Anno 8 - Numero 1 - 2021

Ematologia Oncologica.it

Neoplasie mieloidi acute

Organo Ufficiale
della **Fondazione Matarelli** - Milano

Con il supporto non condizionante di

Celgene | Bristol Myers Squibb™ Company

Ematologia Oncologica.it

www.ematologiaoncologica.it

Neoplasie Mieloidi Acute

Ruolo clinico e prognostico del profilo mutazionale
Benedetta Cambò, Giovanni Roti 7

Predisposizione genetica
Lucio Morabito, Nicla Manes, Chiara Milanesi, Erica Travaglino, Matteo Giovanni Della Porta 25

Trapianto di cellule emopoietiche allogeniche
Anna Ghiso, Carmela Di Grazia, Riccardo Varaldo, Emanuele Angelucci 33

Nuovi Farmaci
Raffaele Palmieri, Adriano Venditti 47

Prospettive della terapia con cellule CAR-T
Piera Angelillo, Chiara Bonini, Matteo Carrabba, Monica Casucci, Sara Mastaglio 57

Ematologia Oncologica.it
Vol 8 - n.1 - 2021

Direttore Responsabile
Giorgio Maggiani

Editor-in-Chief
Giorgio Lambertenghi Deliliers, *Milano*

Co-Editor
Francesco Passamonti, *Varese*

Editorial Board
Amadori Sergio, *Roma*
Boccadoro Mario, *Torino*
Bosi Alberto, *Firenze*
Cavo Michele, *Bologna*
Corradini Paolo, *Milano*
Cuneo Antonio, *Ferrara*
Gobbi Marco, *Genova*
Mecucci Cristina, *Perugia*
Pane Fabrizio, *Napoli*
Pizzolo Gianni, *Verona*
Specchia Giorgina, *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.

Sito Internet
www.ematologiaoncologica.it

Periodicità
Quadrimestrale

Registrazione Tribunale di Milano
n. 348 del 19/11/2013

Tipografia
Sincronia - Milano

Editore
Infodyn srl
Via Senato 13 - 20121 Milano

Coordinamento editoriale
Massimo Di Leo
Giovanna Nicoli
Nadia Quirici

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 Matarelli, (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 "lnternational Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements far 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 1-3 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. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Articoli con più di 3 autori
Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

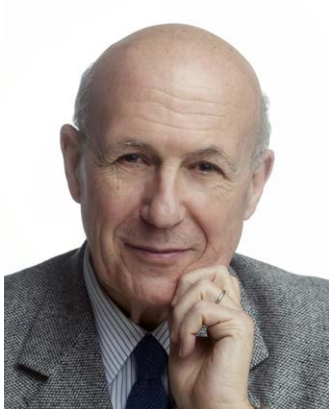
Abstract e Congressi
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts. 2000;100(10):1000.

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 Matarelli - Milano



Il comitato editoriale di ***Ematologia Oncologica.it*** ha ritenuto opportuno dedicare questo numero alle leucemie mieloidi acute, che nel corso dell'ultimo decennio sono state oggetto di importanti acquisizioni sul piano diagnostico e terapeutico. È un gruppo di neoplasie fenotipicamente e geneticamente eterogenee per la presenza di complessi profili mutazionali che hanno consentito di delineare modelli prognostici correlabili al rischio clinico. Solo poche mutazioni sono ricorrenti in più del 25% dei pazienti. Tra queste la *NPM1* prevalente nelle leucemie a cariotipo normale con una elevata chemiosensibilità; un *marker* indicativo di prognosi relativamente buona, affidabile, di malattia minima residua. Viceversa le mutazioni a carico di FLT3 conferiscono alla malattia una prognosi sfavorevole per la non soddisfacente risposta alla chemioterapia. Numerose sono le informazioni sul ruolo clinico e prognostico dei modificatori epigenetici, dei fattori di trascrizione e degli oncosoppressori; i risultati sono variabili e a volte discordanti, ma rimane l'obiettivo di trasferirli sul piano terapeutico a beneficio di un numero sempre maggiore di pazienti. L'importanza della conoscenza del profilo mutazionale va oltre l'interesse strettamente clinico. Infatti, l'introduzione del sequenziamento di nuova generazione ha rivelato l'esistenza di 3 categorie di neoplasie mieloidi su base ereditaria, incluse recentemente come nuove entità nella classificazione WHO. Il riconoscimento di una specifica predisposizione germinale richiede quindi una consulenza genetica e un monitoraggio dei famigliari a rischio, soprattutto quando è in corso la selezione di un donatore per il trapianto di cellule staminali. Inoltre, lo studio molecolare nelle categorie con manifestazioni extra-ematopoietiche può consentire interventi preventivi ed evitare l'uso di farmaci o regimi di condizionamento potenzialmente dannosi.

Dopo circa quattro decadi di stagnazione nella terapia delle leucemie mieloidi acute, una nuova era si sta aprendo con l'introduzione di rinnovate formulazioni di vecchi farmaci, associati ad anticorpi monoclonali o a molecole in grado di spegnere i segnali aberranti legati alle mutazioni. Tra questi ultimi gli inibitori di FLT3 che potenzialmente sono in grado di migliorare la prognosi dei pazienti, indipendentemente dall'intensità del trattamento somministrato. Gli inibitori delle mutazioni IDH1/2, data la loro spiccata efficacia clinica, potrebbero rappresentare una buona opzione nelle terapie mirate a ridotta intensità. Analogamente gli inibitori di BCL2 hanno avuto l'approvazione da parte di FDA, in combinazione con citarabina a basse dosi, per i pazienti ritenuti non idonei alla chemioterapia intensiva.

A più di 60 anni dalla sua introduzione, il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche rimane uno dei più efficaci trattamenti post-remissione, capace di promuovere un effetto curativo a distanza, soprattutto nelle classi di rischio citogenetico sfavorevole. La sua applicazione è in continua evoluzione con l'obiettivo di ridurre mortalità e tossicità ancora non trascurabili, a seconda delle caratteristiche biologiche della malattia, dello stato di remissione, delle comorbidità presenti, della sorgente cellulare, del grado di compatibilità con il donatore e dell'intensità del regime di condizionamento. Gli score prognostici più utilizzati hanno una accuratezza predittiva subottimale, ma sono funzionali all'interno di studi clinici. Attualmente hanno indicazione al trapianto tutte le categorie di rischio in remissione, anche in presenza di fattori correlati ad una possibilità di recidiva. I pazienti refrattari, pur avendo una piccola possibilità di lunga sopravvivenza, possono essere avviati al trapianto, se valutati eleggibili, preferibilmente all'interno di studi clinici sperimentali. Le CAR-T rappresentano l'ultima frontiera delle terapie cellulari gemmate direttamente dall'esperienza del trapianto allogenico. Sono infatti farmaci ingegnerizzati geneticamente per riconoscere cellule tumorali, nati con l'obiettivo di sfruttare la *Graft-versus-Leukemia* senza pagare il prezzo della *Graft-versus-Host Disease*. Nelle neoplasie orientate in senso linfoide hanno permesso di ottenere remissioni complete, anche in forme refrattarie ai trattamenti convenzionali, incluso il trapianto allogenico. Viceversa, studi clinici di fase precoce sono in corso per valutare la potenziale attività delle cellule CAR-T verso la cellula staminale leucemica, che purtroppo nelle forme acute mieloidi non presenta sulla sua superficie bersagli specifici e stabili.

Ruolo clinico e prognostico del profilo mutazionale



Benedetta Cambò[1], Giovanni Roti[1,2]

[1]Azienda-Ospedaliera di Parma, Ematologia e Centro Trapianti Midollo Osseo, Parma, 43126, Italia

[2]Università di Parma, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Ematologia e Centro Trapianti Midollo Osseo, 43126, Italia

Introduzione

La leucemia mieloide acuta (LMA) è una patologia eterogenea e geneticamente complessa. La crescente comprensione delle mutazioni ricorrenti nell'ambito delle neoplasie mieloidi ha consentito nel corso dell'ultimo decennio di affinare non solo le tecniche diagnostiche permettendo una caratterizzazione più accurata, ma soprattutto ha dimostrato come la presenza di un particolare profilo mutazionale possieda innumerevoli correlazioni con le manifestazioni cliniche e con la prognosi, definendo in alcuni casi delle entità nosologiche distinte (cNPM1, *CEPBA*$^{\text{double-mut}}$). Lo sviluppo di farmaci target quali gli inibitori di FLT3 o IDH1-2, in grado di spegnere i segnali aberranti legati alle mutazioni note, rappresenta un'ulteriore frontiera che apre nuovi orizzonti nella cura della LMA e che sta già dettando nuovi approcci terapeutici. D'altra parte, la possibilità di discriminare la presenza di mutazioni meno frequenti, ma con connotazione prognostica sfavorevole (e.g. *TP53*) consente di disegnare, per i pazienti candidabili, un iter terapeutico basato sulla intensificazione precoce con trapianto di cellule staminali emopoietiche. Inoltre la conoscenza di mutazioni associate ad emopoiesi clonale (e.g. *DNMT3A*) ricorrenti in associazione con altre mutazioni *driver* e *second hit* ha consentito di chiarire ulteriormente il processo multistep della leucemogenesi.

Infine, il recente riconoscimento di mutazioni germline correlate all'insorgenza di neoplasie mieloidi pone il dilemma clinico ed etico di una accurata definizione del rischio, di un attento monitoraggio nel tempo e sottolinea l'importanza della conoscenza del profilo mutazionale non solo nello studio del paziente con LMA ed eventualmente dei suoi familiari, ma anche nell'ambito della scelta dei donatori di cellule staminali emopoietiche.

La prima descrizione scientifica di una leucemia risale al 1827 ed è firmata da Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau che riportava il caso di un fiorista di 63 anni che aveva sviluppato una malattia caratterizzata da febbre, stanchezza, organomegalia e dalla presenza di corpuscoli bianchi nel sangue che determinavano una alterazione della sua consistenza. Da allora il termine *leucocythemia* si rincorre rapidamente nella letteratura dell'epoca per identificare le leucocitosi non secondarie ad episodi infettivi. È solo nel 1900 tuttavia che Otto Naegeli descriveva il mieloblasto come entità distinta e distinguibile da forme linfocitiche dando origine a quella che oggi riconosciamo come leucemia mieloide acuta, che soli 108 anni dopo diventava il primo tumore ad essere completamente sequenziato [1,2].

La LMA rappresenta un gruppo di neoplasie ematologiche fenotipicamente e geneticamente eterogenee caratterizzate dall'accumulo di blasti nel midollo osseo e nel sangue periferico. Rappresenta all'incirca il 25% di tutti i casi di leucemia nell'adulto nei paesi occidentali, con un'incidenza di 3-5 casi ogni 10000 abitanti all'anno con una età media all'esordio di 69 anni [3].

La LMA deriva dalla trasformazione clonale di un precursore ematopoietico attraverso l'acquisizione di riarrangiamenti cromosomici e mutazioni genetiche che conferiscono un vantaggio proliferativo e una alterazione nei processi di differenziazione ematopoietica [4]. Questi eventi sono stati a lungo confinati all'interno del modello *two hit* proposto inizialmente da Gary Gilliland [5] che ipotizzava la cooperazione fra mutazioni di Classe I - proliferazione e sopravvivenza - con quelle di classe II - differenziazione ed apoptosi - come causa dello sviluppo di LMA. Tuttavia, l'emergere di nuove tecnologie diagnostiche, inclusi agli inizi degli anni '90 gli array per espressione [6] e successivamente il sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing*, NGS), hanno permesso l'identificazione di altri eventi genetici che non rientrano in questa classificazione binaria, ma che globalmente alterano i processi epigenetici di controllo della cromatina o il metabolismo cellulare [7].

L'analisi citogenetica attraverso l'identificazione di alterazioni strutturali o numeriche dei cromosomi ha consentito di delineare il primo modello prognostico nella LMA e rappresenta il cuore della classificazione genomica [8] correlando, indipendentemente dal trattamento, con la sopravvivenza stimata a cinque anni che si attesta al ~60%, 30-40%, o 5-10% a seconda della classe di rischio identificata: basso, intermedio o alto [9-11]. L'applicazione di tecnologie di NGS ha successivamente permesso di mappare l'assetto genetico delle LMA definendo una frequenza

media di ~12 mutazioni per paziente di cui ~3 riconducibili a *driver* [7,12,13]. Poiché solo poche mutazioni sono ricorrenti in più del 25% dei pazienti [12], tra cui *Fms-like Tyrosine Kinase 3* (*FLT3*), *Nucleophosmin* (*NPM1*), e *DNA Methyltransferase 3 Alpha* (*DNMT3A*), la definizione complessiva dello stato mutazionale rinforza, da un lato, il concetto di una neoplasia eterogenea, dall'altro, permette un migliore inquadramento diagnostico soprattutto in quei casi a rischio intermedio o a cariotipo normale [7]. Lo scopo di questa revisione è quello di riassumere l'orizzonte genomico delle LMA con una particolare attenzione per le mutazioni somatiche più significative (Tabella 1) per supportare la necessità di definire un inquadramento diagnostico che vada oltre l'identificazione degli eventi ricorrenti al fine di sviluppare nuove strategie terapeutiche anche sulla base dell'evoluzione clonale che la malattia ha nel tempo.

Classe	Geni
Nucleophosmin-1 NPM1	*NPM1*
Tirosin-chinasi e pathway correlate	*FLT3*, *KRAS*, *NRAS*, *KIT*, *PTPN11*, e *NF1*
Epigenoma	*DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, e *MLL/KMT2A*
Fattori di Trascrizione	*CEBPA*, *RUNX1*, e *GATA2*
Oncosoppressori	*TP53*
Fattori di Splicing	*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*, e *ZRSR2*
Complesso delle Coesine	*RAD21*, *STAG1*, *STAG2*, *SMC1A*, *SMC3*

***Tabella 1** - Mutazioni ricorrenti nelle leucemie acute mieloidi suddivise per gruppi funzionali.*

Nucleophosmin-1 (NPM1)

NPM1 è una fosfoproteina nucleare RNA-associata coinvolta nella formazione dei ribosomi e localizzata nella regione granulare del nucleolo [14]. Il gene *NPM1* mappa sul braccio lungo del cromosoma 5 in posizione 35 (5q35) e contiene 12 esoni codificanti 3 isoforme, di cui la principale è nota come B23.1, di circa 37 kDa ed ha localizzazione elettivamente nucleolare [14]. NPM1 è espressa in maniera ubiquitaria in tutti i tessuti e rappresenta un elemento di continuità tra nucleo e citoplasma, svolgendo importanti funzioni di trasporto di componenti del ribosoma al citoplasma e di controllo della duplicazione dei centrosomi [15-17].
Il locus di *NPM1* è partner di diverse traslocazioni in differenti neoplasie ematologiche quali la t(2;5) (p23;q35) (*NPM1-ALK*) [18] nel linfoma anaplastico a grandi cellule CD30+, le più rare t(3;5) (q25.1;q34) (*NPM1-MLF1*) [19] nelle LMA e nelle sindromi mielodisplastiche (SMD), e t(5;17) (q32; q12) (*NPM1-RARA*) nella leucemia acuta promielocitica (LAP) [20].
Dall'analisi immunoistochimica (IHC) nei casi di linfoma anaplastico *ALK* positivo si era osservato che *NPM1* deregolato era presente nel citoplasma (NPM1c) e non nel nucleo come atteso dal suo ruolo fisiologico [21]. La stessa osservazione è alla base dello studio che ha permesso l'identificazione delle 6 principali mutazioni a carico dell'esone 12 di *NPM1* nelle LMA con cariotipo normale [22]. Nell'ambito di tale studio si era osservato che la LMA con NPM1c non correlava con un fenotipo morfologico (sebbene si rilevasse una maggiore frequenza di forme mielomonocitiche/monocitiche), mentre prevaleva in LMA a cariotipo normale, nei casi con mutazione ITD di *FLT3* e, all'analisi citofluorimetrica, si caratterizzava per la negatività per l'antigene CD34. Da un punto di vista clinico i pazienti con LMA *NPM1* mutata mostravano una elevata percentuale di responsività alla chemioterapia di induzione, configurando verosimilmente un fenotipo di malattia ad elevata chemio-sensibilità e prognosi relativamente buona (in assenza della co-mutazione *FLT3-ITD*) [22]. Tali osservazioni vennero successivamente confermate in ulteriori popolazioni di pazienti, consentendo di definire la LMA *NPM1 mutata/FLT3 wild type* come una patologia a buona prognosi in termini di risposta alla chemioterapia di induzione, sopravvivenza libera da malattia (*disease free survival*, DFS) e sopravvivenza globale (*overall survival*, OS). La descrizione di LMA con NPM1c e la correlazione con un fenotipo clinico caratteristico portarono al riconoscimento della LMA con mutazione *NPM1* come entità provvisoria all'interno della classificazione della *World Health Organization* (WHO) del 2008 [23].
Studi successivi confermarono come la mutazione di *NPM1* abbia una prevalenza di circa il 30% nelle LMA in generale e del 50-60% nelle forme a cariotipo normale, configurandosi come la mutazione più frequente in questa patologia [7,24]. Inoltre, studi di *Gene Expression Profiling* confermarono l'unicità biologica di questa entità, caratterizzata dal punto di vista genetico da una up-regolazione dei geni HOX (principalmente HOXA e HOXB) [25]. Oltre alle 6 mutazioni identificate nello studio pubblicato su *New England Journal of Medicine* [22], più di 50 ulteriori mutazioni sono state descritte nel corso degli anni, sebbene il tipo A, B e D risultino le più frequenti, riscontrandosi in oltre il 95% dei casi [24,26,27].
Nonostante le LMA *NPM1* mutate si accompagnino frequentemente ad un cariotipo normale, circa il 15% presentano una anomalia citogenetica: tali alterazioni sono più spesso trisomie, mentre assai rare sono le LMA *NPM1* mutate con anomalie citogenetiche SMD-*related*, fatta eccezione per del9(q) che sembra avere un'incidenza più elevata [25].
Oltre alla presenza di anomalie citogenetiche, una connotazione morfologica SMD-*related* è descritta in circa il 30% delle LMA con mutazione *NPM1*; tuttavia è stato dimostrato come la presenza di tali atipie morfologiche non si accompagni ad una modificazione dell'assetto biologico della malattia e non denoti una prognosi più sfavorevole [28].

