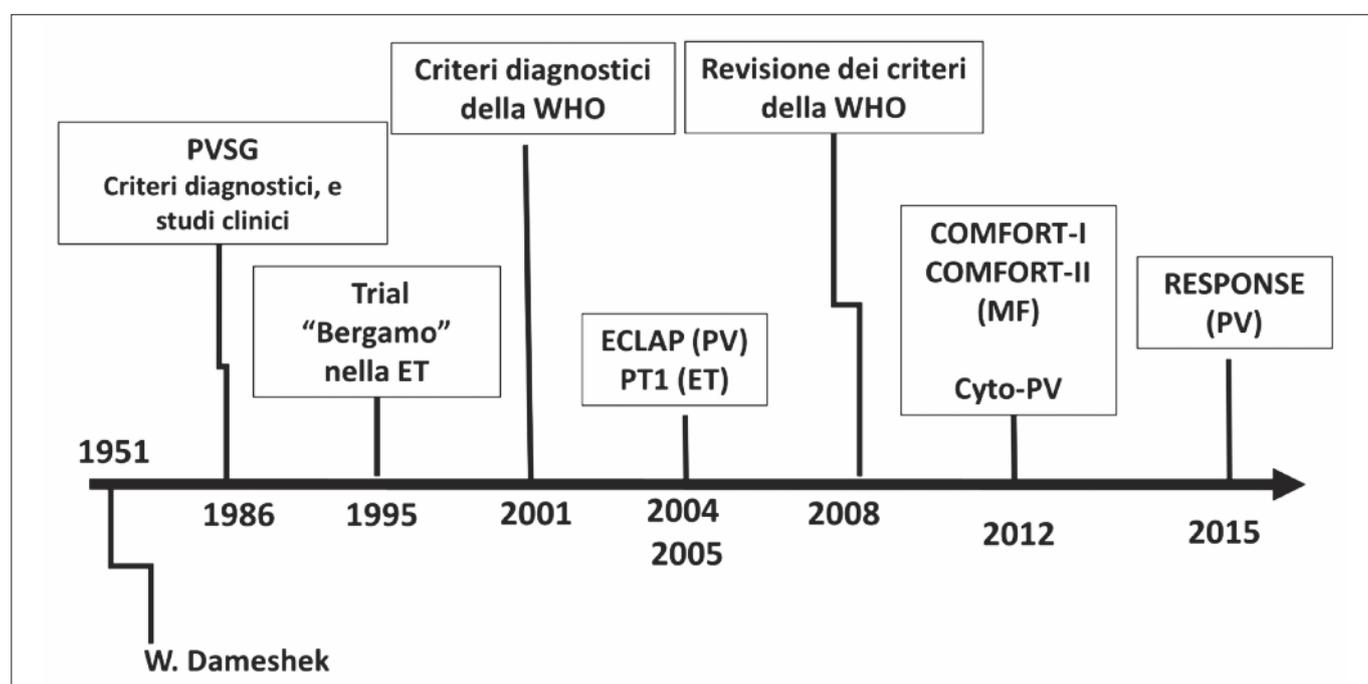


Figura 1 – Una visione schematica dell'evoluzione delle conoscenze nelle MPN, fino agli studi con nuovi farmaci bersaglio.

Le MPN sono tradizionalmente suddivise in forme positive e negative per la presenza del cromosoma Philadelphia/riarrangiamento BCR/ABL, che identifica in maniera specifica la leucemia mieloide cronica. In accordo alla classificazione della Organizzazione Mondiale della Sanità del 2008 (WHO, *World Health Organization*), le MPN Philadelphia-negative includono entità diverse (Tabella 1) tra le quali le forme cosiddette classiche, ovvero la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (ET) e la mielofibrosi primaria (PMF) ⁽³⁾. Le MPN sono state oggetto di una revisione della classificazione da parte della WHO nel 2008 a seguito della identificazione della mutazione di *JAK2-V617F* ed un'ulteriore revisione è attesa a breve ⁽⁴⁾ per incorporare le mutazioni di *CALR* e a seguito dell'identificazione di forme precoci di malattia di PV (detta anche *masked PV*) e la forma prefibrotica di PMF. I criteri diagnostici attuali, definiti dalla WHO, includono variabili cliniche, ematologiche, molecolari e istologiche ⁽⁵⁾. La PV e la ET possono, con il tempo, evolvere in una forma di mielofibrosi sostanzialmente indistinguibile dalla forma primaria, definite mielofibrosi post-PV o post-ET; tale evoluzione si verifica in circa il 5-8% dei casi di ET e circa il 15-20% delle PV, generalmente dopo la prima decade di malattia. La diagnosi di mielofibrosi post-PV e post-ET viene posta in base ai criteri definiti dall'*International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment* (IWG-MRT) ^(5,6).

Policitemia vera
Trombocitemia essenziale
Mielofibrosi primaria
Leucemia cronica a neutrofilii
Leucemia cronica a eosinofili
Malattie dei mastociti
Forme di neoplasie mieloproliferative, non classificabili

Tabella 1 – Le neoplasie mieloproliferative croniche Ph-.

Conoscenze molecolari

Nel 2005, quasi contemporaneamente, quattro diversi gruppi di ricerca hanno descritto una mutazione acquisita, puntiforme, nell'esone 14 del gene *JAK2*, *JAK2-V617F*, che è stata riscontrata in circa il 95% dei pazienti con una diagnosi di PV e il 60% di quelli con diagnosi di ET e PMF ⁽⁷⁻¹⁰⁾. Questa mutazione somatica è localizzata in una parte della molecola della proteina JAK2 che è il dominio pseudochinasico, il quale fisiologicamente inibisce l'attività funzionale del sito enzimatico. JAK2 fa parte della famiglia delle proteine JAK (*Just Another Kinase*) che include JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk₂; queste proteine sono costitutivamente associate a diversi tipi di recettori, non dotati di attività chinasi intrinseca, per citochine emopoietiche (EPO; TPO, GM-CSF; IL-3 and IL-5) e citochine

pro-infiammatorie/immunomodulatorie (come IL-6, IL-10, IL-11, IL-19, IL-20, IL-22, e Interferone- γ). Dati, ancora non definitivi, della struttura molecolare della proteina suggeriscono che, quando JAK2 viene attivato a seguito del legame della citochina al recettore, il dominio chinasi si viene a trovare distanziato dal dominio pseudochinasico, che così non è più in grado di inibirne la funzione, inducendo quindi una cascata di segnalazione che inizia con l'autofosforilazione di JAK2 medesimo.

Le tirosine fosforilate di JAK2 divengono domini di attacco per molecole della famiglia STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), in particolare STAT5, STAT1 e STAT3, che a loro volta sono tirosino-fosforilate da JAK2 e formano dimeri che, traslocati a livello nucleare, regolano l'espressione di geni recanti sequenze consensus; molti di questi geni bersaglio sono coinvolti nella regolazione della proliferazione, differenziazione e apoptosi (come Bcl-xL, ciclina-D1, PIM1) cellulare ⁽¹¹⁾. La proteina JAK2 mutata risulta avere un'attività chinasi intrinseca, autonoma, tale da causare l'attivazione costitutiva, cioè non più dipendente dal legame di una citochina al proprio recettore; in questo modo la proteina JAK2 mutata attiva una cascata di vie di segnalazione post-recettoriali quali la via JAK/STAT, Akt/PI3K/mTOR e MPAK/ERK. Inoltre, JAK2 mutato potrebbe comportare un'abnorme fosforilazione dell'istone HP1 α nucleare determinando il suo allontanamento dai siti di legame fisiologici e contribuendo quindi all'effetto oncogenico della proteina JAK2 mutata ⁽¹²⁾.

Nella maggioranza dei casi di PV che risultano negativi alla mutazione *JAK2-V617F* sono state riscontrate mutazioni acquisite nell'esone 12, consistenti in delezioni, inserzioni, ins/del ⁽¹³⁾; il fenotipo clinico appare sovrapponibile alle forme classiche V617F mutate, anche se sotto il profilo ematologico è più marcato il coinvolgimento della serie eritroide rispetto alla mieloide e piastrinica ⁽¹⁴⁾. Quindi, la pressochè totalità dei pazienti con policitemia vera presenta mutazioni di *JAK2*; in letteratura sono stati descritti rari casi di PV, o di cosiddette eritrocitosi idiopatiche, recanti mutazioni di LNK ^(15,16). Nel 5% e 10% circa dei pazienti con ET e PMF, rispettivamente, che siano risultati negativi alla mutazione di *JAK2-V617F* sono state riscontrate mutazioni nell'esone 10 del gene *MPL*, che codifica per il recettore della trombopoietina; si tratta di mutazioni puntiformi localizzate al codone 515, con sostituzioni W>L, >K, >A ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Questa regione transmembrana del recettore è importante per la sua stabilità funzionale, come suggerito dal fatto che qualsiasi sostituzione sperimentalmente indotta a carico del triptofano 515 determina l'attivazione costitutiva del recettore MPL; inoltre, mutazioni *germline* a livello del codone 505 (S505N) sono associate a piastrinosi familiare, ma almeno alcuni casi di ET sporadica potrebbero essere associati alla stessa mutazione ⁽²⁰⁾. Le mutazioni del codone 515 (e 505) determinano un'attivazione intrinseca costitutiva del recettore che determina a sua volta l'attivazione a cascata della via JAK/STAT, probabilmente con un coinvolgimento preferenziale di

STAT1 rispetto a STAT5, che potrebbe essere invece quello più coinvolto in caso di segnalazione originata dal recettore della eritropoietina. Più recentemente, infine, nel 60-80% dei pazienti con ET e PMF senza mutazioni in *JAK2* o *MPL* sono state identificate alterazioni acquisite nel gene *CALR*, che codifica per la proteina calreticulina^{21,22}. Si tratta di anomalie molecolari eterogenee, di cui le più comuni sono una delezione di 52bp (e alterazioni simili, definite Tipo 1) e un'inserzione di 5bp (e alterazioni simili, definite Tipo 2), localizzate nell'esone 9 C-terminale della proteina.

Qualunque sia l'anomalia molecolare riscontrata, tutte quelle note fino ad oggi comportano un *frameshift* di +1nt che altera la sequenza aminoacidica del domain C-terminale, che è coinvolto nel legame del calcio e nella ritenzione della calreticulina a livello del reticolo endoplasmico mediante sequenze KDEL. Peraltro, la calreticulina è una proteina la cui funzione è ancora largamente sconosciuta, in particolare per quanto riguarda l'emopoiesi, sebbene essa appaia prevalentemente espressa nella linea megacariocitaria⁽²³⁾. Evidenze correnti sono in favore dell'ipotesi che anche le mutazioni della calreticulina comportino un'attivazione della via di JAK/STAT.

Diverse altre mutazioni, definite subclonali, sono state riscontrate in pazienti con PMF e, meno frequentemente, con PV ed ET⁽²⁴⁾. Sono mutazioni eterogenee, localizzate in geni coinvolti nella regolazione epigenetica e nello *spliceosoma*, che hanno un significato prognostico in quanto la loro presenza, nella PMF, è associata ad una ridotta sopravvivenza ed un maggior rischio di trasformazione leucemica^(25,26). In particolare, un set di 4 geni mutati, *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *IDH1 e 2*, identifica una categoria di pazienti ad alto rischio molecolare (HMR)⁽²⁷⁾ indipendentemente dagli score clinici

quali IPSS⁽²⁸⁾ e DIPSS-plus⁽²⁹⁾; questi soggetti mostrano una sopravvivenza ridotta ed un rischio di trasformazione leucemica significativamente aumentato rispetto a pazienti a basso rischio molecolare-LMR, cioè negativi per le suddette mutazioni. Un ulteriore fattore che influenza la prognosi è rappresentato dal numero di mutazioni riscontrate nel paziente⁽³⁰⁾.

Studi clinici con inibitori di JAK

L'identificazione dell'abnorme attivazione della via JAK/STAT nei pazienti con MPN, che appare essere tema comune e largamente indipendente dal genotipo, ha sollevato l'interesse per la valutazione clinica di farmaci inibitori di JAK2. Va precisato che al momento nessuno dei farmaci disponibili è un inibitore specifico della proteina JAK2 mutata, in quanto si tratta di inibitori che inibiscono in modo comparabile la proteina JAK2 attiva sia essa mutata che normale (*wild-type*), e che la maggior parte di questi farmaci contemporaneamente inibisce anche JAK1, sia pure con efficienza variabile.

Da un lato, queste peculiarità rappresentano un vantaggio in termini clinici, poiché questi farmaci possono essere utilizzati con efficacia simile in tutti i pazienti indipendentemente dalla presenza o meno della mutazione V617F, dall'altro rendono ragione della principale tossicità rappresentata dall'inibizione dell'emopoiesi fisiologica, per la quale la via JAK/STAT è essenziale. Al contempo, la tossicità ematologica limita il dosaggio di farmaco utilizzabile, e questo può contribuire alla mancanza di un chiaro effetto *disease-modifying* che potrebbe essere (almeno teoricamente) ottenuto con dosi maggiori del farmaco. I principali JAK inibitori che sono stati, o lo sono attualmente, utilizzati in studi clinici sono elencati nella Figura 2.

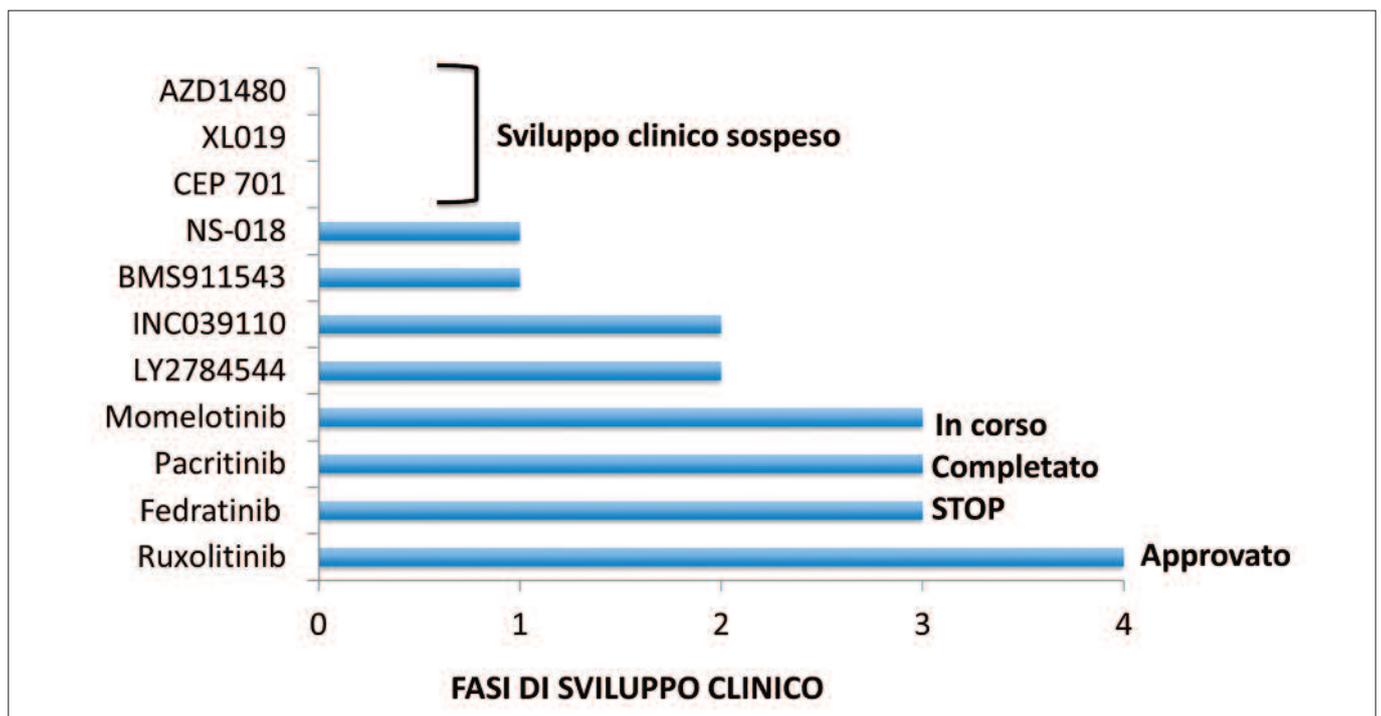


Figura 2 – Le nuove molecole con proprietà di JAK inibitori, e stato attuale della sperimentazione clinica.