Alla luce di questi dati la classificazione WHO del 2016 ha introdotto alcune modifiche tra le quali la principale è stata quella di riconoscere la LMA con mutazione di *NPM1* come un'entità distinta [29].

La mutazione di *NPM1* può accompagnarsi alla presenza di altre co-mutazioni quali *FLT3*, *IDH1*, *IDH2* e *DNMT3A* [24,27,30]. Tali mutazioni possono influenzare la connotazione prognostica favorevole delle LMA *NPM1* mutate, in particolare per quanto riguarda la presenza della mutazione *FLT3-ITD* che conferisce una prognosi più sfavorevole con maggiore tendenza alla recidiva, soprattutto in presenza anche della co-mutazione di *DNMT3A* [31]. È di più recente osservazione come la prognosi delle LMA *NPM1/FLT3-ITD* positive sia influenzata dalla carica allelica di *FLT3* con significato prognostico modesto se la frequenza relativa dell'allele mutato (*ratio allelica*) si attesta sotto 0.5 e maggiore impatto se >0.5 [32], configurando rispettivamente LMA con profilo di rischio genetico basso e intermedio come evidenziato dalle linee guida *European Leukemia Net* (ELN) 2017 [30]. La presenza della co-mutazione di *FLT3* a livello del dominio tirosin-chinasico (TKD) sembra invece non aggiungere connotazione prognostica sfavorevole e, anzi, caratterizzare un fenotipo di LMA a prognosi favorevole [33].

La presenza della mutazione di *NPM1* è descritta anche in una piccola percentuale di patologie mieloidi quali sindromi mielodispastiche/mieloproliferative (SMD/NMP) con andamento clinico tendenzialmente aggressivo e sfavorevole, motivo per cui allo stato attuale delle conoscenze la presenza della mutazione risulta patognomonica solo in caso di LMA *de novo* con blastosi midollare superiore al 20% [34,35].

Trattandosi di un marcatore altamente stabile durante il decorso della malattia, *NPM1* rappresenta un marker affidabile di malattia minima misurabile/residua (*minimal residual disease*, MRD) [35-38]. Vari studi hanno evidenziato come la persistenza di MRD positiva dopo il secondo ciclo di chemioterapia correli con un andamento clinico sfavorevole [39,40] indipendentemente dalla presenza della co-mutazione *FLT3-ITD* e che, piuttosto, la persistenza di trascritto NPM1 permetta di identificare una categoria di pazienti *FLT3 wild type* a peggior prognosi e meritevoli di trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) in prima linea, mentre d'altro canto il raggiungimento di una MRD negatività in epoca precoce in pazienti *NPM1/FLT3-ITD* positivi possa caratterizzare un sottogruppo a prognosi relativamente più favorevole pur in presenza della co-mutazione [41].

Le LMA con mutazione di *NPM1* inoltre mostrano un potenziale spettro di sensibilità a diversi farmaci che appaiono come possibili candidati nel migliorare la percentuale e la qualità delle remissioni di malattia in associazione a chemioterapia di induzione e nel setting del paziente recidivato/refrattario. Nel primo caso è stato osservato come l'utilizzo di gemtuzumab ozogamycin (GO) in associazione a chemioterapia standard dia particolare vantaggio nelle LMA *NPM1* mutate (ALFA0701 trial) [42]; allo stesso modo, più recentemente, è stato dimostrato come l'inibitore di BCL2 venetoclax sia in grado di migliorare la profondità della risposta in questi pazienti [43] e, in associazione ad agenti ipometilanti (*Hypomethylating Agents*, HMA), rappresenti una piattaforma di cura altamente efficace anche in questa categoria di LMA [44].

Tra i farmaci di possibile utilizzo nel paziente in recidiva di malattia si segnala dactinomicina, molecola che si è dimostrata in grado di indurre remissioni molecolari anche in popolazioni già pretrattate con chemioterapia [45,46]. Il meccanismo alla base dell'efficacia del farmaco non è del tutto chiaro, ma è certamente correlato alla capacità di dactinomicina di indurre stress nucleolare interferendo con la genesi del ribosoma attraverso l'inibizione della RNA polimerasi [47].

I risultati di trial di fase I-II hanno confermato la sicurezza e potenziale efficacia di selinexor, in combinazione con ipometilanti o con regimi di chemioterapia intensiva nelle LMA *NPM1* mutate [48-51]. Selinexor è un inibitore delle esportine di tipo 1 il cui meccanismo di azione si fonda sulla sua capacità di regolare il trasporto di proteine dal nucleo al citoplasma, promuovendo, nel caso delle LMA, la fisiologica collocazione nucleolare di NPM1 [52].

Tirosin-chinasi e pathway correlati

FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)

FLT3 è una proteina con attività recettoriale tirosin-chinasica espressa nei progenitori emopoietici [53,54], che promuove la sopravvivenza e la maturazione della cellula staminale. Le mutazioni a carico di *FLT3* (il cui gene mappa in regione 13q12) si verificano in circa il 30% delle LMA [55,56] e sono inquadrabili all'interno di due tipologie: la prima consiste in una inserzione a livello della regione che codifica per la porzione iuxtamembranaria del recettore (*internal tandem duplication* - ITD, 75%), mentre la seconda, meno frequente (25%), si verifica a livello del dominio tirosino-chinasico che viene interessato da mutazioni puntiformi (*tyrosin-kinase domain* - TKD, la più frequente D835I) [56]. In entrambi i casi le mutazioni determinano una iperattivazione del recettore in maniera indipendente rispetto alla presenza del ligando, causandone l'autofosforilazione e l'attivazione costitutiva di vie di trasduzione del segnale a valle (Raf/MEK/ERK/JAK-STAT/PI3K-AKT) [57-59].

Le mutazioni a carico di *FLT3* sono considerate mutazioni *second hit* che non caratterizzano un fenotipo peculiare di LMA (d'altronde mutazioni a carico di *FLT3-ITD* sono riportate anche in altre categorie di leucemie acute come, ad esempio la leucemia linfoblastica T a fenotipo *early T precursor*) [60], ma che cooperano con altre mutazioni *driver* a caratterizzare l'evoluzione clonale della malattia. Essendo l'evento genetico che ricorre maggiormente in associazione alla mutazione di *NPM1*, anche le LMA con mutazione di *FLT3* presentano frequentemente un cariotipo normale e ricorrono in età giovanile, mani-

festandosi con iperleucocitosi e con morfologia monoblastica/monocitica [55,61,62]. Le mutazioni *FLT3-ITD* [63] anche in presenza di una mutazione protettiva come *NPM1* conferiscono una prognosi sfavorevole caratterizzata da una non soddisfacente risposta al trattamento chemioterapico, tale da giustificare dosaggi di daunorubicina più elevati (90 mg/m^2) nell'ambito della chemioterapia di induzione [64], e da una maggiore probabilità di recidiva anche successivamente a HSCT, procedura da effettuarsi in prima remissione completa in questa categoria di LMA. Il livello di definizione diagnostica nel caso di presenza di mutazioni *FLT3-ITD* nel contesto di LMA *NPM1* mutato [32] è tale che la carica allelica di *FLT3*, unitamente al monitoraggio di MRD, guidano le decisioni terapeutiche anche in senso trapiantologico [63,65]. Il ruolo prognostico della mutazione *FLT3-TKD* è invece meno definito e più dibattuto: tale mutazione è di più raro riscontro [66] e non sembra definire un fenotipo a prognosi maggiormente sfavorevole, anche in presenza della mutazione di *NPM1* [33]. Tuttavia, le mutazioni TKD presentano una maggiore resistenza agli inibitori di *FLT3* [67].

Superata una fase che ha visto il *repurposing* di inibitori multichinasi come sorafenib e inibitori indiretti di FLT3 [68], l'avvento di molecole sempre più specifiche sta modificando il panorama del trattamento di questa forma di LMA. Gli inibitori di FLT3 ad oggi in uso nella pratica clinica o in fase di sperimentazione si dividono in due categorie: di tipo I (come midostaurina, crenolanib e gilterinitib, i soli attivi verso la mutazione TKD) [69,70] che legano il sito di legame nella sua conformazione attiva, e gli inibitori di tipo II (come sorafenib e quizartinib) che legano una regione idrofobica adiacente al sito di legame dell'ATP, accessibile solo quando il recettore è inattivo, prevenendone l'attivazione.

Attualmente gli inibitori di FLT3 disponibili per l'utilizzo clinico sono due: midostaurina e gilteritinib. Midosaturina è stata approvata per l'utilizzo in prima linea nelle LMA *FLT3* mutate (ITD e TKD) sulla base dei risultati dello studio di fase III RATIFY che ha dimostrato come il farmaco, in associazione allo schema di induzione 3+7 (citarabina 200 mg/m^2 e daunorubicina 60 mg/m^2) e schemi di consolidamento con alte dosi di citarabina, determini un vantaggio in termini di DFS e OS [71]. Lo studio non ha dimostrato un vantaggio significativo nell'utilizzo di midostaurina come mantenimento nei pazienti non sottoposti a HSCT, motivo per cui tale indicazione del farmaco non è stata registrata, sebbene sia stata oggetto di studi ulteriori [72].

Gilteritinib, un inibitore di seconda generazione con attività selettiva su FLT3, è stato recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per l'utilizzo in monoterapia nelle LMA *FLT3* mutate recidivate/refrattarie sulla base dei risultati dello studio ADMIRAL [73], che ha dimostrato un vantaggio significativo dell'utilizzo del farmaco in pazienti recidivati/refrattari rispetto alla chemioterapia, con un buon profilo di tollerabilità.

Altri inibitori di seconda generazione hanno dimostrato attività nel paziente con LMA *FLT3* mutata sia in monoterapia che in associazione a schemi chemioterapici di salvataggio: in particolare crenolanib e quizartinib. Per quanto riguarda quest'ultimo, i risultati del trial di fase III (QUANTUM-R) hanno consentito di compararne l'efficacia rispetto a terapia standard in LMA *FLT3-ITD* positive recidivate/refrattarie, dimostrando un miglioramento della sopravvivenza (6.2 *vs* 4.7 mesi) e una maggiore possibilità di portare il paziente a trapianto allogenico (32% *vs* 12%). È stato inoltre completato di recente lo studio clinico che prevedeva l'associazione di quizartinib a chemioterapia di induzione (QUANTUM-first) nelle LMA *FLT3-ITD* mutate. Il farmaco non ha tuttavia al momento indicazione registrata.

Nella LMA *FLT3* positiva sottoposta a HSCT è stato recentemente chiarito il ruolo degli inibitori di FLT3 nell'ambito della terapia di mantenimento: i risultati dello studio SORMAIN hanno dimostrato come sorafenib sia in grado di migliorare in maniera significativa l'outcome di questi pazienti, tanto che il gruppo *European Bone Marrow Transplantation* (EBMT) ha recentemente pubblicato una linea di raccomandazione riguardo al ricorso a terapia di mantenimento post-HSCT in questa popolazione di pazienti [74].

Un altro campo di utilizzo degli inibitori di FLT3 è rappresentato dall'associazione con chemioterapia a basse dosi o HMA nei pazienti non candidabili a schemi chemioterapici intensivi, sia *upfront* che oltre la prima linea di terapia. Uno studio di fase II ha investigato efficacia e tollerabilità di sorafenib in combinazione con azacitidina nei pazienti >60 anni con LMA recidivata/refrattaria *FLT3-ITD* mutata, dimostrando un buon livello di risposta globale (46%) e possibilità di procedere a HSCT (16% della popolazione trattata) [75]. Allo stesso modo, la terapia di associazione decitabina-sorafenib ha mostrato potenziale efficacia [75]. Sulla base di tali risultati, ulteriori studi sono in corso per chiarire la possibilità di utilizzo di inibitori di seconda generazione anche in questo setting [76].

In considerazione di quanto descritto in termini di importanza nella stratificazione prognostica e di possibilità terapeutiche, lo studio mutazionale di *FLT3* rappresenta certamente un passaggio fondamentale nell'inquadramento diagnostico della LMA. La ricerca della mutazione viene principalmente effettuata in *real-time* PCR quantitativa (qRT-PCR) con definizione della ratio allelica, data la sua cruciale importanza nella definizione prognostica [65,77]. Sebbene sia una mutazione frequente, *FLT3* non rappresenta un marcatore affidabile di malattia minima residua, soprattutto in relazione alla sua instabilità nel corso della malattia. Sono descritte infatti recidive *FLT3 wild type* in pazienti con presenza della mutazione alla diagnosi e, ancora più frequentemente, la mutazione può essere acquisita in recidiva di malattia in relazione a processi di selezione del clone leucemico [78,79].

C-KIT

C-KIT (CD117 o *mast/stem cell growth factor receptor*) è una glicoproteina con attività recettoriale, il cui gene mappa sul cromosoma 4 in regione q12. Da un punto di vista funzionale

KIT appartiene alla categoria dei recettori tirosino-chinasici di tipo III che, attraverso il legame con lo stem cell factor (KIT ligand, KITLG), esercita un ruolo importante nei processi di emopoiesi e nella gametogenesi. Mutazioni *gain-of-function* a carico di *KIT* sono descritte nella maggioranza dei tumori stromali gastrointestinali (GIST) [80] e in alcuni tipi di neoplasie a cellule germinali [81,82] e tumori del sistema emopoietico [83-85]. La mutazione attivante D816V è la più frequente nella mastocitosi sistemica ed è riportata con frequenza significativa (circa 20%) nelle LMA con riarrangiamento *CBFB-MYH11* e *RUNX1-RUNX1T1* (CBF-LMA) [86]. Le mutazioni di *KIT* identificano un sottogruppo sfavorevole in particolare nei casi t(8;21) (q22; q22.1) (*RUNX1-RUNX1T1*) [87], dove la presenza della mutazione si associa ad un maggior tendenza alla recidiva, tanto da suggerire l'indicazione ad approcci terapeutici più intensivi o alternativi [88], come l'utilizzo di inibitori tirosino-chinasici (e.g. dasatinib), sebbene l'impatto di tali strategie sia ancora tutto da definire. Infatti, mentre lo studio di fase Ib-IIa del *German-Austrian AML Study Group* (AMLSG) 11-08 ha dimostrato un buon livello di tollerabilità e possibile efficacia dell'aggiunta di dasatinib a chemioterapia di induzione 3+7 in questa popolazione di pazienti [88], d'altra parte l'utilizzo come agente singolo nel mantenimento e nei pazienti recidivati non ha evidenziato risultati significativi, probabilmente in relazione all'insorgenza di altre mutazioni correlate alla progressione di malattia [89]. In termini di significato prognostico nelle CBF-LMA, uno studio retrospettivo italiano su 192 pazienti ha evidenziato come la mutazione di *KIT* confermi una connotazione sfavorevole, soprattutto nelle forme con t(8;21), dimostrando però anche come, in analisi multivariata, il maggior significato prognostico sia rivestito dall'età e dall'ottenimento di una remissione completa con negatività per MRD [90]. Inoltre, è stato recentemente riscontrato come l'utilizzo di GO nelle CBF-LMA possa avere un ruolo non solo nel migliorare la qualità della risposta, ma anche nel ridurre il ruolo prognostico della mutazione di *KIT* [91].

Infine, è stata riportata una non trascurabile incidenza della mutazione D816V nell'ambito di SMD/NMP e LMA non CBF, ed è stato descritto come la mutazione correli in modo significativo con la coesistenza di una mastocitosi sistemica in circa il 50% delle LMA (soprattutto LMA SMD-*related*) e nella quasi totalità delle SMD/NMP [92,93].

RAS

Le mutazioni di *RAS* (*rat sarcoma virus*) sono state descritte in diversi tipi di tumore e, forse, l'identificazione di *RAS* rappresenta una delle storie più complete ed avvincenti che permisero di comprendere i meccanismi di trasformazione tumorale agli inizi degli anni 80 [94-96].

Le cellule di mammifero contengono tre diversi protoncogeni della famiglia *RAS*: H, K, N codificanti per una proteina di circa 21 kDa che lega nucleosidi purinici di guanosina (GDP, GTP), con attività intrinseca GTPasica, e localizzata sulla superficie della membrana cellulare. I primi studi, che utilizzavano una tecnologia per ibridazione e oligonucleotidi sintetici per l'identificazione di mismatch, si focalizzarono principalmente sui codoni 12, 13 e 61 di *NRAS* e 12 e 61 di *KRAS* e determinarono una frequenza di circa il 27% delle mutazioni di *RAS* nelle LMA [97,98]. Questa frequenza, al tempo sicuramente sovrastimata, si attesta oggi ad un valore compreso fra il 10 e il 15%, includendo anche mutazioni che in modo simile a RAS determinano una iperattivazione della via di trasduzione del segnale RAF/RAS/MEK, come ad esempio le mutazioni di *PTPN11* e *NF1* [99]. I codoni più frequentemente mutati sono N12 (43%), N13 (21%), e K12 (21%). La frequenza non varia significativamente con l'età, il sesso, la conta leucocitaria, il rischio citogenetico, le forme primarie o secondarie, sebbene le mutazioni siano spesso presenti nelle progressioni da SMD [100] o con una certa prevalenza nel sottogruppo M4, secondo la classificazione *French-American-British* (FAB) [99]. Più studi hanno dimostrato una maggiore frequenza delle mutazioni di *NRAS* nei casi con t(3;5)(q21~25;q31~q35) [99] o t(3q26;3q26) [101] e *KRAS* in quelli con inv(16)(p13q22) [99]. Per molto tempo si sono considerate le mutazioni di *RAS* come neutrali dal punto di vista prognostico [27,101,102], ma se permutate con altri eventi genetici hanno un valore prognostico positivo nel contesto dei genotipi con mutazione di *NPM1* e *DNMT3A* [7]. Tuttavia, anche in studi dove le mutazioni vengono analizzate individualmente rimane un alto grado di incertezza [103].

Lo sviluppo di inibitori diretti, quali rigosertib [104], o indiretti, come ad esempio gli inibitori di MEK (trametinib) [105], sono in differenti fasi di sperimentazione clinica come agenti singoli o in combinazione per prevenire la rapida insorgenza di resistenza.

Modificatori epigenetici

DNA Methyltransferase 3 (DNMT3A)

DNMT3A è una DNA metiltransferasi di circa 130 kDa responsabile della metilazione *de novo* delle isole CpG. La maggioranza degli studi depone per un ruolo di DNMT3A nei processi di differenziazione e self-renewal della cellula staminale ematopoietica (HSC) attraverso meccanismi di silenziamento epigenetico [106]. Le mutazioni a carico del gene *DNMT3A* ricorrono in circa il 20% dei casi di LMA di nuova diagnosi e con maggior frequenza nel sottogruppo citogenetico a rischio intermedio [107]. Nello studio iniziale di Timothy J. Ley non sono state identificate mutazioni di *DNMT3A* nel gruppo citogenetico con prognosi favorevole che includeva pazienti con t(15;17), t(8;21) e inv(16) [107]. Queste mutazioni sono pressoché assenti nella popolazione pediatrica [108], mentre aumentano nella popolazione adulta ed anziana in combinazione con mutazioni a carico del gene *NPM1* (~60% dei casi), *FLT3-ITD* e *IDH1* [109].

La rilevanza temporale delle mutazioni di *DNMT3A* è inoltre supportata da tre ampi studi di sequenziamento sulla popolazione

anziana, apparentemente sana, che hanno rilevato la presenza di cloni ematopoietici (*clonal hematopoiesis* - CH) caratterizzabili per la presenza di mutazioni tipicamente *driver* nelle emopatie mieloidi (CHDMs) [110-112] come *DNMT3A*, *TET2*, *JAK2*, and *ASXL1*. Questo set di mutazioni è individuabile in circa il 10% della popolazione con età superiore ai 70 anni e nel ~20% di quella con età superiore ai 90 anni e si associa ad un maggior rischio di sviluppo di neoplasie ematologiche e patologia cardiovascolare [112]. Se la frequenza allelica (VAF) di queste mutazioni ricorrenti supera il 2% in assenza di una evidenza morfologica o clinica, il quadro rientra nella nuova definizione nosologica di CHIP (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*) [113].

Nella maggioranza delle LMA e SMD (con frequenza intorno al 2.6%), le mutazioni di *DNMT3A* avvengono nel dominio metil-transferasico (MTD) con un particolare arricchimento, circa nel 65% dei casi, nel codone R882 [114] in eterozigosi [115]. Queste mutazioni appartenenti alla classe I si differenziano da varianti più rare, di classe II, disperse in tutta la sequenza genica [1]. La mutazione più frequente R882H conferisce un effetto dominante-negativo sulla proteina *wild type* e determina una netta diminuzione della formazione di tetrameri proteici e conseguente riduzione dell'attività metil-transferasica [116,117] che genera diffusa ipometilazione del genoma nei pazienti portatori della mutazione [118].

Nonostante sia nello studio iniziale [1], che in numerosi successivi, [119-121] la presenza di mutazioni a carico di *DNMT3A* conferisca una prognosi peggiore in pazienti con rischio citogenetico favorevole, in quelli con rischio intermedio [107] o con mutazione *FLT3-ITD* [122], il ruolo prognostico o di *decision making* di *DNMT3A* è fonte di discussione [13,123]. Infatti, sebbene emerga un aumentato rischio di recidiva precoce [121], questa non detta necessariamente un approccio più aggressivo, quale il ricorso ad HSCT in prima remissione completa. Al contrario, di immediata traslazione clinica è l'osservazione che alte dosi di daunorubicina (90 mg/m^2) rispetto a dosi standard migliorerebbero la sopravvivenza dei pazienti con mutazione *DNMT3A*, *NPM1* e traslocazione di *MLL* [13].

Ten-eleven translocation (TET2)

TET2 appartiene alla famiglia delle proteine TET che modulano l'idrossimetilazione del DNA convertendo 5-metil-citosina (5mC) in 5-idrossi metil-citosina facilitando la demetilazione del DNA. TET2 promuove il mantenimento della cellula staminale ematopoietica e i processi di differenziazione monocitaria [124] e, inoltre, funge da oncosopressore, tanto che la sua delezione in modelli murini è sufficiente a determinare neoplasie ematologiche sia di derivazione linfoide che mieloide [125]. Questo *cross lineage* si evidenzia anche nella frequenza e distribuzione delle mutazioni di *TET2* nelle emopatie. Infatti *TET2* è mutato in ~25-30% dei tumori ematologici [126,127]: 25-30% nella leucemia mielomonocitica cronica [128] (LMMC), 12-34% nelle LMA [129] e 2-33% nelle neoplasie linfoidi [124]. Le mutazioni puntiformi, *frame-shift* e delezioni si localizzano su tutti gli 11 esoni sia in eterozigosi che in omozigosi, con una maggior frequenza per l'esone 3 nei casi associati a CH, senza tuttavia una particolare differenza fra LMA, SMD e LMMC [112]. Le forme in omozigosi si associano a disomia uniparentale del cromosoma 4q, mentre le forme in eterozigosi non si associano ad anomalie strutturali cromosomiche [130]; tuttavia, questa differenza non correla con una differenza nella sopravvivenza fra i due gruppi [130].

L'associazione fra presenza di mutazione a carico del gene *TET2* e prognosi clinica rimane molto controversa, anche per la difficoltà nel comparare studi con popolazioni eterogenee per numerosità, trattamento e bias di selezione [131]. Studi condotti su un'ampia coorte di pazienti hanno dimostrato che la presenza di *TET2* mutato non influisce sulla sopravvivenza dei pazienti affetti da LMA [132-134] o NMP [135]. Al contrario, altri hanno dimostrato che pazienti affetti da LMMC [136] o LMA [131,137-139] hanno una prognosi peggiore. Nelle SMD, le mutazioni di *TET2* correlerebbero con una maggiore sopravvivenza [127], dato tuttavia non confermato in due metanalisi [140,141]. Rimane importante l'osservazione che, nei pazienti con SMD, la mutazione di *TET2* sembri correlare favorevolmente con la risposta al trattamento con HMA [142-144]. In modo simile le mutazioni di *TET2* correlano, unitamente a *ASXL1*, ad un miglioramento nella percentuale di risposta (CR/CRi) nei pazienti affetti da LMA recidivata/refrattaria sottoposta a trattamento con HMA e venetoclax sia in analisi univariata che multivariata in una serie retrospettiva di 90 pazienti [145].

Additional Sex Comb-like 1 (ASXL1)

I *Polycomb Group* (PcG) e *Trithorax Group* (trxG) costituiscono un gruppo di proteine con funzione di regolazione epigenetica [146]. Le proteine PcG sono necessarie per il silenziamento di geni target, mentre le trxG esercitano un effetto opposto ovvero mantengono attiva la trascrizione [147]. Il gene *ASXL1*, localizzato nella regione cromosomica 20q11, appartiene agli enhancer dei geni Trithorax e Polycomb, responsabili del mantenimento dell'attivazione o del silenziamento di PcG e trxG [147]. Mutazioni somatiche di *ASXL1* sono state descritte in circa 11% delle SMD [148], ~8% delle NMP [149], ~50% delle LMMC [150], e in circa 8-20 % delle LMA *de novo* [151,152], con un netto incremento nelle forme evolute da pregressa SMD [153].

La presenza di mutazioni in differenti neoplasie di derivazione mieloide suggerisce che le mutazioni di *ASLX1* siano un evento precoce responsabile dello sviluppo, insieme ad altri regolatori epigenetici, di emopoiesi clonale [111,112]. Le mutazioni di *ASXL1* si distribuiscono in tutte le classi di rischio citogenetico con una maggiore prevalenza in quello intermedio [152,154]. Esse correlano con il sesso maschile, l'età avanzata, immunofenotipo immaturo, ridotta infiltrazione midollare [154], si associano con le mutazioni di *runt related transcription factor-1* (*RUNX1*) [152,154] mentre si escludono in presenza delle mutazioni *NPM1* (mutualmente esclusivo), *FLT3-ITD* (inversamente correlato) [152,154]

e *DNMT3A* [154]. La struttura proteica presenta domini conservati: il primo, N-terminale omologo a ASX, che media l'interazione fra i fattori di trascrizione e i complessi cromatinici, e il secondo un dominio C-terminale *zing-finger* (PHD) che funge da reader per le modificazioni istoniche post traslazionali (PMT) [155]. Nello specifico, ASXL1 funge da proteina legante la cromatina che interagisce su complesso *polycomb repressor complex 2* (PRC2) unitamente alla H3K27 metil-transferasi EZH2. Le mutazioni, la pressoché totalità in eterozigosi, ricorrono nell'esone 12 causando una sequenza più breve della proteina e la conseguente perdita delle funzioni associate al modulo PHD [150,153], ovvero un ridotto reclutamento e stabilizzazione di PRC2 e una riduzione della trimetilazione repressiva di H3K27 in differenti loci genici [156].

Più studi hanno dimostrato che le mutazioni di *ASXL1* rappresentano un genotipo che correla con ridotta sopravvivenza, probabilmente in parte dovuta ad una iniziale resistenza al trattamento chemioterapico [152,157,158]. In particolare, in un'analisi condotta in 740 pazienti affetti da LMA con rischio citogenetico intermedio, le mutazioni di *ASXL1* depongono per una ridotta OS e una ridotta sopravvivenza libera da malattia (ES). Inoltre, dall'analisi multivariata, valutati i parametri età, conta leucocitaria (WBC), stato mutazionale di *ASXL1, FLT3-ITD, MLL-PTD* e *RUNX1*, la presenza della mutazione di *ASXL1* correla in modo indipendente con una ridotta OS, suggerendo la necessità di inserire la ricerca di questa mutazione nel work-up diagnostico delle LMA [152]. L'indipendenza prognostica della presenza di mutazioni di *ASXL1* rispetto ad altri fattori non è stata tuttavia confermata nello studio del AMLSG condotto in 1696 pazienti [154], che tuttavia riporta l'importanza della identificazione delle mutazioni di *ASXL1* soprattutto nel contesto di un genotipo *RUNX1* mutato, poiché tale assetto depone per un incremento del rischio di morte (*hazard ratio* 1.8) rispetto al genotipo *wild type* [154]. Inoltre, nei pazienti con LMA secondaria a SMD, la presenza di mutazioni *ASXL1* unitamente a *RUNX1* o *TP53* identifica un sottogruppo di pazienti a prognosi sfavorevole e con ridotta sopravvivenza, anche in seguito a HSCT [159].

Il ruolo dell'identificazione di *ASXL1* come espressione di CHIP nei donatori di cellule staminali emopoietiche è fonte di studio [160]: è stato riportato ad esempio il caso dell'insorgenza di una *donor leukemia* [161] o la presenza della stessa mutazione potenzialmente leucemogena nel donatore familiare, suggerendo l'importanza nell'ambito delle neoplasie mieloidi di un adeguato screening dei donatori familiari [160-162]. Infine, nonostante il valore prognostico di *ASXL1*, il suo ruolo per decidere un regime intensificato è ancora da chiarire; inoltre, la mutazione non correla con la risposta al trattamento con HMA in pazienti affetti da SMD/sLMA [163].

Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 (IDH1/IDH2).

All'interno del gruppo di mutazioni che regolano la metilazione del DNA e le modificazioni della cromatina vengono classificate anche le alterazioni genetiche a carico di enzimi metabolici come *Isocitrate Dehydrogenase* (IDH) 1 e 2 (*IDH1/IDH2*). Le proteine IDH operano all'interno del ciclo di Krebs catalizzando la decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato ad α-ketoglutarato (α-KG). Le mutazioni di *IDH* sono identificate in circa il 20% di LMA con una prevalenza del 6-16% per *IDH1* e 8-19% per *IDH2* [164]. Come altre mutazioni responsabili dello sviluppo di CH, le mutazioni di *IDH1/2* sono più frequenti nella popolazione adulta con età maggiore di 65 anni, si associano ad un cariotipo diploide e ad un rischio citogenetico intermedio, trisomia del cromosoma 8, duplicazione tandem del gene *MLL*, possono associarsi alle mutazioni di *FLT3-ITD* e *NPM1* e sono pressoché mutualmente esclusive nei confronti di *TET2* and *WT1* [13,165-167]. Le mutazioni avvengono nel dominio catalitico con particolare ricorrenza negli ampliconi *IDH1-R132*, *IDH2-R172* e *IDH2-R140* [168] e causano la riduzione di α-KG nell'oncometabolita 2-idrossiglutarato (2-HG) [168]. L'accumulo di 2-HG blocca i processi di differenziazione e compete, inibendoli, con i processi α-KG-dipendenti fra cui l'idrossimetilazione del DNA dipendente da TET2, la demetilazione degli istoni, i processi di respirazione mitocondriale *B-cell lymphoma-2* (BCL-2)-dipendenti, e l'attivazione delle pathway legate a *hypoxia-inducible-factor-1α* (HIF-1α) attraverso l'inibizione della propil-idrolasi [169-171].

Numerosi studi hanno analizzato l'impatto delle mutazioni di *IDH1/2* nella prognosi delle LMA con risultati discordanti. In particolare, in pazienti a rischio citogenetico intermedio la presenza di mutazioni *IDH1/2*, associate a mutazioni di *NPM1* ma non *FLT3-ITD*, identificherebbero un sottogruppo di pazienti a prognosi favorevole [13,172,173]. Ampliando la popolazione di studio, al contrario, altri hanno dimostrato che anche nei pazienti con *NPM1* mutato, *IDH1/2* peggiorerebbe la prognosi [165,174,175]. In uno studio condotto su 826 pazienti affetti da LMA, 126 con mutazione di *IDH1/2*, il gruppo di Courtney DiNardo ha dimostrato che le mutazioni di *IDH1/2* non influiscono sull'OS, né con la possibilità di ottenere la remissione di malattia (CR e CRi) in ogni fase di trattamento concludendo, come altri, per la mancanza di un ruolo prognostico di queste mutazioni [176-179]. Il ruolo prognostico delle mutazioni di *IDH* è in corso di definizione anche nei pazienti sottoposti a HSCT [180].

Un tentativo di chiarire l'impatto di queste mutazioni potrebbe derivare dallo sforzo di scorporare i diversi genotipi [181]. Dalla meta analisi di circa 30 lavori riportati in letteratura, si evince che le mutazioni di *IDH* se considerate come singolo parametro non determinano un aumento dell'OS o dell'EFS, ma piuttosto un incremento della probabilità di recidiva [181]. Se analizzate singolarmente, *IDH1* conferisce una peggiore OS e EFS, anche nei pazienti con cariotipo normale. Questo dato sarebbe confermabile anche per il polimorfismo di *IDH1* s11554137 [181]. Le mutazioni di *IDH2* migliorano l'OS nei pazienti a rischio citogenetico intermedio, in particolare nei giovani e con mutazione *IDH2-R140* [181] o in quelli con variante *IDH2-R172* se sottoposti a chemioterapia intensiva [7].

Indipendentemente dal ruolo prognostico/predittivo delle mutazioni di *IDH1/2*, la loro identificazione e monitoraggio assumono un significato rilevante per l'identificazione di nuovi approcci terapeutici. Ad esempio, gli inibitori di IDH1 (AG-120, Ivosidenib) sono stati approvati nel luglio 2018 nei pazienti con LMA recidivata/refrattaria sulla base di un *clinical trial* (NCT02074839) che ha dimostrato un tasso di risposta globale in monoterapia del 41.6 %. Un simile indice di risposta in un identico setting di pazienti era stato osservato con gli inibitori di IDH2 (AG-221, Enasidenib, trial NCT01915498). Numerosi studi sono in corso per stabilire l'efficacia di nuovi farmaci, e.g. FT2102, IDH305 o la combinazione di essi con chemioterapia standard o farmaci a bersaglio molecolare [182].

Fattori di trascrizione

Runt-related transcription factor 1 (RUNX1)

RUNX1 (o AML1) appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione *core-binding factor* (CBF) e fu inizialmente identificato nel contesto della caratterizzazione della traslocazione t(8;21) [183]. Da allora più di 50 partner di *AML1* o *CBF* subunità α-2 (*CBFA2*), nome inizialmente attribuito a questo gene, sono stati descritti [184] sia in patologie a derivazione linfoide come la leucemia linfoblastica (e.g. t(3;21)) sia in forme mieloidi come SMD e LMA secondarie, a sottolineare l'importanza di questo gene nella differenziazione ematopoietica. Le mutazioni di *RUNX1* furono dapprima descritte nelle LMA nel 1999 [185] e successivamente confermate in numerose altre emopatie come LLA, SMD, e LMMC [186]. Le alterazioni germinali sono responsabili di trombocitopenia familiare associata allo sviluppo di neoplasie mieloidi (FPDMM) [187]. In differenti modelli sperimentali, inoltre, l'alterazione funzionale secondaria alla presenza di mutazioni intrageniche di *RUNX1* predispongono allo sviluppo di una LMA espandendo i progenitori staminali emopoietici, alterando i processi differenziativi, inducendo resistenza agli stress genotossici e riducendo la biogenesi dei ribosomi [188-190].