Mielofibrosi

La gestione classica, al di fuori dell'opzione trapiantologica, del paziente con MF è essenzialmente basata su un approccio per problemi, come illustrato nella Tabella 2. Agenti citoriduttivi quali idrossiurea, busulfano e mercaptopurina, la splenectomia e l'irradiazione splenica, la radioterapia localizzata su masse di tessuto eotropico, la gestione dell'anemia con trasfusioni, corticosteroidi, agenti stimolanti l'eritropoiesi, androgeni quali il danazolo, e agenti immunomodulatori rappresentano le opzioni che costituiscono l'armamentario terapeutico corrente, che è stato largamente modificato dall'introduzione dei nuovi farmaci JAK inibitori in questi ultimi pochi anni. Ruxolitinib (INCB018424) è il primo JAK1 e JAK2 inibitore che è stato approvato per l'uso in pazienti con mielofibrosi e più recentemente in pazienti con PV refrattari o resistenti alla idrossiurea. L'approvazione del farmaco è basata sui risultati di due studi di fase 3, detti COMFORT-1 e -2 (*controlled myelofibrosis study with oral JAK inhibitor treatment*) condotti in pazienti con PMF e forme di MF secondarie a ET e PV, che ricadevano nella categoria a rischio intermedio-2 o alto secondo i criteri del IPSS e che presentavano una splenomegalia di almeno 5 cm dall'arcata costale e una conta piastrinica superiore a $100 \times 10^9/l$ (31,32). Il livello di conta piastrinica stabilito tra i criteri d'inclusione deriva dai dati dello studio di fase 2 che aveva dimostrato come la piastrinopenia rappresentasse la tossicità limitante la dose (DLT) del farmaco (33). Nel COMFORT-I, i pazienti (n=309) sono stati randomizzati 1:1 tra ruxolitinib e placebo, mentre nel COMFORT-II (n=219) sono stati randomizzati 2:1 tra ruxolitinib e miglior terapia convenzionale (*best available therapy*, BAT). In entrambi gli studi è stato raggiunto l'obiettivo primario, rappresentato dalla riduzione del volume splenico >35%, valutato mediante risonanza magnetica, che è stato misurato alla 24^a settimana nel COMFORT-I (41,9% dei pazienti trattati con ruxolitinib verso 0,7% del gruppo placebo hanno ottenuto questo livello di riduzione del volume splenico; p=0,0001) e alla 48^a settimana nel COMFORT-II (28,5% ruxolitinib verso 0% BAT, p=0,0001). L'efficacia del farmaco sulla milza è risultata simile

nei pazienti *JAK2* mutati e non, a conferma di quanto sopra discusso. Inoltre, un'analisi della casistica di pazienti del COMFORT-1 per sottogruppi, che includevano il tipo di MF (PMF, PPV- e PET-MF), l'età (≤ 65 , >65 anni), lo score IPSS, lo score ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group* performance status: 0, 1, ≥ 2), la mutazione *JAK2-V617F*, il livello di emoglobina e di conta piastrinica all'inizio del trattamento, le dimensioni della milza palpabile (≤ 10 , >10 cm), e il *Total Symptom Score* (TSS), ha dimostrato l'indipendenza delle risposte cliniche in termini di riduzione del volume splenico e miglioramento dei sintomi, dalle variabili sopra elencate; parimenti, non veniva in alcun modo influenzato l'impatto positivo del trattamento con ruxolitinib sulla sopravvivenza (34). La riduzione della splenomegalia, che si manifesta generalmente entro i primi due mesi di trattamento, si mantiene nel tempo, e all'ultimo follow up di 3 anni il 49% e 50% dei pazienti nel COMFORT-I e -II, rispettivamente, continua a mantenere questo livello di riduzione della splenomegalia (35,36). Al di là del valore di riduzione della splenomegalia necessario per il raggiungimento dell'obiettivo primario dello studio (una riduzione del volume splenico >35% con la risonanza corrisponde ad una riduzione della lunghezza palpatoria della milza del 50% circa), la maggior parte dei pazienti (96% e 97% nei due studi, rispettivamente) ha comunque presentato una riduzione della splenomegalia di una qualche entità. In aggiunta all'effetto sulla splenomegalia, ruxolitinib ha dimostrato importanti benefici sui sintomi associati alla malattia e sulla qualità di vita dei pazienti (37). Il miglioramento della sintomatologia è rapido, entro le prime 4 settimane di trattamento, ed è mantenuto nel tempo nella maggioranza dei casi. Il 45,9% dei pazienti trattati con ruxolitinib contro il 5,3% del placebo ha mostrato un miglioramento >50% del punteggio utilizzato nel MSAF (*myelofibrosis symptom assessment form total symptom score*) (37). La perdita di peso associata alla cachessia e l'ipocolesterolemia della malattia (entrambe negativamente associate alla sopravvivenza) sono corrette da ruxolitinib nella grande parte dei casi. La tollerabilità del trattamento è rimarchevole, con il 64,5% e il 49,7% dei pazienti randomizzati a ruxolitinib nel

PROBLEMA CLINICO	FARMACI	INTERVENTI
Anemia	Corticosteroidi, danazolo, ESA	
Splenomegalia sintomatica	Idrossiurea, cladribina, altri	splenectomia
Emopoiesi extramidollare	Terapia radiante	
Rischio di trombosi	Aspirina, idrossiurea	
Sintomi associati alla malattia	Nessun farmaco	
Rischio di progressione leucemica	Nessun farmaco	
Ridotta sopravvivenza		Trapianto allogenico

Tabella 2 – Indicazioni terapeutiche convenzionali (in era pre-JAK inibitori) per il trattamento della mielofibrosi.

COMFORT-I ancora in terapia a 2 e 3 anni, rispettivamente; nel COMFORT-2, il 45% dei pazienti assumeva ancora ruxolitinib a 3 anni. Negli studi COMFORT, sono state utilizzate dosi iniziali di 15 e 20 mg due volte al giorno in relazione alla conta piastrinica iniziale (tra 100 e 200x10⁹/l o superiori a 200x10⁹/l, rispettivamente).

L'evento avverso più comune (che in realtà esprime il risultato di un effetto *on-target*) è rappresentato dall'anemia e piastrinopenia, specialmente nei primi 3-4 mesi di trattamento; sono alterazioni generalmente controllabili con l'aggiustamento della dose di farmaco e/o brevi interruzioni, anche se alcuni pazienti richiedono un supporto trasfusionale di globuli rossi concentrati, almeno transitoriamente⁽³⁸⁾. Lo sviluppo di anemia, anche trasfusione-dipendente, non è un criterio per la sospensione del farmaco nella maggioranza dei casi e non inficia il beneficio clinico ottenuto anche in termini di miglioramento della sintomatologia. La gestione della piastrinopenia richiede riduzione di dose o temporanea interruzione del farmaco, ma sono in corso studi per valutare la sicurezza e l'efficacia di ruxolitinib in pazienti con MF e piastrinopenia compresa fra 50 e 99x10⁹/l (uno studio di fase 2, EXPAND, sta per completare l'arruolamento).

Risultati preliminari indicano che anche questi pazienti possono ottenere un vantaggio in termini di riduzione della splenomegalia e dei sintomi con buona tolleranza al farmaco; inoltre, un possibile approccio che facilita la gestione dei pazienti con piastrinopenia potrebbe essere il raggiungimento graduale del dosaggio massimo tollerato nel singolo caso⁽³⁹⁾. Al di là delle citopenie, il trattamento con ruxolitinib è associato infrequentemente ad altre tossicità, sebbene siano stati descritti eventi infettivi ricorrenti (riattivazione di *Herpes zoster* e infezioni urinarie), incluse occasionali infezioni opportunistiche, quali polmonite da *Criptococco neoformans*⁽⁴⁰⁾, retinite bilaterale da toxoplasma⁽⁴¹⁾, epatite, riattivazione tubercolare, leucoencefalopatia multifocale progressiva⁽⁴²⁾. La comparsa di queste inusuali, e sia pure occasionali, manifestazioni infettive suggerisce che ruxolitinib possa avere proprietà immunosoppressive attraverso la modulazione di sotto-popolazioni di linfociti T⁽⁴³⁾ e delle cellule dendritiche^(44,45). È quindi indicata, nella pratica clinica, un'attenta sorveglianza dei pazienti in trattamento con ruxolitinib per queste rare ed inusuali complicanze infettive ed eventualmente, in casi selezionati, si può prendere in considerazione di effettuare un'adeguata profilassi⁽⁴⁶⁾.

Una sindrome da sospensione di ruxolitinib è stata descritta in alcuni pazienti a seguito della sospensione rapida del trattamento, ed è stata attribuita ad una reazione infiammatoria grave da *rebound* citochinico, tanto da richiedere per alcuni pazienti un trattamento intensivo⁽⁴⁷⁾. Peraltro, dopo questa iniziale descrizione, non sono stati riportati casi ulteriori né eventi simili sono stati osservati negli studi prospettici. Va comunque tenuto conto che alla sospensione del farmaco la sintomatologia della malattia e la splenomegalia possono ricomparire anche rapidamente (1-2 settimane); pertanto la sospensione del farmaco dovrebbe essere graduale, se possibile, e/o accompagnata da una concomitante somministrazione di steroide.

Vi sono evidenze, preliminari e/o riferite a casi individuali, che il trattamento con ruxolitinib possa migliorare anche altri parametri clinici che sono espressione della malattia, oltre alla splenomegalia e i sintomi. In pazienti con epatomegalia da emopoiesi eterotopa insorta a seguito di splenectomia, il trattamento con ruxolitinib ha indotto una riduzione del volume epatico del 50-68% e migliorato i sintomi legati alla epatomegalia⁽⁴⁸⁾. In uno studio di 15 pazienti con MF e ipertensione polmonare si è osservato un significativo miglioramento dei parametri di funzionalità cardiaca, oltre che quelli ematologici, parallelamente alla riduzione dei livelli circolanti di alcune interleuchine infiammatorie⁽⁴⁹⁾. Gli effetti del farmaco sulla fibrosi midollare appaiono nel complesso modesti, sebbene in almeno la metà dei pazienti trattati per lungo periodo si assista alla stabilizzazione del grado di fibrosi, a differenza dei controlli trattati con terapia convenzionale nei quali la fibrosi tende generalmente a peggiorare. Risoluzioni totali della fibrosi sono state descritte in alcuni pazienti^(50,51). Anche gli effetti sulla carica allelica della mutazione *JAK2-V617F* sono apparsi modesti, con riduzioni superiori al 20% in circa un quarto dei casi⁽⁵⁶⁾. L'analisi di un possibile impatto di ruxolitinib sulla sopravvivenza dei pazienti con MF inseriti negli studi COMFORT è complicato dal disegno degli studi che prevedeva la possibilità di un *cross-over* dal gruppo di controllo (placebo o BAT) a quello attivo (ruxolitinib) nel caso di documentata inefficacia o di progressione della malattia. Pur tenendo conto di ciò, in entrambi gli studi si è osservata una riduzione del valore di HR a favore di ruxolitinib (Tabella 3), a indicare pertanto un vantaggio di sopravvivenza rispetto al placebo e soprattutto alla terapia convenzionale^(31,32). Un'analisi combinata dei due studi ha mostrato una riduzione del 35% del rischio di morte con ruxolitinib (HR 0,65, 95% CI 0,46-0,90; p=0,01); i pazienti con MF ad alto rischio IPSS trattati con ruxolitinib presentavano una curva di sopravvivenza simile ai pazienti della categoria intermedio-2 del gruppo di controllo⁽⁵²⁾. In questo stesso studio si è anche osservata una correlazione negativa tra dimensione splenica e sopravvivenza, essendo il rischio di morte aumentato del 9% per ogni 5 dl di volume splenico misurato prima del trattamento (HR=1,09; 95% CI 1,03-1,15; p=0,003).

	Follow up mediano	HR (95% CI)	p
COMFORT-I	1 anno (51 settimane)	0,50 (0,25-0,98)	0,04
	2 anni (102 settimane)	0,58 (0,36-0,95)	0,03
	3 anni (149 settimane)	0,69 (0,46-1,03)	0,067
COMFORT-II	1 anno (52 settimane)	0,70 (0,20-2,49)	2 anni
	(112 settimane)	0,51 (0,27-0,99)	0,041
	3 anni (151 settimane)	0,48 (0,28-0,85)	0,009

Tabella 3 – Dati circa la sopravvivenza globale nei due studi COMFORT in pazienti con MF trattati con ruxolitinib confrontati con placebo (COMFORT-I) o miglior terapia disponibile (BAT) (COMFORT-II).

Inoltre, l'analisi dei dati di sopravvivenza utilizzando un approccio statistico (RPSFT, *Rank Preserving Structural Failure Time*) che tiene conto dell'attribuzione iniziale dei pazienti negli studi clinici che prevedono cross-over, ha concluso per un vantaggio ancora più significativo (HR 0,29, 95%CI 0,13-0,63, $p=0,01$) del trattamento nei pazienti che avevano ricevuto ruxolitinib rispetto ai due gruppi controllo messi assieme (placebo e BAT). L'impatto positivo sulla sopravvivenza associato alla terapia con ruxolitinib è risultato indipendente anche dalla presenza di mutazioni prognosticamente sfavorevoli (HMR) nei pazienti arruolati nello studio COMFORT-II⁽⁵³⁾. Infine, un vantaggio di sopravvivenza è stato confermato dal confronto tra la sopravvivenza di pazienti trattati con ruxolitinib nel COMFORT-II e quella dei pazienti, confrontabili per caratteristiche cliniche, raccolti nel data base dal quale era originato lo score IPSS dinamico (DIPSS)⁽⁵⁴⁾; questi pazienti avevano ricevuto terapia convenzionale. I risultati di questa analisi comparativa hanno evidenziato una riduzione del 39% del rischio di mortalità associata al trattamento con ruxolitinib con una sopravvivenza mediana di 5 anni per i pazienti dello studio COMFORT-II (95%CI 2,9-7,8) e 3,5 anni (95%CI 3,0-3,9) per quelli della terapia convenzionale⁽⁵⁵⁾. Nel complesso, quindi, le evidenze disponibili sono a favore di un effetto di ruxolitinib nel mitigare la prognosi negativa degli studi intermedio-2 e alto rischio dei pazienti con MF, ma vi sono anche dati ed interpretazioni contrastanti, conseguenza del disegno con cross-over degli studi COMFORT⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾.