Un aspetto caratteristico delle mutazioni di *RUNX1* è la loro maggior frequenza nei pazienti esposti a radiazioni ionizzanti affetti da LMA /SMD o da forme secondarie (*therapy related* AML, t-AML), con una associazione significativa nei casi con monosomia o delezione del cromosoma 7 o trisomia del 13 [191-193]. LMA o SMD secondarie a patologie ereditarie come l'anemia di Fanconi, la sindrome di Down, la neutropenia congenita, o il disordine piastrinico familiare [194] presentano alterazioni delle pathway di *RUNX1* [195-197].

Nello studio cooperativo AMLSG su 2439 casi di LMA con età compresa fra i 16 e gli 84 anni, la frequenza delle mutazioni di *RUNX1* veniva stimata in circa il 10% dei campioni analizzati con una clusterizzazione degli eventi, come per altri studi [198], fra l'esone 3 e l'8, corrispondenti ai due domini funzionali proteici *Runt Homology Domain* e *Transactivation Domain*, con una prevalenza di mutazioni frameshift [193]. La numerosità campionaria inoltre permetteva di identificare alcune forti associazioni come: l'età avanzata (> 70 anni), il sesso maschile, la secondarietà rispetto ad una SMD, alta conta piastrinica ed un fenotipo M0 in accordo con la classificazione FAB. Le mutazioni di *RUNX1* sono più frequenti nelle LMA a rischio intermedio secondo ELN e si associano più frequentemente alle mutazioni dei geni *ASXL1*, *KMT2A* and *IDH2*. Una analisi per subset ha inoltre rilevato una associazione fra le mutazioni di *RUNX1* e gli *splicing factor SRSF2* e *SF3B1*, il fattore di trascrizione *BCOR*, l'oncosoppressore *PHF6*, e *STAG2* del complesso delle coesine, non precedentemente descritte; sono invece mutualmente esclusive rispetto alle anomalie citogenetiche ricorrenti a prognosi favorevole t(15;17), *PML-RARA*; inv(16) *CBFB-MYH11* e t(8;21), *RUNX1-RUNX1T1* e inversamente correlate alle mutazioni di *NPM1* e alle mutazioni bialleliche di CEPBA [193].

La presenza di mutazioni di *RUNX1* correla, in modo indipendente rispetto ad altri fattori, con una inferiore percentuale di remissioni complete dopo induzione, in particolare nella popolazione anziana. Probabilmente ciò è dovuto ad una maggior frequenza di tali mutazioni in LMA chemioresistenti; tra queste il genotipo *RUNX1*^{mut}/*ASXL1*^{mut} risulta tra i più sfavorevoli [193]. Indipendentemente dall'età *RUNX1* mutato correla, in analisi univariata, con inferiore OS e EFS [193,199] anche nei pazienti sottoposti a HSCT [193,200], con un ulteriore effetto sfavorevole in termini di outcome nei casi secondari rispetto alle forme *de novo* [193] o nei genotipi *RUNX1*^{mut}/*ASXL1*^{mut}, *RUNX1*^{mut}/*SRSF2*^{mut}, *RUNX1*^{mut}/*PHF6*^{mut}. In analisi multivariata, *RUNX1*^{mut} rappresenta un fattore prognostico negativo che determina una ridotta EFS ma non una ridotta OS [193].

Sebbene la maggioranza degli studi identifichi le LMA con mutazioni di *RUNX1* come un sottogruppo aggressivo e concordi con il ruolo prognostico peggiorativo della loro presenza alla diagnosi, trial clinici prospettici che determinino il ruolo di una terapia intensificata o la necessità di eseguire HSCT in prima CR sono scarsi [201]. Altrettanto difficilmente attuabile, essendo *RUNX1* un fattore di trascrizione, l'idea di una terapia mirata. Tuttavia un recente studio ha dimostrato che la deplezione di *RUNX1*^{mut} attraverso l'utilizzo di inibitori [202] o *degrader* dei BET-Bromodomain esercita un effetto antileucemico in modelli murini [203], ipotizzando un loro futuro potenziale nella pratica clinica.

GATA-Binding Protein, GATA2 a

GATA2 codifica per un fattore di trascrizione con domini *zinc-finger* inserito all'interno del network di segnali che regolano la differenziazione mieloide [204]. Mutazioni di *GATA2* sono state descritte nel ~5% di LMA *de novo* con una decisa prevalenza, ~25%, nei casi con mutazione biallelica *CEPBA* (*CEPBA* $^{double\text{-}mut}$) [205], nei casi di trasformazione blastica di leucemia mieloide cronica (LMC) [206] in alcune forme di familiari di LMA/SMD [207]. Le mutazioni tendono a clusterizzare nei due domini

funzionali ZF1 e ZF2 [208] e, sebbene le mutazioni a carico del secondo dominio abbiano un impatto prognostico peggiore [208], il loro contributo nella definizione della prognosi delle LMA è ancora molto dibattuto e i dati a disposizione non sono sufficienti per stabilire un programma terapeutico, anche nel contesto *CEPBA* [double-mut]: infatti in questo setting la presenza della mutazione *GATA2* non sembra modificare l'impatto favorevole correlato a *CEBPA* [209,210]. Sebbene *GATA2* sia studiato da molti anni, il suo contributo nel processo di leucemogenesi rimane da chiarire per molti aspetti [211]. È ipotizzabile che la recente identificazione di un ruolo differente per le mutazioni di ZF1 e ZF2 possa permettere la costruzione di modelli preclinici che pongano *GATA2* all'interno di altri contesti genetici, come alcune anomalie cromosomiche (+8, -7) mutazioni *ASXL1* e *CEPBA* [double-mut (211)].

CCAAT/enhancer binding protein α (CEBPA)

CEBPA è un fattore di trascrizione il cui gene mappa a livello del braccio lungo del cromosoma 19 in posizione 13.1 [212] e regola i processi di differenziamento granulocitario [213-216]. Le mutazioni ricorrono dal 5% al 15% dei casi di LMA [217] e sono riconducibili a due categorie [218]: mutazioni N-terminali che determinano un segnale prematuro di stop portando alla formazione di una proteina CEBPA p30 piuttosto che p42, e le mutazioni a livello della regione C-terminale che rappresentano per lo più mutazioni in-frame [219]. Tutte le mutazioni possono presentarsi in forma mono (fino al 47% dei casi) o biallelica - *CEPBA* [double-mut], sia in omozigosi che in doppia eterozigosi. La forma biallelica, un'entità nosologica distinta all'interno della classificazione del WHO 2016 [29], si associa a morfologia M1-M2 secondo FAB, a cariotipo normale ed è mutualmente esclusiva con *NPM1*. Rara è la presenza della co-mutazione di *FLT3* [220]. Lo studio della mutazione di *CEBPA* su ampie popolazioni di pazienti con LMA ha consentito di definirne non solo le caratteristiche cliniche ma anche il significato prognostico, favorevole, che la mutazione conferisce alla malattia, quando presente in forma biallelica [221, 222]. Le mutazioni della porzione N-terminale possono inoltre rappresentare il prototipo di lesioni *germline* che predispongono all'insorgenza di neoplasie mieloidi [223]. Su queste mutazioni si possono successivamente instaurare eventi somatici, più spesso a livello della regione C-terminale, che conducono allo sviluppo di una LMA con un periodo di latenza di circa 10-30 anni [224]. Anche nella sua variante familiare, la LMA con mutazione di *CEBPA* ha confermato la sua connotazione prognostica favorevole con elevata percentuale di remissione completa e dati di sopravvivenza globale sovrapponibili alla LMA con mutazione biallelica sporadica [223].

Wilms Tumor 1 (WT1)

WT1 mappa sul cromosoma 11p13 e codifica per una proteina con potente attività di regolazione trascrizionale, soprattutto per quanto riguarda geni coinvolti nella crescita e nel metabolismo cellulare [225-227]. La delezione costituzionale a carico del locus di *WT1* fu identificata per la prima volta in pazienti affetti da sindrome WAGR (tumore di Wilms, aniridia, malformazioni genitourinarie, ritardo mentale) [228]. Successivamente vennero descritte diverse mutazioni di *WT1*, ricorrenti nel 10-15% dei casi di tumore di Wilms sporadico [229,230]. Dopo l'iniziale descrizione di una LMA secondaria in un paziente con sindrome WAGR [231], due studi consecutivi confermarono la presenza di mutazioni di *WT1* in circa il 12% delle LMA [231,232] che si accompagnavano ad una sostanziale refrattarietà ai regimi di induzione, configurandosi come fattore prognostico sfavorevole.
L'impatto prognostico delle mutazioni di *WT1* nelle LMA a cariotipo normale è stato in seguito indagato in un ampio studio del gruppo cooperativo AMLSG, senza però che emergesse una reale valenza, se non in presenza della co-mutazione *FLT3-ITD* [233]. Più recentemente uno studio condotto su oltre 3000 pazienti ha valutato incidenza e impatto delle più frequenti mutazioni di *WT1* a carico dell'esone 7 e dell'esone 9 (circa 188 mutazioni identificate), confermando una certa tendenza di associazione con *FLT3-ITD* e *CEBPA* [double-mut], mentre rare si sono dimostrate le co-mutazioni di *DNMT3A*, *ASXL1* e *IDH1-2*. Il potenziale significato prognostico sfavorevole nelle LMA a cariotipo normale si è confermato in termini di EFS [234]. Inoltre, è stato ulteriormente chiarito il significato prognostico di *WT1* nei pazienti con LMA *CEBPA* [*double-mut*], dove la mutazione conferirebbe una prognosi peggiore configurando una entità meritevole di approcci terapeutici intensivi e HSCT in prima linea [235].
Mentre le mutazioni di *WT1* rappresentano un evento relativamente poco frequente, l'iperespressione del gene è invece un evento ricorrente nelle LMA in oltre il 75% dei casi [236-238]. Numerosi studi hanno tentato di valutare l'impatto prognostico dei livelli di espressione di WT1 alla diagnosi e la potenziale valenza di tale dato come marcatore di MRD [239-242].
Sebbene non vi siano a riguardo dati sufficientemente consistenti, la valutazione del livello di espressione dopo chemioterapia di induzione, pre-HSCT e nel follow-up post-trapianto ha mostrato una correlazione con l'outcome [243-245] e possiede un significato prognostico, soprattutto in assenza di altri marcatori affidabili di malattia residua.

Fattori di splicing

Le mutazioni dei fattori di splicing come *LUC7L2*, *PRPF8*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* e *ZRSR2* sono frequenti nelle SMD e NMP ed in circa il 5-10% dei casi di LMA. La frequenza di queste mutazioni correla con l'età avanzata e ad una ridotta risposta al trattamento standard ed un'inferiore sopravvivenza [246].
Si ipotizza che le mutazioni a carico dello spliceosoma causino *mis-splicing* con la formazione di trascritti alternativi e la conseguente alterata espressione di fattori di trascrizione (e.g. *PU.1*, *RUNX1*) o di geni coinvolti nel controllo epigenetico, nella differenziazione ematopoietica o nell'integrità genomica [247]. Le mutazioni presentano una distribuzione simile sia nelle SMD che nelle LMA e sono complessivamente tutte in eterozigosi.

Alcune di queste mutazioni si associano con pattern specifici di malattia come *SF3B1* nelle SMD con sideroblasti ad anello, *SRSF2* nelle LMMC e *U2AF1* nelle LMA secondarie, suggerendo l'opportunità dello studio di queste mutazioni in fase diagnostica anche per il ruolo che queste rivestono nel percorso di diagnosi differenziale nelle SMD/NMP [248]. Nelle leucemie acute le modificazioni degli *splicing factor* co-occorrono principalmente con i geni *RUNX1*, *ASXL1*, *IDH2* e *TET2* e raramente le une con le altre [249].

La mutua esclusività di queste mutazioni sottende l'ipotesi che la cellula neoplastica non tolleri la presenza di due o più lesioni a carico di questi geni. Questa condizione può essere riprodotta chimicamente attraverso un meccanismo di letalità sintetica, ovvero attraverso l'utilizzo di inibitori dei fattori di *splicing* [250]. Su tale ipotesi si basa ad esempio la sperimentazione con H3B-8800 (NC022841540), un farmaco derivato della famiglia dei pladienolidi, inibitore selettivo ed oralmente disponibile delle proteine SF3b mutata e *wild type* [251]. Inoltre, con l'emergere di nuove terapie come ad esempio luspatercept (ACE-536), la caratterizzazione precoce del profilo genetico potrebbe identificare sottogruppi di pazienti sensibili a questi farmaci come, nel caso specifico, pazienti affetti da SMD con mutazione di *SF3B1* [252].

Oncosoppressori

Tumor Protein 53 (TP53)

L'oncosoppressore *TP53* (17p13.1) è fra i geni più frequentemente mutati nei tumori umani, con una incidenza superiore al 50%. Il ruolo della proteina TP53 nelle neoplasie è legato alla sua funzione nel controllo della stabilità del genoma, dei processi di senescenza, apoptosi, metabolismo e sorveglianza dei meccanismi per la riparazione del danno del DNA. Tuttavia, il contributo di TP53 nella trasformazione neoplastica leucemica rimane enigmatico. Infatti, contrariamente ai tumori solidi, le mutazioni di *TP53* nelle leucemie acute *de novo* sono presenti solo nel ~5% dei casi [253]. Rare sono anche le LMA secondarie a mutazioni germinali di *TP53* come nella sindrome di Li-Fraumeni (~5%) [254]. Al contrario nelle forme secondarie a SMD o t-LMA, soprattutto in pazienti con storia di esposizione a radiazioni ionizzanti [255], la frequenza di queste mutazioni triplica [7] e, complessivamente, si associa ad un cariotipo complesso, età avanzata, chemioresistenza e ridotta sopravvivenza [256,257]. Inoltre, il tentativo di classificare le mutazioni sulla base della predizione dell'effetto sulla funzionalità proteica, come applicato per altri tipi di tumori (e.g *disurptive* o *non disurptive*), non ha permesso la definizione di classi di rischio dipendenti da *TP53* [258] o chiarito il ruolo degli hotspot P72R, R175H, Y220C, R248Q e R273C [259]. Una eccezione è rappresentata dalla eritroleucemia, dove le alterazioni di *TP53* dominano la frequenza degli eventi genetici [260-262], o nei casi di LMA evoluti da policitemia vera (PV) o trombocitemia essenziale (TE) [263]. Inoltre, data l'accessibilità a piattaforme NGS per la rapida identificazione di mutazioni di *TP53*, risulta fondamentale il loro riconoscimento nelle SMD dove la presenza di mutazioni bi-alleliche correla con resistenza al trattamento e rapida progressione in LMA e pertanto indica la necessità di un approccio basato sul trapianto allogenico di cellule staminali nei pazienti eleggibili [264]. È proprio il valore predittivo indipendente di *TP53*, riconosciuto in molteplici studi in particolare nei pazienti con cariotipo complesso [7,265] rispetto ai pazienti *TP53 wild type* [262,265,266], che fa di questo gene una piattaforma unica per sviluppare strategie terapeutiche per la riattivazione farmacologica di oncosoppressori. In tal senso lo sviluppo di inibitori di TP53 è fortemente atteso.

Un esempio è rappresentato dallo sviluppo degli inibitori di MDM2 (e.g. idasanutlin), una proteina che funziona in complesso con TP53 e che se inibita facilita la stabilizzazione di TP53 *wild type* facilitandone la riattivazione [267].

Mutazioni germinali

Sebbene le mutazioni identificate nelle LMA si presuma che abbiano una origine somatica, studi recenti hanno dimostrato che come nei tumori solidi alcune neoplasie ematologiche derivano da una sottostante sindrome congenita che predispone alla trasformazione neoplastica [268].

Alla diagnosi difficilmente si ottiene un campione costituzionale e la tecnologia corrente non è in grado di differenziare le mutazioni costituzionali da quelle somatiche ed è per tale motivo che ogni sospetto diagnostico in questa direzione deve essere documentato attraverso un'attenta anamnesi familiare. La trasmissione ereditaria di alcune mutazioni germinali dei fattori di trascrizione *CEPBA*, *RUNX1* e *GATA2* è ampiamente documentata e racchiusa anche all'interno della classificazione WHO del 2016 [29].

Inoltre, la possibile identificazione precoce di alcune di queste mutazioni e la lunga latenza di insorgenza della neoplasia obbliga a considerare un programma di monitoraggio per questa popolazione di pazienti [269].

Conclusioni

Dati i recenti progressi nella comprensione dei meccanismi di leucemogenesi, siamo nella posizione tecnologica di poter offrire diagnosi sempre più accurate e un monitoraggio attento durante il decorso della malattia. Lo sviluppo di nuove terapie (Tabella 2) segue queste nuove conoscenze, permettendo sempre più spesso di traslare nuovi approcci terapeutici apportando un crescente reale beneficio per i pazienti. Alcuni esempi di successi anche in monoterapia, come per esempio per gli inibitori di *FLT3*, *IDH1* e *IDH2*, anticipano nuovi orizzonti. L'obiettivo futuro sarà quello di organizzare queste informazioni genetiche e, eventualmente, fonderle con modelli chemogenomici in modo da poter identificare risposte terapeutiche non prevedibili esclusivamente dal profilo genetico.

Classe	Frequenza (~ %)	Valore prognostico	Terapie Target
NPM1	30 (55% NK* AML)	Favorevole ← FLT-ITD neg	Dactinomicina, Selinexor
FLT3-ITD	30	Sfavorevole ← ratio >0.5	Sorafenib, Midostaurina, Gilteritinib, Crenolanib, Quizartinib
FLT3-TKD	10-15	Neutrale	Midostaurina, Gilteritinib, Crenolanib
KIT	20-30 CBF**	Sfavorevole > t(8;21)	Dasatinib
RAS	25	Non definito	Rigosertib, Trametinib (MEKi)
DNMT3A	35	Non definito	***
TET2	10-30	Non definito	sensibilità a ipometilanti
ASXL1	8-20	Sfavorevole > RUNX1 mut	***
IDH1/2	10-20	Non definito	Enasidenib, Ivosidenib
CEBPA	5-15	Favorevole ← $CEBPA^{double\text{-}mt}$	***
RUNX1	10	Sfavorevole > ASXL1 mut	***
WT1	12	Neutrale (sfavorevole se $CEBPA^{double\text{-}mt}$)	***
TP53	5-15	Sfavorevole	Idasanutlin
*Cariotipo normale, **Core Binding Factor, ***Target therapy non disponibili, ← Solo se, > In particolare se.			

***Tabella 2** - Terapie target mirate.*

Bibliografia

1. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. Nature. 2008;456(7218):66-72.
2. Mehranfar S, Zeinali S, Hosseini R, et al. History of Leukemia: Diagnosis and Treatment from Beginning to Now. Galen Med J. 2017;6(1):12-22.
3. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, et al. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. Blood Rev. 2019;36:70-87.
4. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2010;24(1):35-63.
5. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2002;3:179-98.
6. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science. 1999;286(5439):531-7.
7. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2016;374(23):2209-21.
8. Weltermann A, Fonatsch C, Haas OA, et al. Impact of cytogenetics on the prognosis of adults with de novo AML in first relapse. Leukemia. 2004;18(2):293-302.
9. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood. 2002;100(13):4325-36.
10. Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. Blood. 2001;98(5):1312-20.
11. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2010;115(3):453-74.
12. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2013;368(22):2059-74.
13. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2012;366(12):1079-89.
14. Chang JH, Olson MO. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. J Biol Chem. 1990;265(30):18227-33.
15. Yun JP, Chew EC, Liew CT, et al. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. J Cell Biochem. 2003;90(6):1140-8.
16. Wang D, Umekawa H, Olson MO. Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. Cell Mol Biol Res. 1993;39(1):33-42.
17. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, et al. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. Cell. 1989;56(3):379-90.
18. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. Science. 1994;263(5151):1281-4.
19. Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, et al. The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. Oncogene. 1996;12(2):265-75.
20. Redner RL, Rush EA, Faas S, et al. The t(5;17) variant of acute promyelo-

cytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. Blood. 1996;87(3):882-6.
21. Cordell JL, Pulford KA, Bigerna B, et al. Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. Blood. 1999;93(2):632-42.
22. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med. 2005;352(3):254-66.
23. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114(5):937-51.
24. Falini B, Brunetti L, Sportoletti P, et al. NPM1-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside. Blood. 2020;136(15):1707-21.
25. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. Blood. 2009;114(14):3024-32.
26. Falini B, Martelli MP, Bolli N, et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? Blood. 2011;117(4):1109-20.
27. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. Blood. 2016;127(1):29-41.
28. Falini B, Macijewski K, Weiss T, et al. Multilineage dysplasia has no impact on biologic, clinicopathologic, and prognostic features of AML with mutated nucleophosmin (NPM1). Blood. 2010;115(18):3776-86.
29. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.
30. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424-47.
31. Falini B, Sportoletti P. A scale of "bad" co-mutations in NPM1-driven AML. Blood. 2017;130(17):1877-9.
32. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. Blood. 2013;121(14):2734-8.
33. Boddu P, Kantarjian H, Borthakur G, et al. Co-occurrence of FLT3-TKD and NPM1 mutations defines a highly favorable prognostic AML group. Blood Adv. 2017;1(19):1546-50.
34. Forghieri F, Nasillo V, Paolini A, et al. NPM1-Mutated Myeloid Neoplasms with <20% Blasts: A Really Distinct Clinico-Pathologic Entity? Int J Mol Sci. 2020;21(23):8975.
35. Falini B, Brunetti L, Martelli MP. How I diagnose and treat NPM1-mutated AML. Blood. 2021;137(5):589-99.
36. Tomlinson B, Lazarus HM. Enhancing acute myeloid leukemia therapy - monitoring response using residual disease testing as a guide to therapeutic decision-making. Expert Rev Hematol. 2017;10(6):563-74.
37. Chou WC, Tang JL, Wu SJ, et al. Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations. Leukemia. 2007;21(5):998-1004.
38. Bacher U, Badbaran A, Fehse B, Zabelina T, Zander AR, Kroger N. Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation. Exp Hematol. 2009;37(1):135-42.
39. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, et al. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. Br J Haematol. 2009;144(4):517-23.
40. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. Leukemia. 2006;20(6):1103-8.
41. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. N Engl J Med. 2016;374(5):422-33.
42. Lambert J, Pautas C, Terre C, et al. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. Haematologica. 2019;104(1):113-9.
43. Lachowiez CA, Loghavi S, Kadia TM, et al. Outcomes of older patients with NPM1-mutated AML: current treatments and the promise of venetoclax-based regimens. Blood Adv. 2020;4(7):1311-20.
44. Tiong IS, Dillon R, Ivey A, et al. Venetoclax induces rapid elimination of NPM1 mutant measurable residual disease in combination with low-intensity chemotherapy in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 20201;192(6):1026-30.
45. Falini B, Brunetti L, Martelli MP. Dactinomycin in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2015;373(12):1180-2.
46. Gionfriddo I, Brunetti L, Mezzasoma F, et al. Dactinomycin induces complete remission associated with nucleolar stress response in relapsed/refractory NPM1-mutated AML. Leukemia. 2021. doi: 10.1038/s41375-021-01192-7.
47. Burger K, Muhl B, Harasim T, et al. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. J Biol Chem. 2010;285(16):12416-25.
48. Bhatnagar B, Zhao Q, Mims AS, et al. Selinexor in combination with decitabine in patients with acute myeloid leukemia: results from a phase 1 study. Leuk Lymphoma. 2020;61(2):387-96.
49. Sweet K, Komrokji R, Padron E, et al. Phase I Clinical Trial of Selinexor in Combination with Daunorubicin and Cytarabine in Previously Untreated Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia. Clin Cancer Res. 2020;26(1):54-60.
50. Wang AY, Weiner H, Green M, et al. A phase I study of selinexor in combination with high-dose cytarabine and mitoxantrone for remission induction in patients with acute myeloid leukemia. J Hematol Oncol. 2018;11(1):4.
51. Fiedler W, Chromik J, Amberg S, et al. A Phase II study of selinexor plus cytarabine and idarubicin in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML). HemaSphere. 2019;3(S1):395. Br J Haematol. 2020;190(3):e169-e173.
52. Ranganathan P, Yu X, Na C, et al. Preclinical activity of a novel CRM1 inhibitor in acute myeloid leukemia. Blood. 2012;120(9):1765-73.
53. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, et al. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. Nat Immunol. 2007;8(11):1207-16.
54. Kenins L, Gill JW, Hollander GA, et al. Flt3 ligand-receptor interaction is important for maintenance of early thymic progenitor numbers in steady-state thymopoiesis. Eur J Immunol. 2010;40(1):81-90.
55. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood. 2002;99(12):4326-35.
56. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood. 2002;100(5):1532-42.
57. Takahashi S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. J Hematol Oncol. 2011;4:13.
58. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood. 2000;96(12):3907-14.
59. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. Oncogene. 2000;19(5):624-31.
60. Neumann M, Heesch S, Gökbuget N, et al. Clinical and molecular characterization of early T-cell precursor leukemia: a high-risk subgroup in adult T-ALL with a high frequency of FLT3 mutations. Blood Cancer Journal. 2012;2(1):e55.

61. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. Br J Haematol. 2000;111(1):190-5.

62. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood. 2001;98(6):1752-9.

63. Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2008;111(5):2776-84.

64. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, United Kingdom National Cancer Research Institute Acute Myeloid Leukemia Study G. Higher daunorubicin exposure benefits FLT3 mutated acute myeloid leukemia. Blood. 2016;128(3):449-52.

65. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. Blood. 2014;124(23):3441-9.

66. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood. 2001;97(8):2434-9.

67. Smith CC, Lin K, Stecula A, et al. FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors. Leukemia. 2015;29(12):2390-2.

68. Weisberg E, Roesel J, Furet P, et al. Antileukemic Effects of Novel First- and Second-Generation FLT3 Inhibitors: Structure-Affinity Comparison. Genes Cancer. 2010;1(10):1021-32.

69. Smith CC, Wang Q, Chin CS, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. Nature. 2012;485(7397):260-3.

70. Ke YY, Singh VK, Coumar MS, et al. Homology modeling of DFG-in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and structure-based virtual screening for inhibitor identification. Sci Rep. 2015;5:11702.

71. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. N Engl J Med. 2017;377(5):454-64.

72. Larson RA, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. An Analysis of Maintenance Therapy and Post-Midostaurin Outcomes in the International Prospective Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]) for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients with FLT3 Mutations. Blood. 2017;130(Supplement 1):145.

73. Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. N Engl J Med. 2019;381(18):1728-40.

74. Bazarbachi A, Bug G, Baron F, et al. Clinical practice recommendation on hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with FLT3-internal tandem duplication: a position statement from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Haematologica. 2020;105(6):1507-16.

75. Muppidi MR, Portwood S, Griffiths EA, et al. Decitabine and Sorafenib Therapy in FLT-3 ITD-Mutant Acute Myeloid Leukemia. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2015;15 Suppl:S73-79.

76. Cortes JE, Altman J, Ritchie EK, et al. A phase II/III, multicenter, open-label, 3-arm study of gilteritinib, gilteritinib plus azacitidine, or azacitidine alone in the treatment of newly diagnosed FLT3 mutation-positive acute myeloid leukemia (AML) patients ineligible for intensive induction chemotherapy. J Clin Oncol. 2017;35(15_suppl):TPS7068-TPS7068.

77. Schnittger S, Bacher U, Kern W, et al. Prognostic impact of FLT3-ITD load in NPM1 mutated acute myeloid leukemia. Leukemia. 2011;25(8):1297-304.

78. Morita K, Wang F, Jahn K, et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. Nat Commun. 2020;11(1):5327.

79. Dovey OM, Cooper JL, Mupo A, et al. Molecular synergy underlies the co-occurrence patterns and phenotype of NPM1-mutant acute myeloid leukemia. Blood. 2017;130(17):1911-22.

80. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. Science. 1998;279(5350):577-80.

81. Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, et al. KIT mutations are common in testicular seminomas. Am J Pathol. 2004;164(1):305-13.

82. Tian Q, Frierson HF, Jr, Krystal GW, et al. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. Am J Pathol. 1999;154(6):1643-7.

83. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(23):10560-4.

84. Beghini A, Ripamonti CB, Cairoli R, et al. KIT activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication. Haematologica. 2004;89(8):920-5.

85. Nakatsuka S, Hongyo T, Syaifudin M, et al. Mutations of p53, c-kit, K-ras, and beta-catenin gene in non-Hodgkin's lymphoma of adrenal gland. Jpn J Cancer Res. 2002;93(3):267-74.

86. Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, et al. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. Br J Haematol. 2003;121(5):775-7.

87. Boissel N, Leroy H, Brethon B, et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). Leukemia. 2006;20(6):965-70.

88. Paschka P, Schlenk RF, Weber D, et al. Adding dasatinib to intensive treatment in core-binding factor acute myeloid leukemia-results of the AMLSG 11-08 trial. Leukemia. 2018;32(7):1621-30.

89. Boissel N, Renneville A, Leguay T, et al. Dasatinib in high-risk core binding factor acute myeloid leukemia in first complete remission: a French Acute Myeloid Leukemia Intergroup trial. Haematologica. 2015;100(6):780-5.

90. Mosna F, Papayannidis C, Martinelli G, et al. Complex karyotype, older age, and reduced first-line dose intensity determine poor survival in core binding factor acute myeloid leukemia patients with long-term follow-up. Am J Hematol. 2015;90(6):515-23.

91. Tarlock K, Alonzo TA, Wang YC, et al. Functional Properties of KIT Mutations Are Associated with Differential Clinical Outcomes and Response to Targeted Therapeutics in CBF Acute Myeloid Leukemia. Clin Cancer Res. 2019;25(16):5038-48.

92. Craig JW, Hasserjian RP, Kim AS, et al. Detection of the KIT(D816V) mutation in myelodysplastic and/or myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes predicts concurrent systemic mastocytosis. Mod Pathol. 2020;33(6):1135-45.

93. Jawhar M, Dohner K, Kreil S, et al. KIT D816 mutated/CBF-negative acute myeloid leukemia: a poor-risk subtype associated with systemic mastocytosis. Leukemia. 2019;33(5):1124-34.

94. DeFeo D, Gonda MA, Young HA, et al. Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78(6):3328-32.

95. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, et al. Mechanism of activation of a human oncogene. Nature. 1982;300(5888):143-9.

96. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, et al. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. Nature. 1982;297(5866):474-8.

97. Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, et al. Analysis of RAS gene mutations in acute

myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(5):1629-33.
98. Janssen JW, Steenvoorden AC, Lyons J, et al. RAS gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(24):9228-32.
99. Bowen DT, Frew ME, Hills R, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. Blood. 2005;106(6):2113-9.
100. Badar T, Patel KP, Thompson PA, et al. Detectable FLT3-ITD or RAS mutation at the time of transformation from MDS to AML predicts for very poor outcomes. Leuk Res. 2015;39(12):1367-74.
101. Groschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, et al. Mutational spectrum of myeloid malignancies with inv(3)/t(3;3) reveals a predominant involvement of RAS/RTK signaling pathways. Blood. 2015;125(1):133-9.
102. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, et al. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? Blood. 2007;109(2):431-48.
103. Wang S, Wu Z, Li T, et al. Mutational spectrum and prognosis in NRAS-mutated acute myeloid leukemia. Sci Rep. 2020;10(1):12152.
104. Navada SC, Garcia-Manero G, OdchimarReissig R, et al. Rigosertib in combination with azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia: Results of a phase 1 study. Leuk Res. 2020;94:106369.
105. Burgess MR, Hwang E, Firestone AJ, et al. Preclinical efficacy of MEK inhibition in Nras-mutant AML. Blood. 2014;124(26):3947-55.
106. Challen GA, Sun D, Jeong M, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nat Genet. 2011;44(1):23-31.
107. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2010;363(25):2424-33.
108. Ho PA, Kutny MA, Alonzo TA, et al. Leukemic mutations in the methylation-associated genes DNMT3A and IDH2 are rare events in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group. Pediatr Blood Cancer. 2011;57(2):204-9.
109. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov. 2012;2(5):401-4.
110. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. Nat Med. 2014;20(12):1472-8.
111. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. N Engl J Med. 2014;371(26):2477-87.
112. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. N Engl J Med. 2014;371(26):2488-98.
113. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. Blood. 2015;126(1):9-16.
114. Roller A, Grossmann V, Bacher U, et al. Landmark analysis of DNMT3A mutations in hematological malignancies. Leukemia. 2013;27(7):1573-8.
115. Gale RE, Lamb K, Allen C, et al. Simpson's Paradox and the Impact of Different DNMT3A Mutations on Outcome in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2015;33(18):2072-83.
116. Holz-Schietinger C, Matje DM, Reich NO. Mutations in DNA methyltransferase (DNMT3A) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation. J Biol Chem. 2012;287(37):30941-51.
117. Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, et al. The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. Cancer Cell. 2014;25(4):442-54.
118. Yang L, Rodriguez B, Mayle A, et al. DNMT3A Loss Drives Enhancer Hypomethylation in FLT3-ITD-Associated Leukemias. Cancer Cell. 2016;29(6):922-34.
119. Thol F, Damm F, Ludeking A, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2011;29(21):2889-96.
120. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2012;30(7):742-50.
121. Tie R, Zhang T, Fu H, et al. Association between DNMT3A mutations and prognosis of adults with de novo acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2014;9(6):e93353.
122. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. Blood. 2013;121(18):3563-72.
123. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. J Clin Oncol. 2011;29(5):475-86.
124. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, et al. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. Leukemia. 2014;28(3):485-96.
125. Li Z, Cai X, Cai CL, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. Blood. 2011;118(17):4509-18.
126. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med. 2009;360(22):2289-301.
127. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). Blood. 2009;114(15):3285-91.
128. Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, et al. Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. Leukemia. 2011;25(5):877-9.
129. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2012;26(5):934-42.
130. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Blood. 2009;113(25):6403-10.
131. Liu WJ, Tan XH, Luo XP, et al. Prognostic significance of Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2) gene mutations in adult patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. Leuk Lymphoma. 2014;55(12):2691-8.
132. Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, et al. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. Blood. 2010;116(7):1132-5.
133. Kosmider O, Delabesse E, de Mas VM, et al. TET2 mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study. Haematologica. 2011;96(7):1059-63.
134. Gaidzik VI, Paschka P, Spath D, et al. TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. J Clin Oncol. 2012;30(12):1350-7.
135. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. Leukemia. 2009;23(5):905-11.
136. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. Haematologica. 2009;94(12):1676-81.
137. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. Blood. 2009;114(1):144-7.
138. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 2011;29(10):1373-81.