Altri JAK inibitori sono stati sviluppati fino al livello di fase 3 (Figura 2). Fedratinib (SAR302503) è un inibitore preferenziale di JAK2 e *JAK2-V617F* rispetto a JAK1 e JAK3. In uno studio di fase 2, fedratinib alla dose giornaliera singola di 400 mg ha determinato la riduzione del volume splenico >35% nel 60% dei pazienti, ed ha migliorato significativamente i sintomi di malattia; i principali effetti collaterali sono stati l'anemia e la diarrea, mentre una piastrinopenia di grado 3/4 è stata riscontrata nel 16% dei pazienti⁽⁵⁹⁾. Lo studio doppio cieco di fase 3 JAKARTA ha confrontato due bracci attivi, 400 e 500 mg/die, con il braccio placebo in 289 pazienti con forme primaria e secondaria di MF. Alla 28ª settimana, il 36% e 40%, rispettivamente, dei pazienti trattati con 400 e 500 mg hanno raggiunto l'*end-point* di riduzione del volume splenico >35%, oltre ad un miglioramento dei sintomi⁽⁶⁰⁾. In uno studio separato di fase 2, JAKARTA-2, fedratinib è stato utilizzato in pazienti con resistenza o intolleranza a ruxolitinib⁽⁶¹⁾. Il 40% dei pazienti ha mostrato una riduzione del volume splenico e la maggior parte un netto miglioramento dei sintomi già dalla 12ª settimana. Sebbene entrambi gli studi avessero dimostrato l'efficacia terapeutica del farmaco, e lo studio di fase 3 avesse raggiunto l'obiettivo primario, lo sviluppo clinico di fedratinib è stato sospeso a seguito del riscontro di alcuni casi di encefalopatia di Wernicke. È stato dimostrato in studi *in vitro* che fedratinib inibisce potentemente la captazione ed il flusso transcellulare della tiamina, suggerendo che l'assorbimento orale della tiamina

nella dieta possa essere compromesso dal farmaco⁽⁶²⁾. Anche l'inibitore XL109 è stato abbandonato per manifestazioni neurologiche⁽⁶³⁾, mentre manifestazioni neurologiche periferiche sono state descritte recentemente anche per un atro JAK2 inibitore, momelotinib⁽⁶⁴⁾, suggerendo la potenzialità di alcuni JAK inibitori di interagire con molecole e/o processi coinvolti nella normale funzione del sistema nervoso centrale e/o periferico; da notare che nessuna tossicità neurologica significativa è stata riferita all'uso di ruxolitinib. Momelotinib (CYT 387) è un potente inibitore di JAK2 e JAK1⁽⁶⁵⁾ che ha dimostrato efficacia clinica sulla splenomegalia e sui sintomi, ed una rimarchevole capacità di migliorare l'anemia nel 59% dei casi inclusi in uno studio di fase 2⁽⁶⁶⁾. Tale attività clinica appare specifica di questa molecola (sebbene dati preliminari con pacritinib possano suggerire simile efficacia), ed i meccanismi fisiopatologici rimangono del tutto sconosciuti e verosimilmente complessi, essendo l'aumento della emoglobina un non-senso in relazione all'effetto di inibizione della segnalazione JAK/STAT, che è richiesta per la normale eritropoiesi. La ricerca di possibili variabili molecolari associate alla risposta a momelotinib ha messo in evidenza come la presenza di mutazione di *CALR* e l'assenza di mutazione di *ASXL1* fossero correlate con una maggior probabilità di riduzione del volume splenico, mentre l'impatto negativo sulla sopravvivenza di mutazioni di *ASXL1* non veniva mitigato dal trattamento con momelotinib⁽⁶⁷⁾. Pacritinib (SB 1518) è un inibitore selettivo di JAK2, mutato e non, che ha anche attività anti-FLT3. È stato valutato inizialmente in uno studio di fase 2, ma del tutto recentemente è stato completato anche uno studio di fase 3 (PERSIST 1, confronto contro miglior terapia disponibile) i cui risultati definitivi devono essere ancora riportati. Nello studio di fase 2, sono stati trattati con pacritinib 35 pazienti con MF, il 40% e 43% dei quali avevano anemia e piastrinopenia; il 31% dei pazienti ha ottenuto la riduzione del volume splenico >35% in risonanza magnetica, e la maggioranza il miglioramento dei sintomi⁽⁶⁸⁾, e non sono stati evidenziati segni di mielosoppressione significativa. Questi dati, ed i risultati preliminari dello studio di fase 3, suggeriscono che pacritinib possa rappresentare un'opzione terapeutica per pazienti anemici o piastrinopenici. Un altro studio che prevede l'uso di pacritinib in seconda linea in pazienti refrattari/resistenti a ruxolitinib (PERSIST 2) è in corso. Altri JAK inibitori, quali BMS-911543, NS-018, e LY2784544, sono in una fase più precoce dello sviluppo clinico. Infine, INCB-039110, un inibitore selettivo di JAK1 utilizzato in alcune patologie autoimmuni e in tumori solidi, è stato impiegato anche in uno studio di fase 2 in pazienti con MF, dimostrando efficacia sui sintomi nel 75% dei casi e sulla splenomegalia nel 14%, senza ridurre apprezzabilmente il livello di emoglobina⁽⁶⁹⁾. Al di là dell'efficacia clinica, questi primi risultati sono importanti in quanto suggeriscono che l'inibizione mirata di JAK1 può avere uno spettro di efficacia clinica almeno parzialmente sovrapponibile ai JAK2 e JAK1/JAK2 inibitori ma un profilo di tossicità ematologica più favorevole. Al tempo stesso, la modesta attività

sulla splenomegalia indica che un certo grado di mielotossicità, conseguente all'inibizione di JAK2, sia richiesto per esercitare un effetto clinico significativo sulla tumefazione splenica.

Un potenziale nuovo approccio è rappresentato dallo sviluppo di inibitori di JAK2 di tipo II, cioè capaci di inibire la proteina JAK2 indipendentemente dal suo stato di attivazione. La molecola NVP-CHZ868 è stata valutata recentemente in modelli *in vitro* utilizzando cellule da pazienti con MPN e in modelli murini.

Il farmaco è capace di inibire potentemente la proliferazione di cellule recanti la mutazione *JAK2-V617F* o il gene di fusione *TEL-JAK2*. Di particolare interesse il fatto che questa molecola è attiva anche nei confronti di cellule che avevano acquisito il fenomeno della persistenza ai *JAK2* inibitori. Infine, in modelli murini di PV, CHZ868 normalizzava il valore ematocrito, riduceva l'espansione patologica dei progenitori emopoietici, riduceva il volume splenico e migliorava la fibrosi a livello midollare. In questi modelli, il trattamento si associava anche alla riduzione del 49% della carica allelica di *JAK2* mutato⁽⁷⁰⁾. Questi primi dati suggestivi meritano certamente un'estensione anche all'interno di studi clinici controllati, una volta che la sicurezza della molecola sia stata definita.

Policitemia vera e trombocitemia essenziale

PV e ET sono caratterizzate da un aumentato rischio di eventi trombotici ed emorragici, da alterazioni della conta delle cellule ematiche con eritrocitosi (PV), piastrinosi (ET e PV) e leucocitosi (PV, rara nella ET), splenomegalia di entità variabile, ed un importante corredo sintomatologico che, specie nella PV, può determinare un'alterazione della qualità di vita⁽⁷¹⁾. Il trattamento convenzionale è mirato alla riduzione del rischio vascolare, al controllo delle conte circolanti, con variabili effetti sulla splenomegalia e modesto beneficio sintomatologico. Il farmaco citotossico più comunemente utilizzato è l'idrossiurea, o in alternativa l'interferone. L'obiettivo cardine del trattamento nella PV è il controllo del valore ematocrito al di sotto del 45%, come dimostrato nello studio randomizzato Cyto-PV⁽⁷²⁾, o della conta piastrinica nella ET, in base ai criteri stabiliti dall'*European Leukemia Net*⁽⁷³⁾; peraltro, il reale impatto del controllo della conta piastrinica sulla riduzione dei fenomeni vascolari è ancora dibattuto. La maggior parte dei pazienti con PV ed ET tollera bene il trattamento con idrossiurea, ma il 15-20% con il tempo diviene refrattario/resistente e può sviluppare intolleranze anche gravi^(74,75); lo sviluppo di resistenza è associato ad un peggioramento della prognosi ed un aumentato rischio di evoluzione leucemica, mentre lo sviluppo di intolleranza non sembra avere impatto prognostico negativo⁽⁷⁶⁾. Anagrelide è il farmaco approvato in Europa come seconda linea nella ET^(77,78), talora anche in combinazione con idrossiurea⁽⁷⁹⁾, mentre per la PV non esiste un'alternativa definita come seconda linea, e vengono utilizzati comunemente altri citotossici quali busulfano o l'interferone. Ruxolitinib è stato utilizzato in pazienti con PV refrattari o resistenti ad idrossiurea in uno studio di fase 2, che includeva anche una coorte di pazienti con ET. Tra i pa-

zienti con PV è stata osservata una risposta secondo i criteri ELN⁽⁸⁰⁾ nel 97% dei casi con il 59% dei pazienti che presentavano una risposta completa; si è osservata una riduzione della carica allelica del *JAK2-V617F*, una riduzione fino alla normalizzazione della splenomegalia e un marcato miglioramento dei sintomi⁽⁸¹⁾. Nel gruppo dei pazienti con ET (n=39), dopo un'esposizione mediana a ruxolitinib di 205 settimane, il 61% stava ancora assumendo il farmaco; il 57% di quelli con conta piastrinica $>600 \times 10^9/l$ aveva ridotto al di sotto del valore soglia, e nel 73% di quelli con leucociti $>10 \times 10^9/l$ la conta si era normalizzata. Il farmaco riduceva la splenomegalia nei pochi casi splenomegalici e migliorava la sintomatologia nella grande parte dei pazienti⁽⁸²⁾. Una recente analisi delle risposte molecolari in un sottogruppo di 22 pazienti con lungo follow up ha evidenziato una riduzione mediana della carica allelica di *JAK2-V617F* del 28% a 60 mesi, con 3 pazienti che mostravano una risposta molecolare completa⁽⁸³⁾.

Lo studio di fase 3, randomizzato, aperto, RESPONSE ha arruolato 110 pazienti con PV refrattari o resistenti ad idrossiurea trattati con ruxolitinib, che sono stati confrontati con 112 pazienti gestiti con la miglior terapia disponibile (BAT)⁽⁸⁴⁾. L'obiettivo primario dello studio, rappresentato dal controllo del valore ematocrito al disotto del 45% in assenza di salassi e la riduzione del volume splenico $>35\%$, è stato raggiunto nel 21% dei pazienti trattati con ruxolitinib rispetto all'1% della BAT. Considerando i due componenti individuali dell'obiettivo primario, il controllo dell'ematocrito senza salassi e la riduzione del volume splenico sono stati ottenuti dal 60% e 20% rispettivamente dei pazienti nel braccio sperimentale contro il 38% e l'1% di quelli nel gruppo BAT. Inoltre, la remissione ematologica completa (normalizzazione anche dei leucociti e piastrine) è stata ottenuta dal 24% dei pazienti con ruxolitinib rispetto al 9% della BAT. La tossicità ematologica è stata modesta, con grado 3-4 di anemia o piastrinopenia nel 2% e 5% dei pazienti, rispettivamente. Si è osservato un aumento dell'incidenza di herpes zoster nei pazienti trattati con ruxolitinib (6% vs 0%), e sono stati descritti alcuni casi di carcinoma cutaneo non melanocitico nel gruppo ruxolitinib, nella maggior parte dei casi insorti in soggetti con storia precedente di lesione pre- o francamente cancerose. Di particolare interesse l'osservazione che nella valutazione dell'incidenza di trombosi nel periodo fino all'obiettivo primario (32^a settimana) è stato rilevato un solo paziente nel gruppo ruxolitinib che abbia presentato trombosi rispetto a sei del gruppo di controllo.

Oltre i JAK inibitori

In aggiunta alla via di JAK/STAT, altre vie di regolazione e segnalazione cellulare, come la via della PI3K/Akt/mTOR, MEK, del *signaling* di *hedgehog*, l'anormale acetilazione degli istoni, la disregolazione delle telomerasi, rappresentano tutte possibili bersagli di nuovi farmaci, ed alcuni studi clinici sono già stati effettuati al riguardo utilizzando sia singole molecole sia combinazioni con inibitori di JAK. Le potenziali finalità della combinazione di due o più farmaci bersaglio sono rappresentate da una parte dal miglioramento

dell'efficacia terapeutica qualora si dimostrassero evidenze di un'attività *disease modifying* combinata, dall'altra la riduzione della tossicità ematologica ed extra-ematologica mantenendo il livello di efficacia clinica ottenuto con il singolo JAK inibitore. Tra gli studi di combinazione in corso, per alcuni dei quali sono stati presentati dati preliminari, vanno menzionati lo studio HARMONY (studio di fase 1b di combinazione tra ruxolitinib e buparlisib, inibitore di PI3K) ⁽⁸⁵⁾, lo studio di combinazione tra ruxolitinib e sonidegib (LDE225, inibitore della via di Hedgehog) ⁽⁸⁶⁾, lo studio di fase 2 di combinazione tra ruxolitinib e panobinostat inibitore delle deacetilasi istoniche) ⁽⁸⁷⁾. Sono in corso diversi studi di combinazione tra ruxolitinib e farmaci con potenziale attività anti-anemica, come il danazolo. In corso studi di combinazione anche con agenti stimolati l'eritropoiesi. Inibitori delle deacetilasi istoniche sono utilizzati anche in monoterapia: tra questi, givinostat, che in studi in vitro è stato dimostrato essere efficace nell'inibire la proliferazione di linee cellulari *JAK2-V617F* mutate a dosaggi circa tre volte inferiori a quelli necessari ad inibire cellule *JAK2 wild type* ⁽⁸⁸⁾. Un primo studio condotto in pazienti con MF, ET e PV ha permesso di individuare la PV come patologia in cui il farmaco risultava maggiormente efficace ⁽⁸⁹⁾. Uno studio successivo ha valutato l'associazione fra givinostat (50 mg o 100 mg/die) e la massima dose tollerata di idrossiurea, dimostrando che l'associazione permette di ottenere una risposta ematologica in circa il 50% dei pazienti che non rispondevano ad idrossiurea in monoterapia. Nei due bracci di trattamento, il 5 e 11% dei pazienti ha ottenuto la scomparsa di splenomegalia palpabile, e il 64% e 67% la risoluzione del prurito. Inoltre l'aggiunta di givinostat ha permesso di ridurre il dosaggio di idrossiurea nel 27,3% e 45,5% dei casi. L'associazione è stata nel complesso ben tollerata, avendo come principali effetti collaterali quelli gastrointestinali, in particolare diarrea, e la piastrinopenia, che sono effetti tipici di questa classe di farmaci ⁽⁹⁰⁾. Sono in corso altri due studi con givinostat nella PV, volti a valutare la sicurezza e l'efficacia di dosi crescenti in monoterapia e del trattamento a lungo termine. Deludente l'esperienza con vorinostat in pazienti con PV ed ET; il farmaco è risultato poco tollerato con quasi i 2/3 dei pazienti costretti ad interrompere precocemente il trattamento per tossicità ⁽⁹¹⁾. Al contrario, panobinostat è stato impiegato come singolo agente in uno studio di fase 1 in 18 pazienti con MF, mostrando evidenza di attività anche a livello della fibrosi midollare ⁽⁹²⁾. Tra i farmaci bersaglio di più recente introduzione in studi clinici va ricordato l'inibitore delle telomerasi imetelstat, un oligonucleotide coniugato con lipidi, che è stato somministrato per via endovenosa con due schemi temporali diversi all'interno di uno studio di fase 2. I risultati preliminari in 33 pazienti con MF indicano una attività clinica sulla splenomegalia e sui sintomi nel 44% dei casi associata, sporadicamente, ad effetti di riduzione della fibrosi midollare e della