139. Aslanyan MG, Kroeze LI, Langemeijer SM, et al. Clinical and biological impact of TET2 mutations and expression in younger adult AML patients treated within the EORTC/GIMEMA AML-12 clinical trial. Ann Hematol. 2014;93(8):1401-12.

140. Guo Z, Zhang SK, Zou Z, et al. Prognostic significance of TET2 mutations in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. Leuk Res. 2017;58:102-7.

141. Lin Y, Lin Z, Cheng K, et al. Prognostic role of TET2 deficiency in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. Oncotarget. 2017;8(26):43295-305.

142. Flach J, Dicker F, Schnittger S, et al. Mutations of JAK2 and TET2, but not CBL are detectable in a high portion of patients with refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis. Haematologica. 2010;95(3):518-9.

143. Couronne L, Lippert E, Andrieux J, et al. Analyses of TET2 mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias. Leukemia. 2010;24(1):201-3.

144. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. Nat Genet. 2009;41(7):838-42.

145. Aldoss I, Yang D, Pillai R, et al. Association of leukemia genetics with response to venetoclax and hypomethylating agents in relapsed/refractory acute myeloid leukemia. Am J Hematol. 2019;94(10):E253-E255.

146. Fisher CL, Randazzo F, Humphries RK, et al. Characterization of Asxl1, a murine homolog of Additional sex combs, and analysis of the Asx-like gene family. Gene. 2006;369:109-18.

147. Fisher CL, Pineault N, Brookes C, et al. Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. Blood. 2010;115(1):38-46.

148. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol. 2009;145(6):788-800.

149. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2009;23(11):2183-6.

150. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol. 2010;151(4):365-75.

151. Chou WC, Huang HH, Hou HA, et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. Blood. 2010;116(20):4086-94.

152. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. Leukemia. 2013;27(1):82-91.

153. Boultwood J, Perry J, Pellagatti A, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2010;24(5):1062-5.

154. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, et al. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Haematologica. 2015;100(3):324-30.

155. Fisher CL, Berger J, Randazzo F, et al A human homolog of Additional sex combs, ADDITIONAL SEX COMBS-LIKE 1, maps to chromosome 20q11. Gene. 2003;306:115-26.

156. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. Cancer Cell. 2012;22(2):180-93.

157. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Haematologica. 2012;97(3):388-92.

158. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. Blood. 2011;118(26):6920-9.

159. Della Porta MG, Galli A, Bacigalupo A, et al. Clinical Effects of Driver Somatic Mutations on the Outcomes of Patients With Myelodysplastic Syndromes Treated With Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. J Clin Oncol. 2016;34(30):3627-37.

160. Frick M, Chan W, Arends CM, et al. Role of Donor Clonal Hematopoiesis in Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. J Clin Oncol. 2019;37(5):375-85.

161. Liu Z, Liu H, Shi M, et al. Donor HSCs with a preexisting ASXL1-mutation led to the development of FLT3-ITD positive AML in the donor and FLT3-ITD negative AML in the recipient after unrelated transplant. Bone Marrow Transplant. 2018;53(4):499-502.

162. Zebisch A, Winter G, Kashofer K, et al. The role of germline mutation profiling in the selection of related donors for haematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2020;55(7):1502-5.

163. Kuendgen A, Muller-Thomas C, Lauseker M, et al. Efficacy of azacitidine is independent of molecular and clinical characteristics - an analysis of 128 patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and a review of the literature. Oncotarget. 2018;9(45):27882-94.

164. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. Leukemia. 2014;28(9):1774-83.

165. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. J Clin Oncol. 2010;28(22):3636-43.

166. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 2010;28(14):2348-55.

167. Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, et al. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. Blood. 2010;116(25):5486-96.

168. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. Cancer Cell. 2010;17(3):225-34.

169. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. J Natl Cancer Inst. 2010;102(13):932-41.

170. Wise DR, Ward PS, Shay JE, et al. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(49):19611-6.

171. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. Nature. 2012;483(7390):474-8.

172. Green CL, Evans CM, Zhao L, et al. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. Blood. 2011;118(2):409-12.

173. Rockova V, Abbas S, Wouters BJ, et al. Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. Blood. 2011;118(4):1069-76.

174. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. N Engl J Med. 2009;361(11):1058-66.

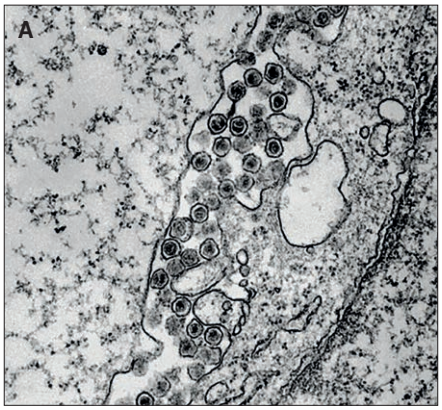
175. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Blood. 2010;116(12):2122-6.

176. DiNardo CD, Ravandi F, Agresta S, et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. Am J Hematol.

2015;90(8):732-6.
177. Chotirat S, Thongnoppakhun W, Promsuwicha O, et al. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. J Hematol Oncol. 2012;5:5.
178. Shen Y, Zhu YM, Fan X, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2011;118(20):5593-603.
179. Wagner K, Damm F, Gohring G, et al. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. J Clin Oncol. 2010;28(14):2356-64.
180. Salhotra A, Afkhami M, Yang D, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Outcomes in Patients Carrying Isocitrate Dehydrogenase Mutations. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2019;19(7):e400-e405.
181. Xu Q, Li Y, Lv N, et al. Correlation Between Isocitrate Dehydrogenase Gene Aberrations and Prognosis of Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. Clin Cancer Res. 2017;23(15):4511-22.
182. Liu X, Gong Y. Isocitrate dehydrogenase inhibitors in acute myeloid leukemia. Biomark Res. 2019;7:22.
183. Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, et al. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(23):10431-4.
184. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F, et al. RUNX1 translocations and fusion genes in malignant hemopathies. Future Oncol. 2011;7(1):77-91.
185. Osato M, Asou N, Abdalla E, et al. Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. Blood. 1999;93(6):1817-24.
186. Osato M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. Oncogene. 2004;23(24):4284-96.
187. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. Nat Genet. 1999;23(2):166-75.
188. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, et al. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. Cell. 1996;84(2):321-30.
189. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. Nat Med. 2004;10(3):299-304.
190. Cai X, Gao L, Teng L, et al. Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. Cell Stem Cell. 2015;17(2):165-77.
191. Steensma DP, Gibbons RJ, Mesa RA, et al. Somatic point mutations in RUNX1/CBFA2/AML1 are common in high-risk myelodysplastic syndrome, but not in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Eur J Haematol. 2005;74(1):47-53.
192. Harada H, Harada Y, Tanaka H, et al. Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. Blood. 2003;101(2):673-80.
193. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. Leukemia. 2016;30(11):2160-8.
194. Mangan JK, Speck NA. RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. Crit Rev Oncog. 2011;16(1-2):77-91.
195. Quentin S, Cuccuini W, Ceccaldi R, et al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. Blood. 2011;117(15):e161-170.
196. Malinge S, Izraeli S, Crispino JD. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. Blood. 2009;113(12):2619-28.
197. West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. Ann N Y Acad Sci. 2014;1310:111-8.
198. Tang JL, Hou HA, Chen CY, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. Blood. 2009;114(26):5352-61.
199. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. J Clin Oncol. 2012;30(25):3109-18.
200. Qin T, Wu S, Zhao H, et al. Molecular predictors of post-transplant survival in acute myeloid leukemia. Blood Cancer J. 2017;7(12):641.
201. Waidhauser J, Labopin M, Esteve J, et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation for AML Patients with RUNX1 Mutation in First Complete Remission: A Study on Behalf of the ALWP of the EBMT. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2020;26(3_Supplement): S8-S9.
202. Theis F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Clinical impact of GATA2 mutations in acute myeloid leukemia patients harboring CEBPA mutations: a study of the AML study group. Leukemia. 2016;30(11):2248-50.
203. Mill CP, Fiskus W, DiNardo CD, et al. RUNX1-targeted therapy for AML expressing somatic or germline mutation in RUNX1. Blood. 2019;134(1):59-73.
204. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. Blood. 1997;89(10):3636-43.
205. Greif PA, Dufour A, Konstandin NP, et al. GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. Blood. 2012;120(2):395-403.
206. Zhang SJ, Ma LY, Huang QH, et al. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(6):2076-81.
207. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. Blood. 2016;127(11):1387-97; quiz 1518.
208. Tien FM, Hou HA, Tsai CH, et al. GATA2 zinc finger 1 mutations are associated with distinct clinico-biological features and outcomes different from GATA2 zinc finger 2 mutations in adult acute myeloid leukemia. Blood Cancer J. 2018;8(9):87.
209. Hou HA, Lin YC, Kuo YY, et al. GATA2 mutations in patients with acute myeloid leukemia-paired samples analyses show that the mutation is unstable during disease evolution. Ann Hematol. 2015;94(2):211-21.
210. Marceau-Renaut A, Guihard S, Castaigne S, et al. Classification of CEBPA mutated acute myeloid leukemia by GATA2 mutations. Am J Hematol. 2015;90(5):E93-94.
211. Leubolt G, Redondo Monte E, Greif PA. GATA2 mutations in myeloid malignancies: Two zinc fingers in many pies. IUBMB Life. 2020;72(1):151-8.
212. Hendricks-Taylor LR, Bachinski LL, Siciliano MJ, et al. The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. Genomics. 1992;14(1):12-7.
213. Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, et al. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. Mol Cell Biol. 1995;15(10):5830-45.
214. 214. Oelgeschlager M, Janknecht R, Krieg J, et al. Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb-specific transactivation and on

the cooperativity with NF-M. EMBO J. 1996;15(11):2771-80.
215. Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, et al. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. Mol Cell Biol. 1998;18(7):3915-25.
216. Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, et al. CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. Mol Cell Biol. 1996;16(3):1231-40.
217. Snaddon J, Smith ML, Neat M, et al. Mutations of CEBPA in acute myeloid leukemia FAB types M1 and M2. Genes Chromosomes Cancer. 2003;37(1):72-8.
218. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. Nat Genet. 2001;27(3):263-70.
219. Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. Nat Rev Cancer. 2004;4(5):394-400.
220. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. J Clin Oncol. 2010;28(4):570-7.
221. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). Blood. 2002;100(8):2717-23.
222. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. Blood. 2009;113(13):3088-91.
223. Tawana K, Wang J, Renneville A, et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. Blood. 2015;126(10):1214-23.
224. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, et al. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2004;351(23):2403-07.
225. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. Hum Mol Genet. 2006;15 Spec No 2:R196-201.
226. Menke AL, van der Eb AJ, Jochemsen AG. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? Int Rev Cytol. 1998;181:151-212.
227. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, et al. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. Leukemia. 2007;21(5):868-76.
228. Pritchard-Jones K, Renshaw J, King-Underwood L. The Wilms tumour (WT1) gene is mutated in a secondary leukaemia in a WAGR patient. Hum Mol Genet. 1994;3(9):1633-7.
229. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. Hum Mutat. 1997;9(3):209-25.
230. Little SE, Hanks SP, King-Underwood L, et al. Frequency and heritability of WT1 mutations in nonsyndromic Wilms' tumor patients: a UK Children's Cancer Study Group Study. J Clin Oncol. 2004;22(20):4140-6.
231. King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K. Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. Blood. 1996;87(6):2171-9.
232. King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. Blood. 1998;91(8):2961-8.
233. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. Blood. 2009;113(19):4505-11.
234. Krauth MT, Alpermann T, Bacher U, et al. WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. Leukemia. 2015;29(3):660-7.
235. Tien FM, Hou HA, Tang JL, et al. Concomitant WT1 mutations predict poor prognosis in acute myeloid leukemia patients with double mutant CEBPA. Haematologica. 2018;103(11):e510-e513.
236. Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. Leukemia. 1992;6(5):405-9.
237. Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, et al. Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. Leukemia. 1993;7(7):970-7.
238. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. Leukemia. 1995;9(6):1060-7.
239. Weisser M, Kern W, Rauhut S, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. Leukemia. 2005;19(8):1416-23.
240. Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, et al. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2006;24(10):1507-15.
241. Barragan E, Cervera J, Bolufer P, et al. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. Haematologica. 2004;89(8):926-33.
242. Rodrigues PC, Oliveira SN, Viana MB, et al. Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia. Pediatr Blood Cancer. 2007;49(2):133-8.
243. Guolo F, Minetto P, Clavio M, et al. Combining flow cytometry and WT1 assessment improves the prognostic value of pre-transplant minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2017;102(9):e348-e351.
244. Candoni A, De Marchi F, Zanini F, et al. Predictive value of pretransplantation molecular minimal residual disease assessment by WT1 gene expression in FLT3-positive acute myeloid leukemia. Exp Hematol. 2017;49:25-33.
245. Frairia C, Aydin S, Audisio E, et al. Post-remissional and pre-transplant role of minimal residual disease detected by WT1 in acute myeloid leukemia: A retrospective cohort study. Leuk Res. 2017;61:10-7.
246. Visconte V, Nakashima MO, Heesun JR. Mutations in Splicing Factor Genes in Myeloid Malignancies: Significance and Impact on Clinical Features. Cancers. 2019;11(12):1844.
247. Dvinge H, Kim E, Abdel-Wahab O, et al. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. Nat Rev Cancer. 2016;16(7):413-30.
248. Obeng EA, Ebert BL. Charting the "Splice" Routes to MDS. Cancer Cell. 2015;27(5):607-9.
249. Hou HA, Liu CY, Kuo YY, et al. Splicing factor mutations predict poor prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia. Oncotarget. 2016;7(8):9084-101.
250. Lee SC, Dvinge H, Kim E, et al. Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. Nat Med. 2016;22(6):672-8.
251. Seiler M, Yoshimi A, Darman R, et al. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. Nat Med. 2018;24(4):497-504.
252. Platzbecker U, Germing U, Gotze KS, et al. Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study. Lancet Oncol. 2017;18(10):1338-47.
253. Barbosa K, Li S, Adams PD, Deshpande AJ. The role of TP53 in acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities. Genes Chromosomes Cancer. 2019;58(12):875-88.
254. Amadou A, Achatz MIW, Hainaut P. Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. Curr Opin Oncol. 2018;30(1):23-9.
255. Zebisch A, Lal R, Muller M, et al. Acute myeloid leukemia with TP53 germ line mutations. Blood. 2016;128(18):2270-2.

256. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. Blood. 2015;125(9):1367-76.
257. Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, et al. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. Oncotarget. 2015;6(10):8388-96.
258. Dutta S, Pregartner G, Rucker FG, et al. Functional Classification of TP53 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. Cancers). 2020;12(3):637.
259. Terada K, Yamaguchi H, Ueki T, et al. Full-length mutation search of the TP53 gene in acute myeloid leukemia has increased significance as a prognostic factor. Ann Hematol. 2018;97(1):51-61.
260. Montalban-Bravo G, Benton CB, Wang SA, et al. More than 1 TP53 abnormality is a dominant characteristic of pure erythroid leukemia. Blood. 2017;129(18):2584-7.
261. Iacobucci I, Wen J, Meggendorfer M, et al. Genomic subtyping and therapeutic targeting of acute erythroleukemia. Nat Genet. 2019;51(4):694-704.
262. Tsai CH, Hou HA, Tang JL, et al. Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. Leukemia. 2016;30(7):1485-92.
263. Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. Blood Cancer J. 2015;5:e366.
264. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. Nat Med. 2020;26(10):1549-56.
265. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. Blood. 2012;119(9):2114-21.
266. Prochazka KT, Pregartner G, Rucker FG, et al. Clinical implications of subclonal TP53 mutations in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2019;104(3):516-23.
267. Andreeff M, Kelly KR, Yee K, et al. Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia. Clin Cancer Res. 2016;22(4):868-76.
268. DiNardo CD, Bannon SA, Routbort M, et al. Evaluation of Patients and Families With Concern for Predispositions to Hematologic Malignancies Within the Hereditary Hematologic Malignancy Clinic (HHMC). Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2016;16(7):417-428.e2.
269. Owen CJ, Toze CL, Koochin A, et al. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. Blood. 2008;112(12):4639-45.



A: Leucemia murina di Friend: particelle virali al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



B: Leucemia murina di Friend: gemmazione di una particella virale al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Leucemia acuta mieloide, diagnosi, sequenziamento di nuova generazione (NGS), mutazioni ricorrenti, terapia target

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano la Fondazione Grande Ale Onlus, THEC e l'Ematologia e il Centro Trapianti di Midollo Osseo dell'AOUPR di Parma

Indirizzi per la corrispondenza

Giovanni Roti
Università di Parma
Dipartimento di Medicina e Chirurgia
Via Gramsci 14, 43126 Parma, Italy
E-mail: giovanni.roti@unipr.it

Predisposizione genetica



Lucio Morabito, Nicla Manes, Chiara Milanesi, Erica Travaglino, Matteo Giovanni Della Porta

Cancer Center - IRCCS Humanitas Research Hospital & Humanitas University, Milano

Introduzione

Benché la maggior parte dei casi di leucemia mieloide acuta (LMA) e sindromi mielodisplastiche (SMD) siano sporadici, l'introduzione del sequenziamento di nuova generazione (NGS) nel work-up diagnostico dei pazienti ha rivelato l'esistenza di neoplasie mieloidi su base ereditaria con una frequenza maggiore di quanto si pensasse in precedenza [1]. Le stime suggeriscono che il 5-15% dei pazienti adulti e il 4-13% dei pazienti pediatrici con SMD o LMA sono portatori di mutazioni patogeniche germinali in geni associati a predisposizione allo sviluppo di neoplasie mieloidi. Nel 2017, le neoplasie mieloidi con predisposizione germinale sono state incluse come nuova entità dedicata nella revisione della classificazione dell'organizzazione mondiale della sanità (WHO) delle neoplasie mieloidi (Tabella 1), definendo l'importanza clinica di riconoscere questi pazienti [2-4]. Il riconoscimento di una specifica predisposizione germinale in un paziente con SMD o LMA è importante non solo per comprendere le basi fisiopatologiche della malattia, ma anche per le implicazioni cliniche in termini di adattamento della terapia, di selezione del donatore per una procedura di trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche e di scelta del regime di condizionamento. Per i disturbi con manifestazioni extra-ematopoietiche, una diagnosi molecolare può consentire interventi preventivi, trattamenti precoci e contribuire ad evitare l'uso di farmaci potenzialmente dannosi. Infine, il riconoscimento dei casi associati a predisposizione genetica consente di proporre una consulenza genetica e un monitoraggio dei familiari a rischio [2-4].

La classificazione WHO include 3 categorie di neoplasie mieloidi con predisposizione germinale: quelle senza un disturbo preesistente o disfunzione d'organo (associate a mutazioni dei geni *CEBPA* e *DDX41*), quelle con trombocitopenia preesistente (associate a mutazioni dei geni *RUNX1*, *ANKRD26* ed *ETV6*) e, infine, quelle con disfunzione di altri organi (associate a mutazioni *GATA2*, e neoplasie mieloidi associate a *bone marrow failure* o telomeropatie) [4].

Myeloid neoplasms with germline predisposition without a preexisting disorder or organ dysfunction
Acute myeloid leukemia with germline CCAAT/enhancer-binding protein-A mutation (*CEBPA*)
Myeloid neoplasm with germline *DDX41* mutation
Myeloid neoplasms with germline predisposition and preexisting platelet disorders
Myeloid neoplasms with germline *RUNX1* mutation
Myeloid neoplasms with germline *ANKRD26* mutation
Myeloid neoplasms with germline *ETV6* mutation
Myeloid neoplasms with germline predisposition and other organ dysfunction
Myeloid neoplasms with germline *GATA2* mutation
Myeloid neoplasms with germline predisposition with BM failure syndromes
Myeloid neoplasms with germline predisposition with telomere biology disorders
Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) associated with neurofibromatosis
Noonan syndrome, or Noonan syndrome-like disorders
Myeloid neoplasms associated with Down syndrome

***Tabella 1** - Classificazione delle neoplasie mieloidi con predisposizione genetica, secondo i criteri della classificazione WHO, 2017*

Neoplasie mieloidi con predisposizione genetica senza un disturbo preesistente o disfunzione d'organo

Associate a mutazione germinale del gene *CEBPA*

La LMA con mutazione germinale del gene *CEBPA* è stata inizialmente descritta nel 2004 in una famiglia del Regno Unito. *CEBPA* è un gene che mappa nella regione cromosomica 19q13.1 e codifica per un fattore di differenziazione dei granulociti [5]. I pazienti ereditano 1 copia di *CEBPA* mutata; questa mutazione germinale si trova tipicamente nella regione N-terminale del gene. Lo sviluppo di LMA è associato a una mutazione biallelica o doppia di *CEBPA*, ovvero questi pazienti presentano una seconda mutazione somatica acquisita nella regione C-terminale. La penetranza è vicina al 100%.

Tutte le mutazioni germinali riportate sono frameshift, mentre le mutazioni somatiche *CEBPA* corrispondono a inserzioni/delezioni *in-frame*, *frameshift* o mutazioni missenso [5-7].

I pazienti di solito sviluppano la LMA da bambini o giovani adulti (età media 25 anni), senza una fase precedente di mielodisplasia. Le caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche della LMA con *CEBPA* germinale sono simili ai casi di LMA sporadica con *CEBPA* mutata. Non ci sono caratteristiche morfologiche distintive [6,7].

I test standard per nuovi casi di LMA attualmente includono la valutazione del gene *CEBPA*. Le mutazioni *CEBPA* possono essere rilevate mediante amplificazione PCR, analisi dei frammenti e sequenziamento mirato del DNA. Circa il 10% dei casi di LMA con mutazioni bialleliche di *CEBPA* coinvolge una mutazione germinale e una mutazione somatica [5].

Una delle caratteristiche peculiari di questa entità è che le mutazioni somatiche del *CEBPA* appaiono instabili durante il decorso della malattia, con nuovi cloni indipendenti frequentemente identificati alla recidiva. Nonostante questa instabilità clonale, i pazienti sembrano avere una prognosi non peggiore dei casi sporadici di LMA *CEBPA*-mutata, con una sopravvivenza globale del 67% a 10 anni [5-7].

Associate a con mutazione germinale del gene *DDX41*

Le neoplasie mieloidi con mutazione germinale *DDX41* sono SMD/LMA autosomiche dominanti, e sono state descritte inizialmente nel 2015 [7]. Le neoplasie mieloidi insorgono a causa di mutazioni ereditarie nel gene *DDX41* (gene DEAD/*H-box helicase*), che mappa sul cromosoma 5q35.3. Il gene codifica per una proteina RNA elicasi con funzione di regolazione dello *splicing* dell'RNA. Come descritto per i pazienti con LMA con mutazioni germinali *CEBPA*, molti soggetti hanno mutazioni bialleliche. Mutazioni del gene *DDX41* si trovano in circa l'1-2% dei pazienti con neoplasie mieloidi e circa il 50% di questi pazienti ha mutazioni germinali [7-9].

La presentazione clinica è simile alla malattia de novo, con un'età media riportata di 62 anni. Le neoplasie mieloidi descritte finora includono principalmente casi di LMA e SMD, ma sono stati segnalati anche casi di leucemia mieloide cronica (LMC), leucemia mielomonocitica cronica (LMMC) e rare neoplasie linfoidi e plasmacellulari. Tre famiglie con mutazione germinale *DDX41* avevano anche una predisposizione a disturbi immunitari, come lupus, eczema o vasculite. La penetranza non è stata ben definita. La prognosi di queste neoplasie è ancora incerta [10,11].

Neoplasie mieloidi con predisposizione genetica con trombocitopenia preesistente

Associate a mutazioni germinali del gene *RUNX1*

Le neoplasie mieloidi con mutazioni germinali del gene *RUNX1* sono anche conosciute come disturbo piastrinico familiare con predisposizione allo sviluppo di LMA, inizialmente descritte nel 1999. Ha una trasmissione autosomica dominante. Finora sono state descritte circa 70 famiglie. *RUNX1* è un fattore di trascrizione che svolge un ruolo chiave nella maturazione, differenziazione, ploidizzazione e formazione delle piastrine dai megacariociti [12,13].

La presentazione clinica delle neoplasie mieloidi con mutazioni germinali *RUNX1* è molto variabile, anche all'interno della stessa famiglia. I pazienti presentano tipicamente trombocitopenia da lieve a moderata. La morfologia piastrinica è normale, ma con una grave diminuzione dell'aggregazione piastrinica. Famiglie distinte hanno rischi variabili di sviluppare neoplasie mieloidi (range 11-100%). L'età alla diagnosi di trombocitopenia varia da 2 a 67 anni. L'età mediana di insorgenza di SMD/LMA è di 39 anni [12-15].

Le mutazioni di *RUNX1* sono distribuite in tutto il gene. Sono state identificate numerose mutazioni e, spesso, ogni mutazione è unica per una data famiglia. Le anomalie genetiche descritte fino ad oggi comprendono le delezioni complete del gene *RUNX1*, delle mutazioni del sito di giunzione, mutazioni missenso, *nonsense* e *frameshift*. L'acquisizione di una mutazione nel secondo allele *RUNX1* sembra essere un secondo evento comune, ma non è necessaria per lo sviluppo di neoplasia mieloide [14,15].

Alla presentazione iniziale, la trombocitopenia è tipicamente moderata (> 50×10^9/L). SMD e LMA sono le neoplasie ematologiche più comuni in queste famiglie. Altre neoplasie che sono state descritte includono LMMC, leucemia/linfoma linfoblastico a cellule T e, raramente, neoplasie a cellule B inclusa la leucemia a cellule capellute. Al momento della progressione della malattia i pazienti sviluppavano tipicamente citopenie aggiuntive, displasia in ≥2 linee e/o anomalie clonali acquisite [12-15].

I test molecolari diagnostici possono essere impegnativi a causa della varietà di anomalie molecolari descritte all'interno del gene *RUNX1*. I test standard includono il sequenziamento di Sanger e NGS. La prognosi dei pazienti con neoplasie mieloidi con mutazioni germinali *RUNX1* è attualmente incerta [12].

Associate a mutazione germinale del gene *ANKRD26*

Le neoplasie mieloidi con mutazioni *ANKRD26* sono state inizialmente descritte nel 2011 come trombocitopenia congenita familiare con mutazione *ANKRD26*. È una delle forme più comuni di trombocitopenia congenita, con circa 45 famiglie identificate. La trasmissione è autosomica dominante. Le mutazioni germinali

coinvolgono il gene *ANKRD26*, che mappa sulla banda cromosomica 10p12.1, e portano ad un aumento della trascrizione genica e della trasmissione del segnale attraverso la via di MPL, risultando in una ridotta formazione delle *proplatelet* da parte dei megacariociti. Questi pazienti hanno un volume piastrinico normale, una trombocitopenia moderata e una tendenza al sanguinamento assente o lieve. L'età alla diagnosi di trombocitopenia è molto variabile (range 1-84 anni; media 38 anni). L'età media dei pazienti con neoplasie mieloidi non è ben stabilita [16-18].
Le neoplasie mieloidi in questi pazienti includono prevalentemente SMD e LMA. Sono stati descritti anche rari casi di LMMC o leucemia linfocitica cronica. Tutti i casi erano caratterizzati da prominente atipia megacariocitica con un aumento del numero di piccoli megacariociti ipolobati. Finora sono state identificate 12 varianti di mutazioni del gene *ANKRD26*, la maggior parte delle quali sono mutazioni missenso. La prognosi è incerta [16-18].

Associate a mutazioni germinali del gene *ETV6*

Nel 2015, quattro pubblicazioni hanno identificato 7 famiglie con mutazioni germinali in *ETV6*. Tutti i pazienti avevano trombocitopenia e neoplasie ematologiche. La trasmissione è autosomica dominante. Le mutazioni missenso identificate fino ad oggi hanno un effetto negativo dominante, che si traduce in una localizzazione nucleare interrotta del fattore di trascrizione ETV6 e nella conseguente ridotta espressione dei geni associati alla differenziazione piastrinica. Studi *in vitro* hanno rivelato che la maturazione dei megacariociti dei pazienti era difettosa e che i pazienti avevano una ridotta formazione delle piastrine. I pazienti affetti hanno una trombocitopenia variabile con piastrine di dimensioni normali e una tendenza al sanguinamento da lieve a moderata [19,20].
Le neoplasie ematologiche segnalate nelle famiglie con mutazioni germinali dell'*ETV* includono prevalentemente leucemia/linfoma linfoblastico B (di solito nei bambini), ma anche casi di SMD e LMA, leucemia acuta a fenotipo misto, mieloma plasmacellulare e policitemia vera. Esiste anche una predisposizione familiare per i tumori solidi inclusi i tumori del colon-retto, della mammella, dei reni e della pelle e il meningioma. Il gene *ETV6* fa parte dei pannelli NGS mirati di *routine*. Il test diagnostico può essere eseguito anche mediante sequenziamento di Sanger. La prognosi è incerta [19,20].

Neoplasie mieloidi con predisposizione genetica con disfunzione di altri organi

Associate a mutazioni germinali del gene *GATA2*

Le mutazioni germinali del gene *GATA2* sono state originariamente identificate nel 2011 come 4 sindromi separate: 1) Sindrome MonoMAC, caratterizzata da monocitopenia e infezione da micobatteri non tubercolari; 2) Carenza di cellule dendritiche, monociti, B e cellule linfoidi NK con vulnerabilità alle infezioni virali; 3) SMD/LMA familiare; 4) Sindrome di Emberger, caratterizzata da linfedema primitivo, verruche e predisposizione a SMD/LMA [21-23].
Mutazioni *GATA2* sono state riscontrate anche in una minoranza di casi di neutropenia cronica e anemia aplastica. A causa di spiccate caratteristiche di sovrapposizione presenti in questi disordini, è stata successivamente riconosciuta come una singola malattia genetica con manifestazioni proteiformi [24-26].
GATA2 è un fattore di trascrizione che regola l'emopoiesi, i processi di immunità e infiammazione. I topi *knockout GATA2* muoiono in utero a causa della mancanza di emopoiesi. Le mutazioni germline di *GATA2* provocano la perdita di funzione dell'allele mutato, con conseguente aploinsufficienza. Questo a sua volta, provoca una perdita di cellule staminali ematopoietiche e porta a esaurimento delle cellule dendritiche, monociti, cellule B e NK. Almeno 44 mutazioni distinte sono state identificate nelle regioni codificanti e non codificanti. Queste mutazioni sono classificate come missenso, nulle e regolatorie [26-29].
La presentazione clinica è molto eterogenea. Nel più grande studio fino ad oggi, su 57 pazienti, l'età media alla presentazione era di 20 anni. Le presentazioni iniziali più comuni erano infezione (64%), SMD/LMA (21%) e linfedema (9%). Tra i pazienti con neoplasia ematologica, la maggior parte è stata diagnosticata con SMD, ma un sottogruppo presentava LMA o leucemia mielomonocitica cronica. Una SMD/LMA si sviluppa in circa il 70% degli individui affetti in media all'età di 29 anni. Molti pazienti che hanno sviluppato SMD/LMA aveva una mutazione concomitante di *ASXL1*, che è probabilmente un evento collaborativo nello sviluppo di neoplasia mieloide [24-27].
Le caratteristiche midollari dei pazienti con mutazioni germinali *GATA2* sono state relativamente ben descritte. Tipicamente, l'esame midollare mostra ipocellularità e displasia multilineare. La dismegacariopoiesi è la caratteristica prominente ed è osservata nell'82% dei casi. Molti casi hanno un aumento della fibrosi midollare. Negli adulti, la maggior parte dei casi viene diagnosticata con SMD a basso rischio.
I bambini presentano tipicamente citopenia refrattaria o SMD ad alto grado. L'analisi in citometria a flusso mostra maturazione granulocitica anormale, monocitopenia, numero ridotto di cellule NK e cellule B, ematogoni quasi assenti, frequenti anomalie plasmacellulari, ed espansione di grandi linfociti granulari T.
L'analisi citogenetica è anormale in circa il 60% di SMD/LMA associate a mutazioni germinali *GATA2*. La monosomia 7 è l'anomalia più frequente, fino al 70% dei casi di SMD negli adolescenti. Il sequenziamento di tutto il gene è raccomandato per la diagnosi molecolare delle mutazioni *GATA2*.
La prognosi nelle SMD/LMA sembra simile ai casi sporadici. Sono stati riportati risultati migliori con il trapianto di cellule staminali emopoietiche [25-29].

Associate a mutazioni germinali di *SAMD9/SAMD9L*

I primi studi che hanno decritto una associazione tra anemia refrattaria, monosomia 7 e LMA sono stati descritti da E.J. Freireich negli anni '60. Successivi studi sulla regione ricorrentemente mutata 7q22 hanno portato alla scoperta di una regione contenente i geni *SAMD9* e *SAMD9L* [30-32].

Mutazioni con perdita di funzione della linea germinale omozigote in *SAMD9L* sono associati a calcinosi tumorale normofosfatemica familiare, mentre mutazioni missenso eterozigoti nei geni *SAMD9* o *SAMD9L* sono associati a citopenie e un alto rischio di sviluppare SMD con monosomia 7/del7q. I pazienti si presentano frequentemente con insufficienza midollare e un alto rischio di sviluppare MFS con monosomia 7 in giovane età. Possono presentarsi pazienti con SMD o LMA associata a mutazioni germinali di *SAMD9* e *SAMD9L* anche senza caratteristiche sindromiche.
Le funzioni molecolari di questi geni rimangono poco conosciute; entrambi i geni esercitano effetti negativi sulla proliferazione cellulare [31-33].

Anemia di Fanconi

Un secolo fa, il pediatra svizzero Guido Fanconi descriveva una famiglia con 3 figli con varie anomalie fisiche e anemia perniciosa. Ora noto come anemia di Fanconi (FA), questo disturbo è caratterizzato da instabilità genomica, ipersensibilità agli agenti che inducono DNA cross-linking, e predisposizione a *bone marrow failure*, così come allo sviluppo di neoplasie ematologiche e tumori solidi. Le anomalie congenite associate in modo variabile alla FA sono numerose, e tuttavia un sottogruppo significativo (25-30%) di pazienti manca di anomalie fisiche caratteristiche. Le anomalie ematologiche sono variabili e includono citopenie, macrocitosi dei globuli rossi, midollo ipocellulare con lieve displasia e insufficienza midollare con rischio aumentato di sviluppo di SMD o LMA. L'incidenza cumulativa di SMD è del 40% all'età di 50 anni e quella di LMA è del 20% all'età di 40 anni [33-36].
Questa sindrome è causata da mutazioni germinali in uno qualsiasi di almeno 23 geni associati a FA (FANCAFANCW) che regolano i meccanismi di riparazione del DNA. Le cellule nei pazienti con FA manifestano un aumento della rottura cromosomica dopo esposizione a mitomicina C o diepossibutano [36-38].
Di particolare rilevanza clinica nei pazienti con FA è la necessità di usare condizionamenti ad intensità ridotta nelle procedure trapiantologiche a causa della maggiore tossicità di in questi regimi di condizionamento a base di radioterapia ed agenti alchilanti. Questi pazienti hanno una maggiore morbilità post-trapianto e hanno un rischio più elevato di sviluppare tumori solidi dopo trapianto [35-38].