carica allelica di *JAK2-V617F*. Le tossicità più comuni sono state l'anemia e la piastrinopenia. È stata notata anche una correlazione tra risposta al trattamento e mutazioni dei geni dello *spliceosoma* ⁽⁹³⁾. Peraltro, lo studio è stato sospeso dalla FDA per tossicità epatica sospetta correlata al farmaco; successivamente è stato attivato uno studio clinico che arruola pazienti refrattari o resistenti a ruxolitinib, attualmente in corso. L'agente antifibrinolitico PRM151, che è la forma ricombinante della proteina pentraxina-2 che regola l'attività di monociti e macrofagi localizzati nelle aree di danno tissutale, prevenendo e/o riparando la fibrosi, è stato impiegato in uno studio di fase 2 in 25 pazienti con MF. Mentre l'effetto sulla splenomegalia e sui sintomi è stato complessivamente modesto, si è osservata una riduzione del grado di fibrosi nel 42% dei pazienti, con alcuni che mostravano anche miglioramento dell'anemia e della piastrinopenia ⁽⁹⁴⁾. La tollerabilità è stata ottima. L'associazione tra JAK2 inibitori e PRM151 potrebbe essere vantaggiosa, ma al momento non vi sono studi clinici attivi.

Conclusioni

La scoperta dell'abnorme attivazione della via di segnalazione JAK/STAT in pazienti con MPN, presente indipendentemente dal background mutazionale, ha portato allo sviluppo e alla rapida approvazione di ruxolitinib, capostipite di una nuova classe di farmaci, i JAK inibitori. Ruxolitinib ha dimostrato di esercitare una rimarchevole attività clinica sulla splenomegalia e sui sintomi, rapida e mantenuta, con evidenze che questa attività possa estendersi anche all'epatomegalia, alla ipertensione polmonare. In pazienti con PV refrattari o resistenti alla idrossiurea, il farmaco controlla la massa eritroide senza necessità di salassi, migliora la splenomegalia ed i sintomi, e potrebbe ridurre gli eventi trombotici. Nei pazienti con MF, ruxolitinib ha mostrato di migliorare la sopravvivenza, mentre le evidenze circa un'attività di modificazione di processi connessi con meccanismi correlati alla biologia della malattia (carica allelica, fibrosi) sono ancora modeste. Nuovi farmaci bersaglio, anche da utilizzarsi in combinazione con ruxolitinib, sono in corso di valutazione clinica, e potrebbero ampliare lo spettro di efficacia incluso un impatto positivo sull'anemia o la piastrinopenia. È quindi ragionevole attendersi che nei prossimi anni il bagaglio terapeutico per le MPN possa accrescersi a seguito dell'immissione di nuovi farmaci, e anche gli obiettivi del trattamento potranno divenire più ambiziosi. Certamente, l'introduzione di ruxolitinib nel trattamento dei pazienti con MF ha radicalmente modificato la gestione attuale ed ha arrecato miglioramenti clinici non altrimenti ottenibili con la terapia non-trapiantologica precedentemente disponibile. È lecito attendersi anche che l'ulteriore espansione delle conoscenze sui meccanismi fisiopatologici alla base delle MPN possa tradursi nell'identificazione di nuovi bersagli disponibili per farmaci mirati.

Bibliografia

1. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(3):171-191.
2. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood.* 1951;6(4):372-375.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al ed. WHO classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2008;1-439
4. Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2014;28(7):1407-1413.
5. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res.* 2007;31(6):737-740.
6. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the international working group for myelofibrosis research and treatment. *Leukemia.* 2008;22(2):437-438.
7. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005;434(7037):1144-1148.
8. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005;365(9464):1054-1061.
9. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005;7(4):387-397.
10. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1779-1790.
11. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(9):673-683.
12. Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature.* 2009;461(7265):819-822.
13. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2007;356(5):459-468.
14. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood.* 2011;117(10):2813-2816.
15. Oh ST, Simonds EE, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, Jr., et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010;116(6):988-992.
16. Spolverini A, Pieri L, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Fanelli T, Paoli C, et al. Infrequent occurrence of mutations in the PH domain of LNK in patients with JAK2 mutation-negative 'idiopathic' erythrocytosis. *Haematologica.* 2013;98(9):e101-e102.
17. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 2006;3(7):e270.
18. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood.* 2008;112(3):844-847.
19. Pardanani A, Guglielmelli P, Lasho TL, Pancrazzi A, Finke CM, Vannucchi AM, et al. Primary myelofibrosis with or without mutant MPL: comparison of survival and clinical features involving 603 patients. *Leukemia.* 2011;25(12):1834-1839.
20. Liu K, Martini M, Rocca B, Amos CI, Teofili L, Giona F, et al. Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in 8 Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia. *Haematologica.* 2009;94(10):1368-74.
21. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2391-2405.
22. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2379-2390.
23. Vannucchi AM, Rotunno G, Bartalucci N, Raugi G, Carrai V, Balliu M, et al. Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia.* 2014;28(9):1811-1818.
24. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2011;118(7):1723-1735.
25. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood.* 2011;118(19):5227-5234.
26. Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, et al. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia.* 2012;26(3):475-480.
27. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2013;27(9):1861-1869.
28. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood.* 2009;113(13):2895-2901.
29. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS Plus: A refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol.* 2011;29(4):392-397.
30. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia.* 2014;28(9):1804-1810.
31. Harrison C, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovska V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012;366(9):787-798.
32. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012;366(9):799-807.
33. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2010;363(12):1117-1127.
34. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. The clinical benefit of ruxolitinib across patient subgroups: analysis of a placebo-controlled, Phase III study in patients with myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2013;161(4):508-16.
35. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. Efficacy, safety, and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 3 year follow up of COMFORT-I. *Haematologica.* 2015;100(4):479-88.
36. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjan J-J, Al-Ali HK, Sirulnik A, Stalbovska V, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood.* 2013;122(25):4047-4053.
37. Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, Catalano JV, Deininger MW, Shields AL, et al. Effect of Ruxolitinib Therapy on Myelofibrosis-Related Symptoms and Other Patient-Reported Outcomes in COMFORT-I: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Clin Oncol* 2013;31(10):1285-1292.
38. Verstovsek S. Tips on using ruxolitinib in everyday practice as a therapy for myelofibrosis. *Leuk Lymphoma.* 2013;55(1):5-6.
39. Talpaz M, Paquette R, Afrin L, Hamburg SI, Prchal JT, Jamieson K, et al. Interim analysis of safety and efficacy of ruxolitinib in patients with myelofibrosis and low platelet counts. *J Hematol Oncol.* 2013;6(1):81.
40. Wysham NG, Sullivan DR, Allada G. An opportunistic infection associated with ruxolitinib, a novel janus kinase 1,2 inhibitor. *Chest.* 2013;143(5):1478-1479.
41. Goldberg RA, Reichel E, Oshry LJ. Bilateral toxoplasmosis retinitis associated with ruxolitinib. *N Engl J Med.* 2013;369(7):681-683.
42. Wathes R, Moule S, Milojkovic D. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Associated with Ruxolitinib. *N Engl J Med.* 2013;369(2):197-198.
43. Massa M, Rosti V, Campanelli R, Fois G, Barosi G. Rapid and long-lasting decrease

- of T regulatory cells in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. *Leukemia*. 2014;28(2):449-51.
44. Heine A, Held SAE, Daecke SN, Wallner S, Sajnanarayana SP, Kurts C, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood*. 2013;122(7):1192-202.
 45. Tefferi A. Ruxolitinib targets DCs: for better or worse? *Blood*. 2013;122(7):1096-7.
 46. Heine A, Brossart P, Wolf D. Ruxolitinib is a potent immunosuppressive compound: is it time for anti-infective prophylaxis? *Blood*. 2013;122(23):3843-4.
 47. Tefferi A, Pardanani A. Serious adverse events during ruxolitinib treatment discontinuation in patients with myelofibrosis. *Mayo Clin Proc*. 2011;86(12): 1188-1191.
 48. Benjamini O, Jain P, Estrov Z, Kantarjian HM, Verstovsek S. Therapeutic effects of ruxolitinib in patients with myelofibrosis without clinically significant splenomegaly. *Blood*. 2012;120(13):2768-2769.
 49. Tabarrokhi A, Lindner DJ, Visconte V, Zhang L, Rogers HJ, Parker Y, et al. Ruxolitinib leads to improvement of pulmonary hypertension in patients with myelofibrosis. *Leukemia*. 2014;28(7):1486-93.
 50. Wilkins BS, Radia D, Woodley C, Farhi SE, Keohane C, Harrison CN. Resolution of bone marrow fibrosis in a patient receiving JAK1/JAK2 inhibitor treatment with ruxolitinib. *Haematologica*. 2013;98(12):1872-1876.
 51. Molica M, Serrao A, Saracino R, Zacheo I, Stingone C, Alimena G, et al. Disappearance of fibrosis in secondary myelofibrosis after ruxolitinib treatment: new endpoint to achieve? *Ann Hematol*. 2014;93(11):1951-1952.
 52. Vannucchi AM, Hagop K, Kiladjian J-J, Gotlib J, Cervantes F, Mesa RA, et al. A Pooled Overall Survival Analysis of The COMFORT Studies: 2 Randomized Phase 3 Trials of Ruxolitinib For The Treatment of Myelofibrosis. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2013; 122(21):2820.
 53. Guglielmelli P, Biamonte F, Rotunno G, Artuso V, Artuso L, Bernardis I, et al. Impact of mutational status on outcomes in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib in the COMFORT-II Study. *Blood*. 2014;123(10):2157-2160.
 54. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010;115(9):1703-1708.
 55. Passamonti F, Maffioli M, Cervantes F, Vannucchi A, Morra E, Barbui T, et al. Impact of ruxolitinib on the natural history of primary myelofibrosis: a comparison of the DIPSS and the COMFORT-2 cohorts. *Blood*. 2014;123(12):1833-1835.
 56. Tefferi A. JAK inhibitors for myeloproliferative neoplasms: clarifying facts from myths. *Blood*. 2012;119(12):2721-2730.
 57. Barosi G, Zhang MJ, Gale RP. Does ruxolitinib improve survival of persons with MPN-associated myelofibrosis? Should it? *Leukemia*. 2014;28(11):2267-70.
 58. Passamonti F, Vannucchi AM, Cervantes F, Harrison C, Morra E, Kantarjian H, et al. Ruxolitinib and survival improvement in patients with myelofibrosis. *Leukemia*. 2015;29(3):739-740.
 59. Talpaz M, Jamieson C, Gabrail NY, Lebedinsky C, Gao G, Liu F, et al. A Phase II Randomized Dose-Ranging Study of the JAK2-Selective Inhibitor SAR302503 in Patients with Intermediate-2 or High-Risk Primary Myelofibrosis (MF), Post-Polycythemia Vera (PV) MF, or Post-Essential Thrombocythemia (ET) MF. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012;120(21):2837.
 60. Pardanani A, Harrison CN, Cortes JE, Cervantes F, Mesa RA, Milligan D, et al. Results Of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study (JAKARTA) Of The JAK2-Selective Inhibitor Fedratinib (SAR302503) In Patients With Myelofibrosis (MF). *ASH Annual Meeting Abstracts* 2013; 122(21):393.
 61. Schaap NP, Zweegman S, Jourdan E, Kiladjian J-J, Cervantes F, Niederwieser D, et al. Efficacy and safety of fedratinib (SAR302503/TG101348) in patients with intermediate- or high-risk myelofibrosis (mf), post-polycythemia vera (pv) mf, or post-essential thrombocythemia (et) mf previously treated with ruxolitinib: interim results from a phase II study (JAKARTA-2). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2013; 122(21): 661.
 62. Zhang Q, Zhang Y, Diamond S, Boer J, Harris JJ, Li Y, et al. The Janus Kinase 2 Inhibitor Fedratinib Inhibits Thiamine Uptake: A Putative Mechanism for the Onset of Wernicke's Encephalopathy. *Drug Metab Dispos*. 2014;42(10): 1656-1662.
 63. Verstovsek S, Tam CS, Wadleigh M, Sokol L, Smith CC, Bui LA, et al. Phase I evaluation of XL019, an oral, potent, and selective JAK2 inhibitor. *Leukemia Research*. 2014;38(3):316-322.
 64. Abdelrahman RA, Begna KH, Al-Kali A, Hogan WJ, Litzow MR, Pardanani A, et al. Momelotinib treatment-emergent neuropathy: prevalence, risk factors and outcome in 100 patients with myelofibrosis. *Brit J Haematol*. 2015;169(1):77-80.
 65. Pardanani A, George G, Lsho T, Hogan WJ, Litzow MR, Begna K, et al. A Phase I/II Study of CYT387, An Oral JAK-1/2 Inhibitor, In Myelofibrosis: Significant Response Rates In Anemia, Splenomegaly, and Constitutional Symptoms. *Blood*. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:(21):460.
 66. Pardanani A, Laborde RR, Lasho TL, Finke C, Begna K, Al-Kali A, et al. Safety and efficacy of CYT387, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(6):1322-1327.
 67. Pardanani A, Abdelrahman RA, Finke C, Lasho TT, Begna KH, Al-Kali A, et al. Genetic determinants of response and survival in momelotinib-treated patients with myelofibrosis. *Leukemia*. 2015;29(3):741-744.
 68. Komrokji RS, Seymour JF, Roberts AW, Wadleigh M, To LB, Scherber R, et al. Results of a phase 2 study of pacritinib (SB1518), a JAK2/JAK2(V617F) inhibitor, in patients with myelofibrosis; *Blood*. 2015;125(17):2649-55.
 69. Talpaz M, Gupta V, Savona M, Coughlin P, Winton E, Hunter D, et al. An Open-Label, Phase II Study of The JAK1 Inhibitor INCB039110 In Patients With Myelofibrosis. *Blood*. 2013;122(21):663.
 70. Meyer SC, Keller MD, Chiu S, Koppikar P, Guryanova OA, Rapaport F, et al. CHZ868, a type II JAK2 inhibitor, reverses type I JAK inhibitor persistence and demonstrates efficacy in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Cell*. 2015;28(1):15-28.
 71. Vannucchi AM. How I treat Polycythemia vera. *Blood* 2014;124(22):3212-3220.
 72. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al. Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera. *N Engl J Med*. 2013;368(1):22-33.
 73. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):761-770.
 74. Barosi G, Besses C, Birgegard G, Briere J, Cervantes F, Finazzi G, et al. A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia*. 2007;21(2):277-280.
 75. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch H, et al. A unified definition of clinical resistance and intolerance to hydroxycarbamide in polycythemia vera and primary myelofibrosis: results of a European LeukemiaNet (ELN) consensus process. *Br J Haematol*. 2010;148(6):961-963.
 76. Alvarez-Larran A, Pereira A, Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Hernandez-Boluda JC, Ferrer-Marin F, et al. Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood*. 2012;119(6):1363-1369.
 77. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005;353(1):33-45.
 78. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka H-M, et al. Anagrelide compared to hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013;121(10): 1720-8.
 79. Christoforidou A, Pantelidou D, Anastasiadis A, Goutzouvelidis A, Margaritis D, Kotsianidis I, et al. Hydroxyurea and anagrelide combination therapy in patients with chronic myeloproliferative diseases resistant or intolerant to monotherapy. *Acta Haematol*. 2008;120(4):195-198.
 80. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, et al. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*. 2009;113(20):4829-4833.
 81. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, Barosi G, Rosen PJ, Rumi E, et al. A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer*. 2014; 120(4):513-520.
 82. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, Barosi G, Rumi E, Gattoni E, et al. Long-Term Results from a Phase II Open-Label Study of Ruxolitinib in Patients with Essential Thrombocythemia Refractory to or Intolerant of Hydroxyurea. *Blood*. 2014;124(21):1847-1847.

83. Pieri L, Pancrazzi A, Pacilli A, Rabuzzi C, Rotunno G, Fanelli T, et al. JAK2V617F complete molecular remission in polycythemia vera/essential thrombocythemia patients treated with ruxolitinib *Blood*. 2015;125(21):3352-3353.
84. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *N Engl J Med*. 2015;372(5):426-435.
85. Durrant S, Koren-Michowitz M, Lavie D, Martinez-Lopez J, Vannucchi AM, Passamonti F, et al. HARMONY: An Open-Label, Multicenter, 2-Arm, Dose-Finding, Phase 1b Study of the Combination of Ruxolitinib and Buparlisib (BKM120) in Patients with Myelofibrosis (MF). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2014;124:710.
86. Gupta V, Koschmieder S, Harrison CN, Cervantes F, Heidel FH, Drummond M, et al. Phase 1b Dose-Escalation Study of Sonidegib (LDE225) in Combination with Ruxolitinib (INC424) in Patients with Myelofibrosis. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2014;124:712.
87. Kiladjian J-J, Heidel FH, Vannucchi AM, Ribrag V, Passamonti F, Hayat A, et al. Efficacy, Safety, and Confirmation of the Recommended Phase 2 Dose of Ruxolitinib Plus Panobinostat in Patients with Intermediate or High-Risk Myelofibrosis. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2014;124:711.
88. Guerini V, Barbui V, Spinelli O, Salvi A, Dellacasa C, Carobbio A, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 selectively targets cells bearing mutated JAK2(V617F). *Leukemia*. 2008;22(4):740-747.
89. Rambaldi A, Dellacasa CM, Finazzi G, Carobbio A, Ferrari ML, Guglielmelli P, et al. A pilot study of the Histone-Deacetylase inhibitor Givinostat in patients with JAK2V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2010;150(4):446-455.
90. Finazzi G, Vannucchi AM, Martinelli V, Ruggeri M, Nobile F, Specchia G, et al. A phase II study of Givinostat in combination with hydroxycarbamide in patients with polycythaemia vera unresponsive to hydroxycarbamide monotherapy. *Br J Haematol*. 2013;161(5):688-694.
91. Andersen CL, McMullin MF, Ejerblad E, Zweegman S, Harrison C, Fernandes S, et al. A phase II study of vorinostat (MK-0683) in patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2013;162(4):498-508.
92. Mascarenhas J, Lu M, Li T, Petersen B, Hochman T, Najfeld V, et al. A phase I study of panobinostat (LBH589) in patients with primary myelofibrosis (PMF) and post-polycythaemia vera/essential thrombocythaemia myelofibrosis (post-PV/ET MF). *Br J Haematol*. 2013;161(1):68-75.
93. Tefferi A, Begna K, Laborde RR, Patnaik MM, Lasho TL, Zblewski D, et al. Imetelstat, a telomerase inhibitor, induces morphologic and molecular remissions in myelofibrosis and reversal of bone marrow fibrosis. *Blood* 2013;122(21):662.
94. Verstovsek S, Mesa RA, Foltz LM, Gupta V, Mascarenhas JO, Ritchie EK, et al. Phase 2 Trial of PRM-151, an Anti-Fibrotic Agent, in Patients with Myelofibrosis: Stage 1 Results. *EHA Annual Meeting, Oral Presentation* 2014.

Parole Chiave

Neoplasie mieloproliferative, policitemia vera, mielofibrosi, JAK2, ruxolitinib

Indirizzi per la corrispondenza

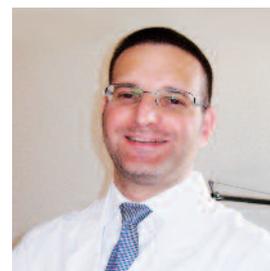
Alessandro M. Vannucchi

CRIMM, Centro Ricerca e Innovazione per le Malattie Mieloproliferative
Azienda Ospedaliera-Universitaria Careggi,
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica
Università degli Studi di Firenze, Largo Brambilla 3
50134 Firenze, Italia - Tel 055.7947688
E-mail: amvannucchi@unifi.it

Ringraziamenti

Si ringrazia l'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) che ha finanziato un progetto "5 per Mille" (www.progettoagimm.it) dedicato alla ricerca traslazionale e clinica nelle neoplasie mieloproliferative croniche; molti degli studi effettuati nell'ambito del progetto AGIMM sono citati in questa rassegna.

Linfomi maligni



Davide Rossi

Divisione di Ematologia, Dipartimento di Medicina Traslazionale, Università degli Studi del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro, Novara, Italia

Introduzione

I linfomi sono tra i 10 tumori più comuni in Europa (UE), con una media stimata di circa 19 nuove diagnosi all'anno ogni 100.000 cittadini e colpiscono principalmente i soggetti anziani. Anche se il trattamento dei linfomi ha mostrato nel corso degli anni miglioramenti significativi, a livello dell'UE si stima che circa 190.000 soggetti muoiano ogni anno di queste malattie (3% di tutti i decessi, e circa 35% dei decessi per tumori ematologici).

Recentemente, i progressi tecnologici nel campo della genomica hanno portato ad un miglioramento nella comprensione delle basi molecolari e biologiche dei linfomi. Un aspetto sempre più importante emerso dagli studi di genomica è che le cellule linfoidi maligne alterano l'espressione genica manipolando i meccanismi di regolazione epigenetica dei geni e manipolano le vie di segnalazione centrali per l'omeostasi della loro controparte normale, comprese le vie di segnalazione del *B-cell receptor*, di PI3K/AKT/mTOR, di JAK-STAT, dei recettori Toll-like e di NOTCH.

Nell'era della medicina personalizzata, la sfida sarà trattare i pazienti affetti da linfoma con una terapia molecolare mirata alla composizione genetica e clonale di ogni singolo tumore. I *pathways* che vengono deregolati da mutazioni possono diventare obiettivi interessanti per l'intervento terapeutico nei tumori linfoidi. Consistentemente, inibitori di alcuni di questi *pathways* sono attualmente in studio clinico o stanno già entrando nella pratica clinica per la cura dei linfomi. L'articolo mira a descrivere le vie di segnalazione colpite da mutazioni nei tumori linfoidi ed il loro ruolo nello sviluppo di terapie bersaglio per i linfomi.

Inibitori delle tirosin-chinasi del *B-cell receptor signaling*

Il recettore delle cellule B, o BCR (*B-Cell Receptor*), è una proteina recettoriale transmembrana situata sulla superficie dei linfociti B e composta da una immunoglobulina di superficie ancorata alla membrana (IgM) e non covalentemente legata all'eterodimero CD79A/CD79B. Quando IgM lega l'antigene, i residui di tirosina nella por-

zione citoplasmatica ITAM di CD79A e CD79B vengono fosforilati dalle chinasi della famiglia Src, tra le quali è compresa LYN. La tirosina chinasi SYK, attivata dal legame con i domini ITAM fosforilati di CD79A e CD79B, innesca una cascata di segnali che coinvolge la tirosina chinasi BTK (*Bruton's tyrosine kinase*). BTK forma un complesso con BLNK e la fosfolipasi C γ 2 (PLC γ 2), inducendo la produzione di un secondo messaggero, il diacilglicerolo, che attiva la proteina chinasi C β (PKC β). PKC β porta alla fosforilazione di *CARD11* e all'attivazione della via di segnalazione di NF- κ B⁽¹⁻²⁾. BTK e PI3K δ sono due tirosina chinasi chiave nella via di segnale del BCR, oltre che di altre vie di segnale importanti per la proliferazione, sopravvivenza e lo *homing* dei linfociti B. BTK è una tirosina chinasi non-recettoriale che, dopo essere stata attivata dal BCR, aumenta l'attività di NF- κ B⁽³⁻⁷⁾. BTK è anche una molecola di segnalazione chiave a valle dei recettori delle chemochine CXCR4 e CXCR5⁽⁸⁾ e dei *Toll-Like Receptors* (TLR)^(9,10). Le fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) sono proteine eterodimeriche costituite da una subunità catalitica e da una regolatoria. Sono distinte in tre classi di PI3K (classe I, II e III) in base ai domini proteici che le costituiscono e ne determinano la specificità. Le PI3K di classe I catalizzano il trasferimento di un gruppo γ -fosforico dell'ATP sulla posizione D3 del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P2) producendo così fosfatidilinositolo-3,4,5 trifosfato (PtdIns(3,4,5)P3) il quale a sua volta funge da ligando per reclutare, sulla faccia interna della membrana cellulare, proteine contenenti domini *Pleckstrin Homology* (PH)^(11,12). L'isoforma PI3K δ coopera nella segnalazione del BCR attivando componenti chiave di questa via, compresi BTK, PLC γ 2, e AKT.

La via di segnale di BCR è spesso deregolata da lesioni genetiche nel linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) e nella macroglobulinaemia di Waldenstrom (WM)^(13,14) (Figura 1 e 2).

I meccanismi genetici che contribuiscono alla deregolazione della via di segnalazione di BCR nel DLBCL includono mutazioni somatiche che colpiscono i geni *CARD11* e *CD79B* nel 30% dei casi^(13,15) (Figura 2).

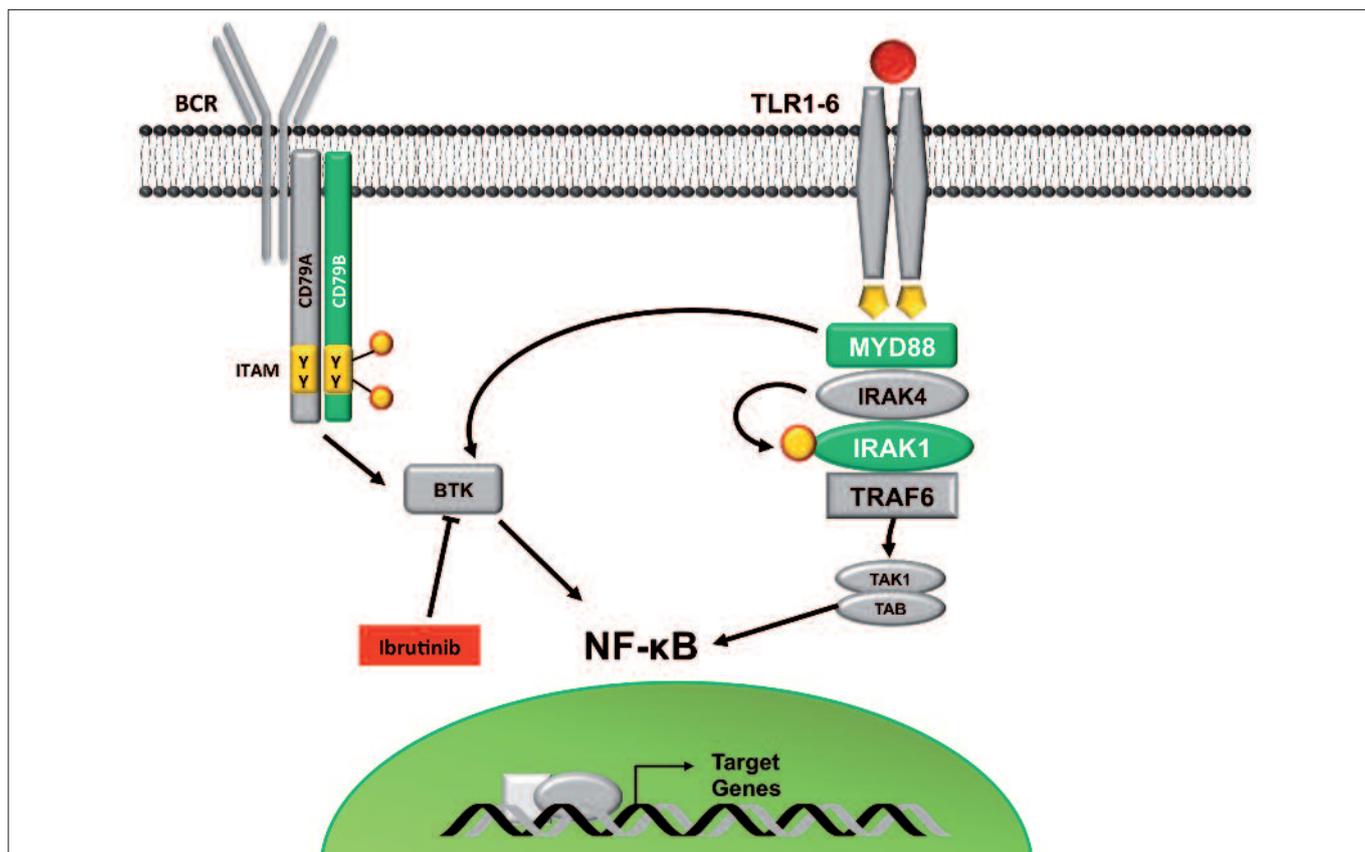


Figura 1 – Inibitori di BTK. Ibrutinib è un inibitore della tirosina BTK che agisce creando un legame irreversibile sul residuo C481 della proteina nel dominio catalitico. In verde vengono segnalati i geni mutati nei linfomi.

Le mutazioni in *CD79B* mostrano due effetti funzionali: in primo luogo rendono il BCR resistente alla regolazione negativa del *signaling* da parte della chinasi LYN, in secondo, migliorano l'espressione del BCR prolungandone il segnale⁽¹⁶⁾. Nelle cellule B normali, quando il BCR lega l'antigene, si avvia una cascata di segnali che portano all'attivazione e alla fosforilazione di *CARD11*. *CARD11*, assieme con BCL10 e MALT1, partecipa al complesso di segnalazione CBM che è essenziale per attivare il *pathway* di NF-κB a valle del BCR. Le mutazioni che interessano *CARD11* nei pazienti DLBCL hanno come conseguenza la attivazione costitutiva di *CARD11*, la spontanea e BCR indipendente multidimerizzazione *CARD11* e l'associazione di quest'ultimo con altri componenti del complesso CBM, determinando in ultima analisi una sovraregolazione del *pathway* di NF-κB⁽¹³⁾. Il 90% di pazienti affetti da WM porta mutazioni attivanti MYD88, una proteina di segnale a valle del TLR⁽¹⁷⁾. La proteina MYD88 mutante è in grado di legare e stabilizzare la forma attiva di BTK, con successiva attivazione del *pathway* del BCR e di NF-κB a valle⁽¹⁷⁾ (Figura 1).

Nei tumori dei linfociti B maturi, oltre che da lesioni genetiche, la via del BCR può essere attivata anche tramite interazioni del BCR con gli antigeni presenti nel microambiente. Tale meccanismo di attivazione del BCR è predominante nella leucemia linfatica cronica ed è stato ipotizzato che operi anche nel contesto del linfoma mantellare (MCL), che, seppure in assenza di lesioni genetiche in queste

vie, mostra un'attivazione costitutiva di NF-κB e AKT a valle del BCR^(18,19).

Ibrutinib è un inibitore della tirosina BTK che agisce creando un legame irreversibile sul residuo C481 del dominio catalitico della proteina. Ibrutinib è attivo in monoterapia in pazienti affetti da MCL, DLBCL e WM⁽²⁰⁾ (Figura 1). Nel MCL recidivato-refrattario, il trattamento con ibrutinib produce un tasso di risposte globali pari a 68%, un tasso di remissioni complete pari a 21% ed una sopravvivenza libera da progressione di 18 mesi. Nel DLBCL recidivato refrattario, il trattamento con ibrutinib produce un tasso di risposte globali pari a 60%, un tasso di remissioni complete pari a 16% ed una sopravvivenza libera da progressione di 3 mesi. Nella WM recidivata refrattaria, il trattamento con ibrutinib produce un tasso di risposte globali pari a 83%, un tasso di remissioni complete pari a 54% ed una sopravvivenza libera da progressione pari a 80% a 24 mesi⁽²¹⁻²³⁾.

Alcuni pazienti mostrano resistenza al trattamento con ibrutinib, che può esser in parte spiegata da lesioni genetiche che attivano il *pathway* indipendentemente da BTK. Nei DLBCL, le alterazioni a carico del gene *CARD11* sono predittive di resistenza al trattamento con ibrutinib. Infatti, le mutazioni in *CARD11* vanno ad attivare la via di segnalazione di NF-κB a valle di BTK⁽¹⁶⁾. Con lo stesso meccanismo, mutazioni attivanti il *pathway* non-canónico di NF-κB, tra cui le mutazioni che interessano il gene *BIRC3*, potrebbero spie-

gare la resistenza ad ibrutinib in alcuni pazienti affetti da MCL⁽²⁴⁾. Inoltre, mutazioni di *CXCR4* che attivano la via di segnalazione di AKT in maniera BTK indipendente si associano ad una minore risposta al farmaco nei pazienti affetti da WM⁽²⁵⁾ (Figura 1-2). Idelalisib è un'inibitore selettivo di PI3K δ ⁽²⁶⁻²⁷⁾ che agisce legando il dominio catalitico di PI3K δ e impedendo la fosforilazione e la successiva attivazione di AKT e mTOR.⁽²⁸⁾ (Figura 2). Idelalisib ha mostrato di essere attivo in pazienti affetti da MCL e da linfoma non-Hodgkin indolente (iNHL)⁽²⁰⁾. Nel MCL recidivato-refrattario, il trattamento con idelalisib produce un tasso di risposte globali pari a 40%, un tasso di remissioni complete pari al 5% ed una sopravvivenza libera da progressione pari a 4 mesi^(29,30). Negli iNHL, il trattamento con idelalisib produce un tasso di risposte globali pari a 47% ed una sopravvivenza libera da progressione a 18 mesi⁽³¹⁻³³⁾.

Inibitori di BCL2

BCL2 appartiene alla famiglia delle proteine BH ed è coinvolto nella inibizione della apoptosi bloccando l'attività destabilizzante il mitocondrio delle proteine pro-apoptotiche BAX e BAK, il conseguente rilascio del citocromo *c* e la attivazione della cascata delle caspasi. Oltre a BCL2, esistono altre proteine della famiglia BH, tra cui BAD e BIM che legano e neutralizzando l'azione anti-apoptotica di BCL2^(34,35). I membri della famiglia BH condividono uno o più dei quattro

domini omologhi caratteristici BH (*BCL2 Homology domains*), chiamati BH1, BH2, BH3 e BH4. I domini BH sono fondamentali per il corretto funzionamento di queste proteine. Le proteine anti-apoptotiche della famiglia BH, come BCL2, presentano tutti e quattro i domini BH. Le proteine pro-apoptotiche della famiglia BH possono invece suddividersi in base al numero di domini BH che possiedono, ed includono proteine con più domini BH, come BAX e BAK e proteine che possiedono solo il dominio BH3, come BAD e BIM e per questo chiamate anche proteine BH3 *only*.

BCL2 è un proto-oncogene frequentemente attivato tramite lesioni molecolari nelle neoplasie linfoidi B, tra cui traslocazioni cromosomiche, amplificazioni nel *locus* genico, o inattivazione dei meccanismi di regolazione post-trascrizionale (i.e. delezione dei microRNA interferenti *BCL2*). La traslocazione cromosomica t(14;18)(q32; q21) sposta l'oncogene *BCL2* sotto il controllo della regione regolatoria del gene per le catene pesanti delle immunoglobuline, e ricorre nell'80% dei casi di linfoma follicolare (FL)^(36,37) ed in una frazione di casi di DLBCL⁽³⁸⁾. La conseguenza della traslocazione t(14;18)(q32; q21) è la sostituzione del promotore fisiologico di *BCL2* con un promotore fortemente acceso nei linfociti B maturi quale il promotore dei geni per le immunoglobuline. Nei DLBCL, oltre che tramite traslocazione, il gene *BCL2* può essere anche sovraespresso tramite amplificazione del *locus*, che ricorre nel 30% dei casi. Ac-

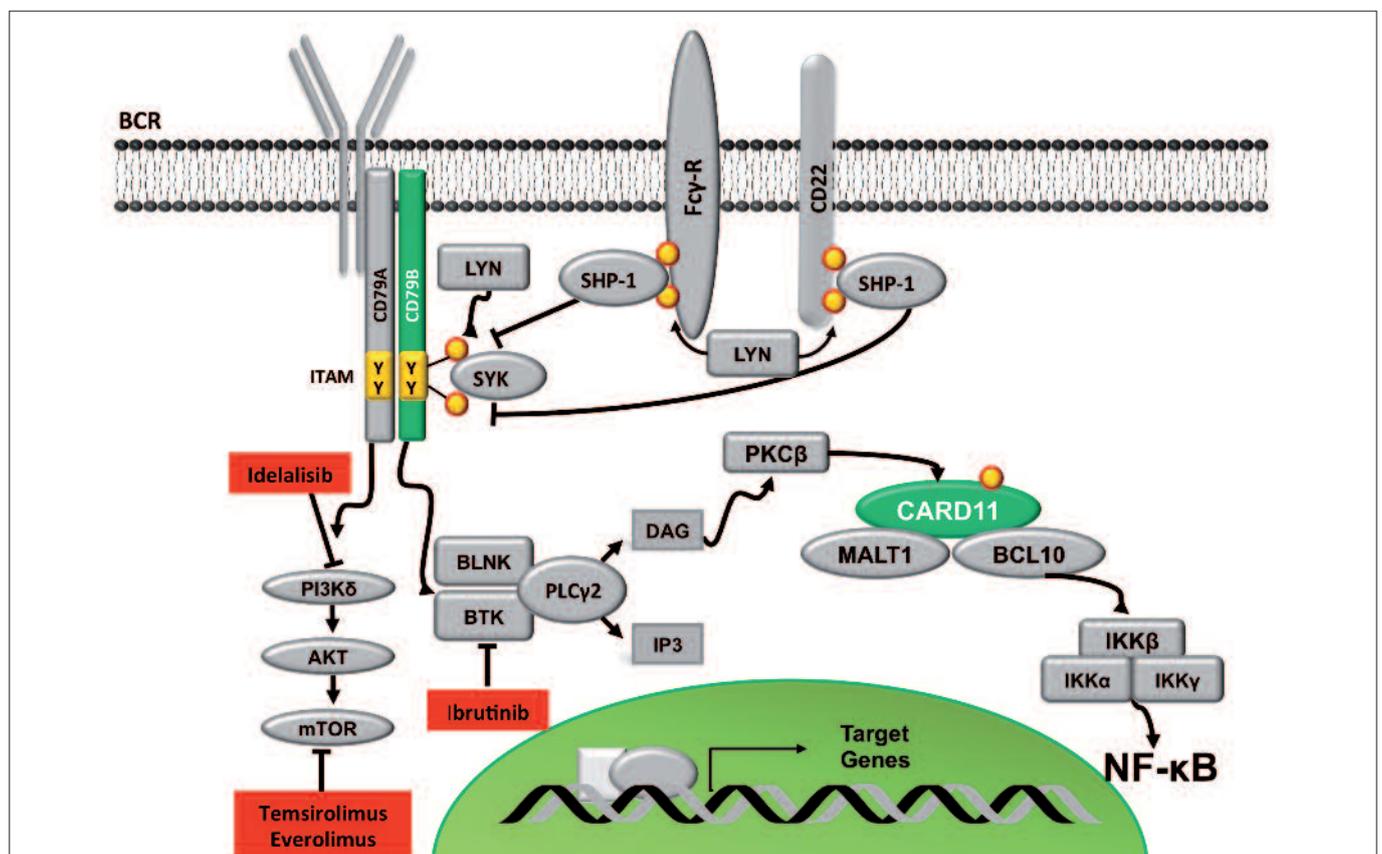


Figura 2 – Inibitori di PI3K δ e mTOR. Idelalisib è un'inibitore selettivo di PI3K δ che agisce legando il dominio catalitico di PI3K δ . Il temsirolimus e everolimus sono farmaci prototipo inibitori della via di mTOR; essi si associano con il recettore intracellulare, che si lega direttamente ad mTOR e inibisce la fosforilazione dei suoi bersagli a valle, impedendo la regolazione della sintesi proteica. In verde vengono segnalati i geni mutati nei linfomi.

canto ai meccanismi genetici di attivazione di BCL2 esistono anche meccanismi epigenetici che contribuiscono alla sua sovraespressione in altri tipi di linfoma come il MCL⁽³⁹⁾ (Figura 3).

Alla luce della sua rilevanza patogenetica, BCL2 è considerato un bersaglio terapeutico nei linfomi. I primi tentativi furono quelli di interferire con l'espressione genica di BCL2 riducendo il livello di proteina sintetizzata. L'oblimersen è un oligonucleotide antisense che lega l'mRNA di BCL2 ed interferisce con la sua traduzione in proteina⁽⁴⁰⁾. Nonostante i promettenti risultati pre-clinici, oblimersen ha mostrato una scarsa efficacia clinica negli studi di fase 1 e 2⁽⁴¹⁾ (Figura 3). Un approccio alternativo è stato quello di inibire direttamente la funzione della proteina BCL2 sfruttando la sua capacità di legare le proteine anti-apoptotiche con dominio BH3-only con farmaci BH3-mimetici. ABT-737 mima l'azione delle proteine BH3-only ed è in grado di legare BCL2 ad alta affinità^(42,43). ABT-737 e il suo analogo orale ABT-263 hanno mostrato una significativa attività pre-clinica in una vasta gamma di tumori ematopoietici, inclusi vari tipi di linfoma^(44,45). Le esperienze cliniche con ABT-263, noto anche come navitoclax, hanno fornito le prime informazioni sul reale potenziale, sui benefici e sulle tossicità di questa classe di agenti nel trattamento di pazienti con neoplasie linfoidi. In uno studio di fase 1 che ha arruolato pazienti affetti da vari tipi di linfoma recidivato e/o refrattario, il tasso di risposta globale dopo trattamento

con navitoclax è stato del 22%⁽⁴⁶⁾. Per quanto riguarda gli effetti collaterali, il trattamento con navitoclax ha indotto una piastrinopenia severa in una frazione significativa di casi. ABT-199 nasce per superare i problemi causati dagli effetti collaterali emersi dagli studi effettuati con navitoclax. Questo farmaco mimetico dell'azione di BH3 lega selettivamente BCL2 e non gli altri membri anti-apoptotici⁽⁴⁷⁾. I primi studi clinici con ABT-199 non hanno mostrato piastrinopenia. *Trial* clinici di fase 1 basati sull'utilizzo di ABT-199 come singolo agente sono attualmente in corso in pazienti con diverse malattie oncoematologiche tra cui i linfomi. Un segnale precoce di particolare efficacia è stato ottenuto nei pazienti affetti da MCL e WM, con un tasso di risposta pari a 82% e 100%, rispettivamente. Come per ABT-737 e navitoclax, anche ABT-199 mostra potente sinergia con vari farmaci anti-tumorali in modelli pre-clinici di MCL e DLBCL a suggerire che la risposta clinica dei farmaci mimetici dei BH3 potrebbe essere maggiore se utilizzati in combinazione con altri agenti antitumorali⁽⁴⁷⁾ (Figura 3).

Inibitori di JAK

Le janus chinasi (JAK) sono una famiglia composta da quattro tirosin-chinasi non recettoriali (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2), tutte coinvolte nella trasduzione del segnale mediato da citochine.

Il reclutamento di citochine o di fattori di crescita da parte dei re-

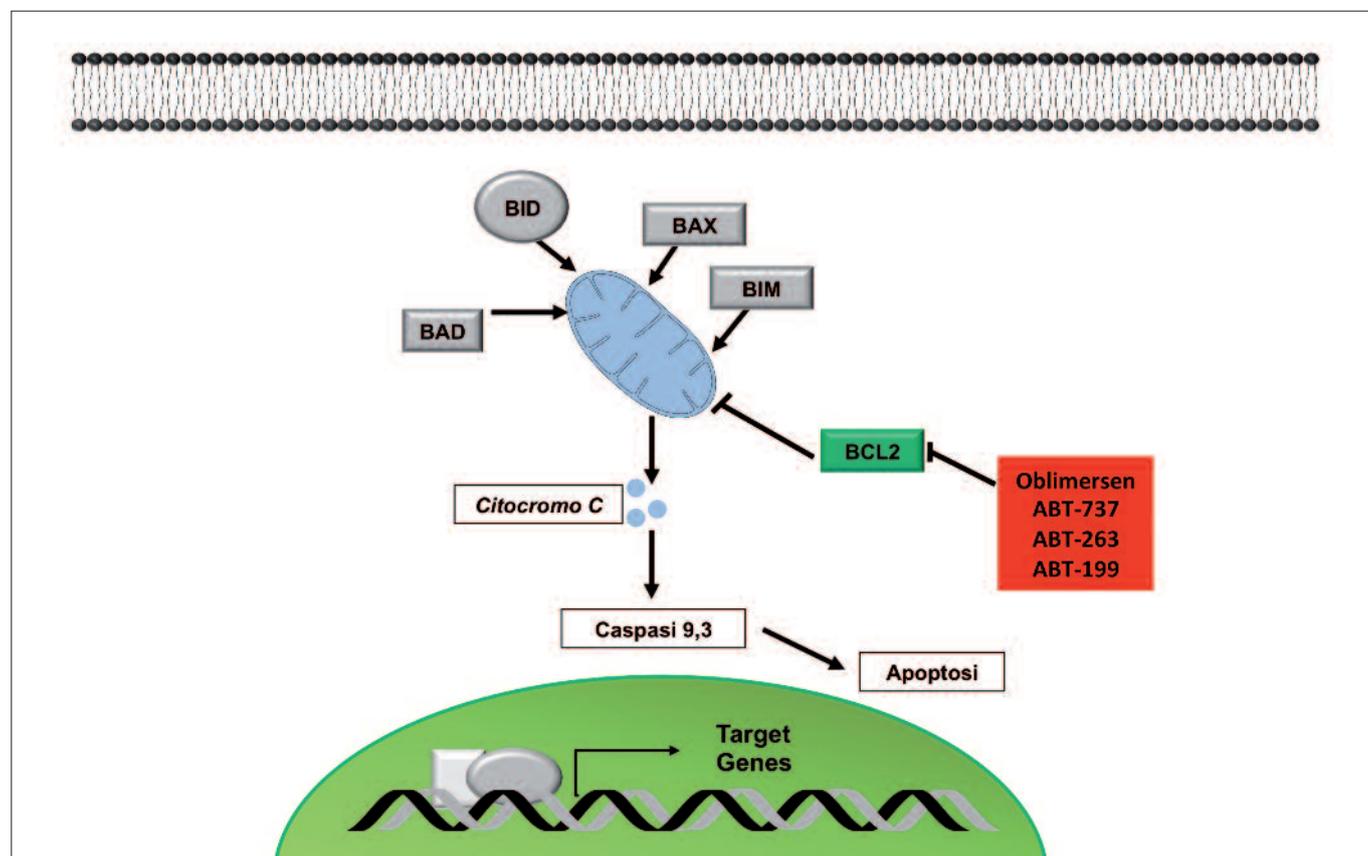


Figura 3 – Inibitori di BCL2. L'oblimersen è un oligonucleotide antisense che lega l'mRNA di BCL2 ed interferisce con la sua traduzione in proteina. ABT-737, ABT-263 e ABT-199 inibiscono direttamente la funzione della proteina BCL2 sfruttando la loro capacità di legare le proteine anti-apoptotiche con dominio BH3-only. In verde vengono segnalati i geni mutati nei linfomi.

ettori transmembrana porta alla fosforilazione dei membri della famiglia JAK ad essi associati, permettendo il reclutamento e la fosforilazione delle proteine STAT su residui tirosinici (48). Le proteine STAT fosforilate (pSTAT) costituiscono tra loro dei dimeri e migrano nel nucleo, dove regolano l'espressione di un ampio spettro di geni implicati in processi biologici come la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, la risposta immunitaria e l'apoptosi (49).

In considerazione del fatto che il *pathway* JAK-STAT è coinvolto nella patogenesi di diversi tipi di linfoma, tra cui il DLBCL, il FL, il linfoma primitivo del mediastino ed il linfoma di Hodgkin, esso può diventare un bersaglio terapeutico in questo tipo di tumori (50-56). Il pacritinib è un innovativo inibitore selettivo di JAK2 (57). Nel *trial* clinico di fase 1, l'11% dei pazienti affetti da linfoma recidivato e/o refrattario ha ottenuto una remissione parziale della malattia, consistentemente con un segnale della attività di questa molecola nelle malattie linfoproliferative (58-61) (Figura 4).

Inibitori di mTOR

La serina/treonina chinasi mTOR regola i processi di traduzione proteica in risposta a fattori di crescita e nutrienti. La via di trasduzione del segnale della PI3K/AKT/mTOR ha una funzione critica nella proliferazione cellulare, nella progressione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nel metabolismo (62,65).

Il *pathway* di PI3K/AKT/mTOR è costitutivamente attivo nel MCL e rappresenta quindi un bersaglio terapeutico in questo tipo di linfoma (66-70). La rapamicina è il farmaco prototipo inibitore della via di mTOR. La rapamicina si associa con il suo recettore intracellulare, che si lega direttamente ad mTOR e inibisce la fosforilazione dei suoi bersagli a valle, impedendo la regolazione della sintesi proteica. Gli analoghi della rapamicina, (detti anche rapanaloghi), come il temsirolimus e l'everolimus sono stati sviluppati come farmaci anti-tumorali (71). Il temsirolimus e everolimus inibiscono mTOR attraverso l'utilizzo dello stesso meccanismo di azione della rapamicina, ma hanno migliori caratteristiche farmacologiche e sono quindi molecole più adatte all'utilizzo clinico (Figura 2). Nel MCL recidivato e/o refrattario (72,74), il temsirolimus è in grado di indurre un tasso di risposta globale del 40%, tuttavia, la maggior parte delle risposte sono parziali e la durata della risposta di soli 7 mesi.

Inibitori delle γ -secretasi

I geni *NOTCH* codificano per 4 proteine recettoriali transmembrana (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 e NOTCH4), aventi un'ampia porzione extracellulare, coinvolta nell'interazione con i ligandi ed una coda intracitoplasmatica, responsabile della trasduzione del segnale (76). La famiglia dei geni *NOTCH* è coinvolta nel controllo delle principali tappe differenziative di numerosi tipi cellulari (76).

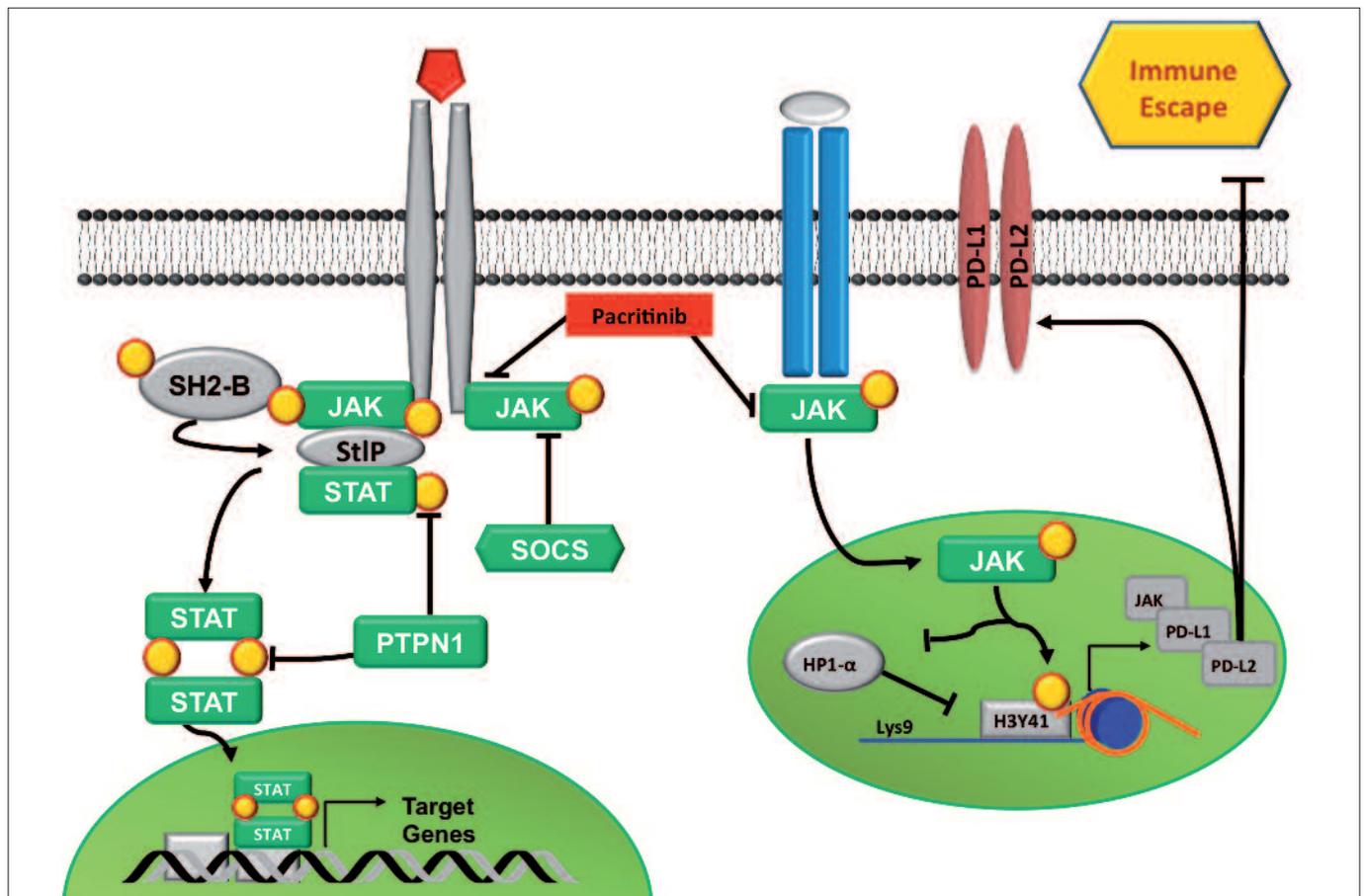


Figura 4 – Inibitori di JAK. Il pacritinib è un inibitore selettivo di JAK2. In verde vengono segnalati i geni mutati nei diversi tipi di linfoma.

Quando i recettori NOTCH interagiscono con i loro ligandi attraverso la subunità extracellulare, vengono avviati due tagli proteolitici consecutivi che conducono ad attivazione della via. Dopo l'attivazione, la porzione intracellulare tagliata dal recettore di NOTCH trasloca nel nucleo dove forma un complesso con il fattore di trascrizione RBPJ, che, in assenza del segnale di NOTCH, agisce come soppressore della trascrizione ⁽⁷⁶⁾. Il meccanismo più importante di soppressione del segnale di NOTCH è gestito dal dominio PEST. Il dominio PEST di NOTCH una volta attivato è riconosciuto dalla proteina ubiquitina ligasi FBXW7 che blocca il segnale di NOTCH indirizzandolo verso il proteasoma per la sua degradazione ^(77,78).

I geni della via NOTCH sono mutati nel 40% dei pazienti con linfoma splenico della zona marginale (SMZL). *NOTCH2* mostra mutazioni ricorrenti nel 20-25% di pazienti affetti da SMZL, indicando *NOTCH2* come il gene più frequentemente mutato in questo tipo di linfoma ^(79,81). *NOTCH1*, un paralogo di *NOTCH2*, è mutato nel 5% dei casi di SMZL. Le mutazioni in *NOTCH2* e *NOTCH1* troncano il dominio PEST causando un'alterata degradazione delle proteine *NOTCH2* e *NOTCH1* e rendendo il *pathway* di NOTCH costitutivamente attivo. Gli inibitori dell'enzima γ -secretasi (GSIs), agiscono interferendo con il meccanismo di attivazione di NOTCH e si sono dimostrati attivi in modelli pre-clinici di tumori linfoidi con attivazione molecolare di NOTCH ⁽⁸²⁾. Un'altra classe di agenti in fase di sviluppo sono gli mAb (anticorpi monoclonali) contro i

recettori o i ligandi di *NOTCH*. Si spera che questa categoria di farmaci possa ridurre alcune delle tossicità associate all'utilizzo dei farmaci GSIs ⁽⁸³⁾ (Figura 5).

Farmaci epigenetici

I meccanismi di regolazione epigenetica sono colpiti da mutazioni in numerosi tipi di linfoma. Tra questi i geni più frequentemente coinvolti sono *CREBBP*, *EP300*, *EZH2*, e *MLL2*, ampiamente mutati nel DLBCL e nel FL ^(84,85).

CREBBP ed EP300 sono due proteine nucleari con attività acetiltransferasica coinvolte nella regolazione della trascrizione genica. CREBBP ed EP300 funzionano come coattivatori di un gran numero di fattori di trascrizione coinvolti in diversi *pathway* di segnalazione e di sviluppo cellulare, modificando mediante acetilazione i residui di lisina presenti sia sulle proteine istoniche che nucleari ^(86,87). Nel DLBCL e nel FL, *CREBBP* presenta eventi mutazionali di tipo *loss of function* che colpiscono prevalentemente il dominio con attività di istone acetilasi. La perdita dell'attività acetilasica di CREBBP induce ad una mancata acetilazione di target quali l'oncosoppressore TP53, che viene in questo modo soppresso, ed il proto-oncogene BCL6, che viene in questo modo attivato ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. EZH2 è una proteina con attività di metil-transferasi coinvolta nella linfomagenesi ⁽⁸⁹⁾. EZH2 media la repressione della trascrizione attraverso la sua attività di istone metiltransferasi trasferendo gruppi metilici sulla

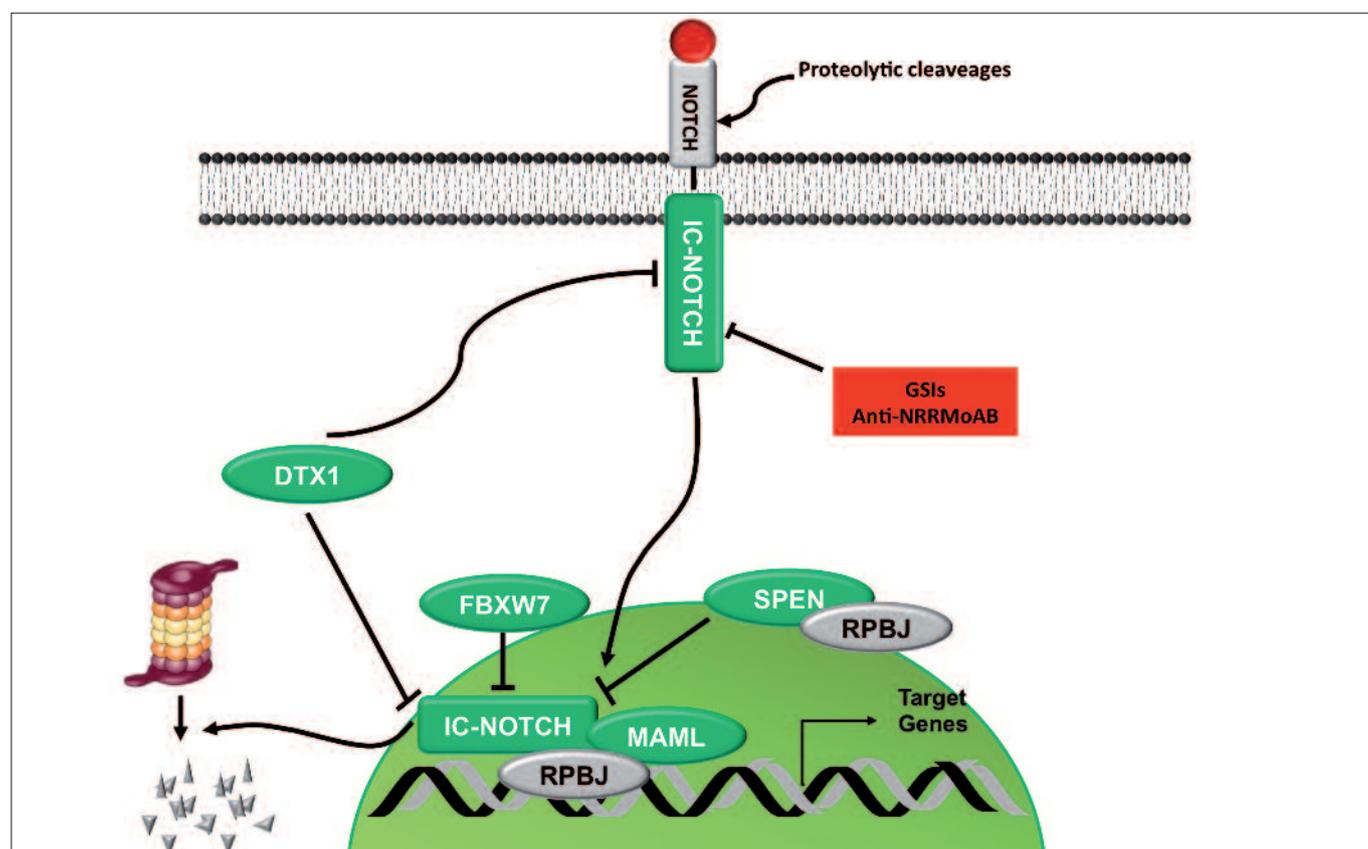


Figura 5 – Inibitori delle γ -secretasi. Gli inibitori dell'enzima γ -secretasi (GSIs), agiscono interferendo con il meccanismo di attivazione di NOTCH, inibendone la sua funzione in maniera mirata. In verde vengono segnalati i geni mutati nei linfomi.

lisina 27 dell'istone H3⁽⁹⁰⁾. Nel DLBCL sono state individuate mutazioni missenso che colpiscono prevalentemente il dominio SET di *EZH2* e che causano una up-regolazione della proteina ed una ipermetilazione degli istoni⁽⁸⁹⁾. La conseguenza funzionale delle mutazioni di *EZH2* è il silenziamento di una coorte di geni importanti nel controllo della proliferazione delle cellule B del centro germinativo. Diversi farmaci epigenetici sono in studio nei linfomi, tra cui gli inibitori delle istone deacetilasi (HDACis), gli inibitori delle istone metil-trasferasi (HTM) e gli inibitori del bromodomain (BRD). Nonostante gli inibitori delle HDAC abbiano mostrato una promettente attività pre-clinica nei linfomi, gli studi clinici hanno mostrato una limitata efficacia di queste molecole e selettivamente ristretta ad alcuni tipi tumorali. Sarà importante nel futuro verificare se le risposte a questi farmaci segreghino all'interno dei casi che portano mutazioni dei geni della regolazione epigenetica. Studi pre-clinici hanno supportato lo sviluppo clinico, attualmente in corso, degli inibitori HMT nel trattamento dei linfomi che portano mutazioni negli enzimi istone metil-trasferasi (HMT) come *EZH2*⁽⁸⁹⁻⁹²⁾.

Bibliografia

1. Thome M, Charton JE, Pelzer C, Hailfinger S. Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(9):a003004.
2. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 2012;120(6):1175-1184.
3. Aoki Y, Isselbacher KJ, Pillai S. Bruton tyrosine kinase is tyrosine phosphorylated and activated in pre-B lymphocytes and receptor-ligated B cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1994; 91(22):10606-10609.
4. Saouaf SJ, Mahajan S, Rowley RB, Kut SA, Fargnoli J, Burkhardt AL, et al. Temporal differences in the activation of three classes of non-transmembrane protein tyrosine kinases following B-cell antigen receptor surface engagement. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1994; 91(20):9524-9528.
5. Bradshaw JM. The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches. *Cell Signal* 2010;22(8):1175-1184.
6. Hyvönen M, Saraste M. Structure of the PH domain and Btk motif from Bruton's tyrosine kinase: molecular explanations for X-linked agammaglobulinemia. *EMBO J*. 1997;16(12): 3396-3404.
7. Väliäho J, Smith CI, Vihinen M. BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum. Mutat.* 2006;27(12):1209-1217.
8. de Gorter DJ, Beuling EA, Kersseboom R, Middendorp S, van Gils JM, Hendriks RW, et al. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase C γ 2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity* 2007;26(1):93-104.
9. Jefferies CA, Doyle S, Brunner C, Dunne A, Brint E, Wietek C, et al. Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor κ B activation by Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 2003;278(28):26258-26264.
10. Marron TU, Martinez-Gallo M, Yu JE, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor 4-, 7-, and 8-activated myeloid cells from patients with X-linked agammaglobulinemia produce enhanced inflammatory cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;129(1):184-190.
11. Martelli AM, Nyakern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutic implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006;20(6):911-28.
12. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(27):489-501.
13. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008;319(5870):1676-1679.
14. Du MQ. MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor- κ B activation. *Histopathology*. 2011;58(1):26-38.
15. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
16. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009;459(7247):717-721.
17. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* 2012;367(9):826-833.
18. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue MH, Pedersen LB, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*. 2011;118(11), 3088-3095.
19. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J. Clin. Invest.* 2012;122(10):3416-3423.
20. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(1): 88-94.
21. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(6):507-516.
22. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(1):88-94.
23. Wilson, W, Gerecitano JF, Goy A, de Vos S, Kenkre VP, Barr PM, et al. The bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, ibrutinib (PCI-32765), has preferential activity in the abc subtype of relapsed/refractory de novo diffuse large b-cell lymphoma (DLBCL): interim results of a multicenter, open-label, phase 2 study. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2012;686.
24. Rahal R, Frick M, Romero R, Korn JM, Kridel R, Chan FC, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat Med.* 2014;20(1):87-92.

25. Roccaro AM, Sacco A, Jimenez C, Maiso P, Moschetta M, Mishima Y, et al. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood*. 2014;123(26):4120-4131.
26. Kahl BS, Spurgeon SE, Furman RR, Flinn IW, Coutre SE, Brown JR, et al. Results of a phase I study of idelalisib, a PI3K inhibitor, in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Blood*. 2014;123(22):3398-3405.
27. Lopez JP, Jimeno A. Idelalisib for the treatment of indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Drugs Today* 2014;50(2):113-120.
28. Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res*. 2011;2011:329098.
29. Kahl BS, Spurgeon SE, Furman RR, Flinn IW, Coutre SE, Brown JR, et al. A phase I study of the PI3K inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Blood*. 2014;123(22):3398-405.
30. Gopal AK, Kahl BS, de Vos S, Wagner-Johnston ND, Schuster SJ, Jurczak WJ, et al. PI3K inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med*. 2014;370(11):1008-1018.
31. Flinn IW, Kahl BS, Leonard JP, Furman RR, Brown JR, Byrd JC, et al. Idelalisib, a selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase- δ , as therapy for previously treated indolent non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2014;123(22):3406-3413.
32. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(22):3390-3397.
33. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997-1007.
34. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(1):49-63.
35. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, et al. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell*. 2011;44(4):517-531.
36. Tsujimoto Y, Croce CM. Recent progress on the human bcl-2 gene involved in follicular lymphoma: characterization of the protein products. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1988;141:337-340.
37. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*. 1985;228(4706):1440-1443.
38. Aisenberg AC, Wilkes BM, Jacobson JO. The bcl-2 gene is rearranged in many diffuse B-cell lymphomas. *Blood*. 1988;71(4):969-972.
39. Agarwal B, Naresh KN. Bcl-2 family of proteins in indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma: study of 116 cases. *Am J Hematol*. 2002;70(4):278-282.
40. Kim R, Emi M, Matsuura K, Tanabe K. Antisense and non antisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy. *Cancer Gene Ther*. 2007; 14(1):1-11.
41. O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki AB, Koziner B, Chanan-Khan AA, et al. 5-Year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5208-5212.
42. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*. 2006;10(5):389-399.
43. Tahir SK, Yang X, Anderson MG, Morgan-Lappe SE, Sarthy AV, Chen J, et al. Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737. *Cancer Res*. 2007;67(3):1176-1183.
44. Ackler S, Xiao Y, Mitten MJ, Foster K, Oleksijew A, Refici M, et al. ABT-263 and rapamycin act cooperatively to kill lymphoma cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(10):3265-3274.
45. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*. 2008;68(9):3421-3428.
46. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, LaCasce AS, Gerecitano JF, Leonard JP, et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase I dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumor activity. *Lancet Oncol*. 2010;11(12):1149-1159.
47. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*. 2013;19(9):202-208.
48. Harrison DA. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4(3):a011205.
49. Furqan M, Akinleye A, Mukhi N, Mittal V, Chen Y, Liu D. STAT inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2013;6(1):90.
50. 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):3268-3277.
51. Rosenwald I, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003;198(6):851-862.
52. Ding BB, Yu JJ, Yu RY, Mendez LM, Shakhovich R, Zhang Y, et al. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2008;111(3):1515-1523.
53. Alas S, Bonavida B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2003;9(1):316-326.
54. Kim BH, Yin CH, Guo Q, Bach EA, Lee H, Sandoval C, et al. A small-molecule compound identified through a cell-based screening inhibits JAK/STAT pathway signaling in human cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(9):2672-2680.
55. Diaz T, Navarro A, Ferrer G, Gel B, Gaya A, Artells R, et al. Lestaurtinib inhibition of the Jak/STAT signaling pathway in Hodgkin lymphoma inhibits proliferation and induces apoptosis. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18856.
56. Hexner EO1, Serdikoff C, Jan M, Swider CR, Robinson C, Yang S, et al. Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111(12):5663-5671.
57. Hart S, Goh KC, Novotny-Diermayr V, Hu CY, Hentze H, Tan YC, et al. SB1518, a novel macrocyclic pyrimidine-based JAK2 inhibitor for the treatment of myeloid and lymphoid malignancies. *Leukemia*. 2011;25(11):1751-1759.
58. Younes AI, Romaguera J, Fanale M, McLaughlin P, Hagemister F, Copeland A, et al. Phase I study of a novel oral Janus kinase 2 inhibitor, SB1518, in patients with relapsed lymphoma: evidence of clinical and biologic activity in multiple lymphoma subtypes. *J Clin Oncol*. 2012;30(33):4161-4167.
59. Verstovsek S, Machida C, Dean JP, Myint H. Pacritinib. Inhibitor of tyrosine-protein kinase JAK2, inhibitor of FLT-3, treatment of myelofibrosis. *Drugs Future*. 2013;38(6):375.
60. Derenzini E, Younes A. Targeting the JAK-STAT pathway in lymphoma: a focus on pacritinib. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013;22(6):775-785.
61. Derenzini E, Lemoine M, Buglio D, Katayama H, Ji Y, Davis RE, et al. The JAK inhibitor AZD1480 regulates proliferation and immunity in Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J*. 2011;1(12):e46.
62. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18(16):1926-1945.
63. Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL. TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci*. 2004;29(1):32-38.
64. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004;6(11):1122-1128.
65. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-1101.
66. Butler MP, Wang SI, Chaganti RS, Parsons R, Dalla-Favera R. Analysis of *PTEN* mutations and deletions in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;24(4):322-327.
67. Kawamata N, Chen J, Koeffler HP. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; vorinostat) suppresses translation of cyclin D1 in mantle cell lymphoma cells. *Blood* 2007;110(7):2667-2673.
68. Peponi E, Drakos e, Reyes G, Leventaki V, Medeiros JL, Rassidakis GZ. Inhibition of Akt/mTOR signalling pathway induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2005;106 2415.
69. Haritunians T, Mori A, O'Kelly J, Luong QT, Giles FJ, Koeffler HP. Antiproliferative

- activity of RAD001 as a single-agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Am Assoc Can Res*; 2006 [2197abstract].
70. Hipp S, Ringshausen I, Oelsner M, Bogner C, Peschel C, Decker T. Inhibition of the mammalian target of rapamycin and the induction of cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cells. *Haematologica* 2005;90(10):1433-1434.
 71. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(8):671-688.
 72. Witzig TE1, Geyer SM, Ghobrial I, Inwards DJ, Fonseca R, Kurtin P, et al. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23(23):5347-5356.
 73. Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, et al. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(23):3822-3829.
 74. O'Connor O, Popplewell L, Winter J, Yuan R, Robeva A, Cauwel H, et al. PIL-LAR-1: preliminary results of a phase II study of mTOR inhibitor everolimus in patients with mantle cell lymphoma (MCL) who are refractory or intolerant to bortezomib. *Blood*; 2010;116(21):1616-1617.
 75. Ghielmini M, Schmitz SF, Cogliatti S, Bertoni F, Waltzer U, Fey ME, et al. Effect of single-agent rituximab given at the standard schedule or as prolonged treatment in patients with mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *J Clin Oncol*. 2005;23(4):705-711.
 76. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284(5415):770-776.
 77. Lobry C, Oh P, Aifantis I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med*. 2011;208(10):1931-1935.
 78. Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(2):83-93.
 79. Tanigaki K, Honjo T. Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat Immunol*. 2007;8(5):451-456.
 80. Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, Zhao L, Weigelin HG, Chiang MY. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med*. 2012; 209(9): 1553-1565.
 81. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Brusca A, Rasi S, Spina V, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med*. 2012; 209(9): 1537-1551.
 82. Olsauskas-Kuprys R1, Zlobin A, Osipo C. Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *Onco Targets Ther*. 2013;6:943-955.
 83. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, De Leon GP, Chen Y, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 2010;464(7291):1052-1057.
 84. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-511.
 85. Rosenwald A1, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(Suppl 3):S41-47.
 86. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*. 2011;471(7337):189-195.
 87. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-837.
 88. Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 2007;447(7143):407-412.
 89. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;476(7360):298-303.
 90. Pasini D, Malatesta M, Jung HR, Walfridsson J, Willer A, Olsson L, et al. Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(15):4958-69.
 91. Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol. Cancer Ther*. 2009;8(6):1579-1588.
 92. Knutson SK, Wigle TJ, Warholc NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat. Chem. Biol*. 2012;8(11):890-896.
 93. Filippakopoulos P, Knapp S. The bromodomain interaction module. *FEBS Lett*. 2012;586(17):2692-2704.
 94. Shen W, Xu C, Huang W, Zhang J, Carlson JE, Tu X, Wu J, Shi Y. Solution structure of human Brg1 bromodomain and its specific binding to acetylated histone tails. *Biochemistry*. 2007;46(8):2100-2110.
 95. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011;146(6):904-917.
 96. Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S, Mele DA et al. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011;108(40):16669-16674.

Parole Chiave

Linfoma, vie di segnale, ibrutinib, idelalisib

Indirizzi per la corrispondenza

Davide Rossi

Divisione di Ematologia, Dipartimento di Medicina Traslazionale
Università degli Studi del Piemonte orientale Amedeo Avogadro
Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italia

Tel: +39 0321 660 698

Fax: +39 0321 620 421

E-mail: rossidav@med.unipmn.it

ESSERCI.

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

celgene.com

Improving the lives of patients worldwide.



La rivista è consultabile anche sui siti web:

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 2 - Numero 3 - 2015

Linfoma follicolare

Biologia

Quadri clinici e percorsi diagnostici

Terapie convenzionali

Terapie innovative

Trapianto di cellule staminali

Con il supporto non condizionato di