Anemia di Diamond-Blackfan

L'anemia di Diamond-Blackfan (DBA) è stata descritta per la prima volta da Diamond e Blackfan negli anni '30 come anemia ipoplastica congenita. Circa la metà dei pazienti con DBA mostra anomalie fisiche. La maggior parte dei casi DBA sono associati a livelli aumentati di attività dell'adenosina deaminasi eritrocitaria. I pazienti si presentano tipicamente nell'infanzia con anemia macrocitica e bassi livelli di reticolociti. L'istopatologia del midollo osseo mostra tipicamente aplasia dei globuli rossi in un contesto di midollo normocellulare. Le principali cause di morbilità e mortalità sono correlate a effetti avversi del trattamento e rischi a lungo termine per neoplasie, incluse SMD e tumori solidi. In uno studio del registro DBA americano, il 2% dei pazienti con DBA ha sviluppato LMA entro i 45 anni di età. La DBA è più frequentemente causata da mutazioni autosomiche dominanti, con conseguente aploinsufficienza dei geni che codificano per proteine ribosomiali, più comunemente *RPS19*. Circa il 50% delle mutazioni geniche ribosomiali insorgono *de novo*. I meccanismi della malattia includono aumento dell'apoptosi indotta da iperespressione di p53 a causa dello stress ribosomiale, con conseguente ritardo di maturazione differenziazione eritropoietica [39-41].

Discheratosi congenita/telomeropatie

La Discheratosi congenita (DC) e le telomeropatie comprendono disturbi geneticamente eterogenei correlati a alterazione nella biologia dei telomeri. I telomeri sono proteine specializzate: complessi di DNA che proteggono i cromosomi e contrastano l'instabilità genomica. I telomeri si accorciano fisiologicamente durante i cicli progressivi di replicazione del DNA. Il raggiungimento di una riduzione critica della lunghezza dei telomeri innesca la senescenza e la morte cellulare. Queste alterazioni germinali possono indurre un fenotipo clinico ampio e variabile, ma i pazienti spesso si presentano senza una sindrome manifesta. I pazienti sono frequentemente a rischio di problemi ematologici tra cui insufficienza midollare, SMD e LMA. Il rischio di SMD nei pazienti con DC è di circa il 3-5% a 29 anni di età [42-46].
Lo *screening* per la diagnosi di telomeropatie implica la valutazione della lunghezza dei telomeri nei linfociti, che sono in genere significativamente ridotte. La sensibilità di questo test può essere inferiore negli adulti a causa della ridotta lunghezza dei telomeri con l'aumentare dell'età. Le DC/telomeropatie sono associate a molte complicanze extraematologiche, in particolare fibrosi polmonare, anomalie epatiche e anomalie vascolari. I pazienti sono sensibili alla tossicità dovuta alla chemioterapia e alle radiazioni e devono essere considerati regimi di condizionamento *ad hoc* per il trapianto [43-45].
Le DC/telomeropatie sono causate da mutazioni in almeno 13 geni coinvolti nel mantenimento dei telomeri con modelli di ereditarietà variabile (*DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOLA3/NOP10*, *NOLA2/NHP2*, *TINF2*, *WRAP53/TCAB1*, *CTC1*, *RTEL1*, *ACD/TPP1*, *PARN*, *NAF1*, *STN1*) Il test genetico è utile dal punto di vista diagnostico [47-49].

Sindrome di Shwachman Diamond

La sindrome di Shwachman Diamond (SDS) è caratterizzata da disfunzione pancreatica esocrina, ossea e insufficienza midollare, assieme ad altre alterazioni costitutive tipiche. Tuttavia, queste caratteristiche non sono presenti in tutti i pazienti, e i pazienti possono presentare una SMD come primo riscontro di malattia. L'anomalia ematologica più comune è la neutropenia, che può essere lieve o grave e può essere transitoria o persistente. Ulteriori complicazioni ematologiche includono l'insufficienza midollare, SMD e LMA. In una coorte francese di 102 pazienti con SDS, l'incidenza cumulativa di SMD/LMA era 18% a 20 anni e 36% a

30 anni. Il midollo osseo è tipicamente ipocellulare per l'età, con lievi caratteristiche disgranulopoietiche [50-52].
La SDS è più comunemente causata da mutazioni autosomiche recessive nell'omonimo gene *SBDS*, portando a bassi livelli di proteina SDS. SDS è coinvolta nella regolazione e unione delle subunità ribosomiali 60S e 40S e svolge anche un ruolo nella stabilizzazione del fuso mitotico. I dati del registro SDS americano mostrano un ampio spettro di mutazioni *SBDS* tra cui mutazioni missenso, al sito di giunzione, frameshift e delezioni di geni parziali o totali [51-53].

Approccio clinico

I test genetici diagnostici per varianti germinali in pazienti con SMD o LMA devono essere eseguiti dal genetista clinico/medico nell'ambito di una consulenza genetica, che idealmente dovrebbe essere eseguita congiuntamente con personale specializzato in ematologia. Il percorso corretto dovrebbe prevedere una consulenza genetica prime dell'effettuazione del test allo scopo di chiarire l'indicazione clinica, la natura del test e i possibili scenari rispetto agli esiti dello screening genetico (Tabella 2). Una volta in possesso dell'esito del test dovrebbe essere fissata una seconda consulenza genetica per la discussione dei risultati e delle implicazioni cliniche eventuali [54].

Criteri di selezione dei pazienti

I fattori da considerare nella scelta dei pazienti da sottoporre al test genetico sono:

- Età
- Storia familiare
- Anamnesi personale
- Esame clinico/obiettivo
- Risultati dello *screening* molecolare della malattia ematologica
- Raccomandazioni pubblicate in letteratura

Il test genetico è la base dell'approccio diagnostico (Tabella 3). La maggior parte dei geni coinvolti (*CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2* ed *ETV6*) sono anche mutazioni *driver* somatiche (acquisite) ben note nelle neoplasie mieloidi, e quindi la presenza di queste mutazioni in un paziente con nuova diagnosi di SMD/LMA è di per sé insufficiente per suggerire la presenza di una neoplasia mieloide con predisposizione germinale. È fondamentale confermare la presenza di mutazioni germinali utilizzando un tessuto di controllo. A questo scopo possono essere utilizzati diversi tipi di campioni: la coltura di fibroblasti cutanei è considerata il *gold standard* per ottenere DNA germinale.
Anche i capelli e le unghie possono fornire materiale adeguato, ma sono usati raramente. I tamponi di saliva e mucosa buccale sono usati frequentemente ma sono spesso contaminati da leucociti, quindi i risultati dovrebbero essere valutati con cautela. Un altro livello di complessità con i test genetici è il vasto numero di varianti genetiche che sono state associate a neoplasie mieloidi con predisposizione germinale. Molte famiglie hanno mutazioni uniche nei geni di interesse. Se queste mutazioni non sono state precedentemente segnalate come patogeniche in letteratura, viene comunemente utilizzata la terminologia "variante di significato

CRITERI MAGGIORI
1. Storia Familiare (3 generation pedigree), almeno una delle seguenti condizioni: - ≥2 neoplasie mieloidi diagnosticate in membri della famiglia in età <18 anni, incluso il paziente indice - Genitori o fratelli con diagnosi di neoplasia mieloide in età inferiore a 50 anni - ≥2 parenti di primo o secondo grado con diagnosi di neoplasia mieloide in età inferiore a 50 anni
2. Paziente con ≥2 neoplasie
3. Preesistente difetto piastrinico familiare (definito o sospetto), con particolare riferimento a piastrinopatie riconducibili a mutazioni nei geni *RUNX1*, *ETV6*, *ANKRD26*
4. Analisi genomica su tessuto tumorale che ha rivelato difetti che possono suggerire una predisposizione genetica (come ad esempio *DDX41* e *CEBPA*)
5. Paziente con citopenia del sangue periferico persistente e fenotipo clinico riferibile a possibili anomalie congenite: - Anomalie fenotipiche riferibili a sospetto di *bone marrow syndromes* congenite - Anomalie fenotipiche riferibili a sospetto di telomeropatie (citopenia associata a disfunzioni epatiche/polmonari) - Anomalie riferibili a sospetto di patologia da mutazione *germ-line* del gene *GATA2* (i] linfedema primario, perdita dell'udito neurosensoriale, verruche cutanee/extragenitali e basso rapporto CD4/CD8; ii] monocitopenia e carenza di cellule B/NK, associate a infezioni da micobatteri o funghi atipici, o a proteinosi alveolare polmonare) - Anomalie riferibili a sospetto di JMML, oppure a sindrome di Noonan o Noonan-like - Sindrome di Down
CRITERI MINORI
Paziente con diagnosi di sindrome mielodisplastica o leucemia acuta mieloide ed età < 50 anni

***Tabella 2** - Criteri per valutare il sospetto clinico di neoplasie mieloidi con predisposizione genetica.*

incerto". Infine, più della metà delle famiglie testate non ha mutazioni rilevate da pannelli targeted. Queste famiglie possono trarre vantaggio dal sequenziamento dell'intero esoma per la ricerca di nuove mutazioni germinali [54].

Trapianto allogenico

Tutti i pazienti eleggibili per età, che hanno sviluppato una neoplasia mieloide nel contesto di una predisposizione genetica, ad eccezione di quelle associate a varianti germinali del gene *CEBPA*, sono potenziali candidati per trapianto allogenico [54].

I pazienti con mutazioni germinali di *CEBPA* non hanno in generale una indicazione a trapianto in prima remissione clinica, perché possono sperimentare lunghe remissioni dopo la chemioterapia convenzionale. I pazienti con SMD/LMA con mutazioni germinali del gene *DDX41* sono spesso di età avanzata e non è possibile fornire specifiche raccomandazioni riguardanti il trapianto per mancanza di dati.

Nei casi di neoplasia mieloide con predisposizione germinale e preesistente disturbo piastrinico, per il momento non ci sono indicazioni al trapianto fino al momento dello sviluppo di una neoplasia mieloide manifesta clinicamente. I pazienti con neoplasia mieloide con predisposizione germinale e altra disfunzione d'organo hanno in generale un alto rischio di sviluppare SMD o LMA con esordio relativamente precoce. In alcuni individui, la presenza di immunodeficienza grave può rappresentare di per sé un'indicazione al trapianto. È fondamentale astenersi dall'utilizzare un membro della famiglia affetto o un portatore asintomatico noto come donatore per una procedura trapiantologica. Pertanto nelle famiglie con una variante patogenica della linea germinale è fortemente consigliato eseguire il test genetico in qualsiasi potenziale donatore compatibile. Nelle famiglie con una storia familiare positiva dove la mutazione genetica non è stata identificata, se possibile, dovrebbe essere preferito un donatore non familiare da registro [54].

Per quanto riguarda il regime di condizionamento, gli individui affetti da *bone marrow failure*, come l'anemia di Fanconi e le telomeropatie, mostrano una maggiore sensibilità alla chemioterapia e quindi andrebbero utilizzati specifici regimi di condizionamento a dose ridotta [54].

GATA2	GFI1	FANCR/RAD51	EFL1
RUNX1	HAX1	FANCS/BRCA1	SRP54
ANKRD26	WAS	GATA1	EPCAM
DDX41	JAGN-1	RPL5	MLH1
ETV6	CXCR4	RPL11	MSH2
CEPBA	JAG1	RPL35A	PMS2
SRP72	VPS45	RPS7	PTPN11
ALAS2	FANCA	RPS10	BRAF
TP53	FANCB	RPS17	CBL
CTC1	FANCC	RPS19	KRAS
DKC1	FANCD1/BRCA2	RPS24	MAP2K1
TERC	FANCD2	RPS26	NRAS
TERT	FANCE	RPL15	RAF1
NHP2/NOLA2	FANCF	RPL23	SOS1
NOP10/NOLA3	FANCG	RPL26	ATG2B/GSKIP
RTEL1	GANCI	RPL27	JAK2
TINF2	FANCJ/BRIP1/BACH1	RPL31	RBB6
WRAP53/TCAB1	FANCL	RPL36	THPO
ACD/TPP1	FANCN/PALB2	RPS15	MPL
NAF1	FANCP/SLX4	RPS27	SBF2
PARN	FALCQ/ERCC4	RPS27A	VHL
POT1	FANCT/UBE2T	RPS28	EPOr
STN1	FANCU/XRCC2	RPS29	FANCW/RFWD3
ELANE/ELA2	FANCV/REV7	TSR2	SAMD9
CSF3R	FANCO/RAD51C	SBDS	ATM
G6PC3	FANCM	DNAJC21	SAMD9L
NF1	BLM		

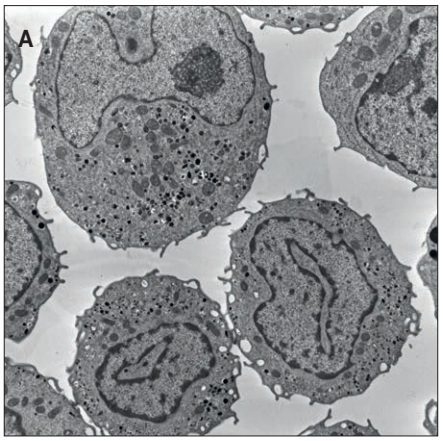
***Tabella 3** - Pannello di geni in uso presso il Centro per lo studio della predisposizione genetica alle neoplasie ematologiche di Humanitas, Milano.*

Bibliografia

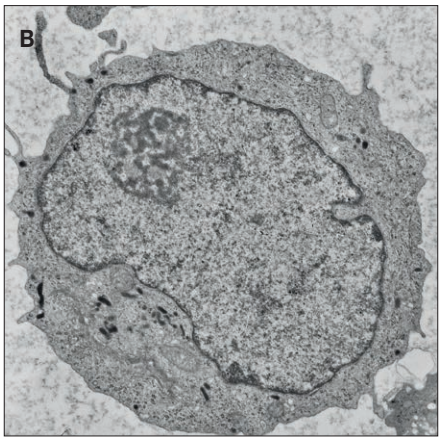
1. Czuchlewski DR, Peterson LC. Myeloid neoplasms with germline predisposition: a new provisional entity within the World Health Organization classification. Surg Pathol Clin. 2016;9(1):165-76.
2. University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. Blood. 2016;128(14):1800-13.
3. West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. Ann N Y Acad Sci. 2014;1310(1):111-8.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-2405.
5. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, et al. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2004;351(23):2403-7.
6. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, et al. Somatic CEBPA mutations are a frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2008;26(31):5088-93.
7. Tawana K, Wang J, Renneville A, et al. Disease evolution and outcomes in familial LMA with germline CEBPA mutations. Blood. 2015;126(10):1214-23.
8. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, et al. Inherited and somatic defects in

DDX41 in myeloid neoplasms. Cancer Cell. 2015;27(5):658-70.
9. Cardoso SR, Ryan G, Walne AJ, et al. Germline heterozygous DDX41 variants in a subset of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Leukemia. 2016;30(10):2083-6.
10. Lewinsohn M, Brown AL, Weinel LM, et al. Novel germline DDX41 mutations define families with a lower age of SMD/LMA onset and lymphoid malignancies. Blood. 2016;127(8):1017-23.
11. Li R, Sobreira N, Witmer PD, et al. Two novel germline DDX41 mutations in a family with inherited myelodysplasia/acute myeloid leukemia. Haematologica: 2016;101(6):e228-31.
12. Bluteau D, Glembotsky AC, Raimbault A, et al. Dysmegakaryopoiesis of FPD/LMA pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. Blood. 2012;120(13):2708-18.
13. Kirito K, Sakoe K, Shinoda D, et al. A novel RUNX1 mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. Haematologica. 2008;93(1):155-6.
14. Latger-Cannard V, Philippe C, Bouquet A, et al. Haematological spectrum and genotypephenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French Network on Inherited Platelet Disorders. Orphanet J Rare Dis. 2016;11:49.
15. Glembotsky AC, Bluteau D, Espasandin YR, et al. Mechanisms underlying platelet function defect in a pedigree with familial platelet disorder with a predisposition to acute myelogenous leukemia: potential role for candidate RUNX1 targets. J Thromb Haemost. 2014;12(5):761-72.
16. Noris P, Perrotta S, Seri M, et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. Blood. 2011;117(24):6673-80.
17. Marquez R, Hantel A, Lorenz R, et al. A new family with a germline ANKRD26 mutation and predisposition to myeloid malignancies. Leuk Lymphoma. 2014;55(12):2945-6.
18. Perez Botero J, Oliveira JL, Chen D, et al. ASXL1 mutated chronic myelomonocytic leukemia in a patient with familial thrombocytopenia secondary to germline mutation in ANKRD26. Blood Cancer J. 2015;5(5):e315.
19. Moriyama T, Metzger ML, Wu G, et al. Germline genetic variation in ETV6 and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study. Lancet Oncol. 2015;16(16):1659-66.
20. Noetzli L, Lo RW, Lee-Sherick AB, et al. Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. Nat Genet. 2015;47(5):535-8.
21. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. Blood. 2011;118(10):2653-5.
22. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. Blood. 2011;118(10):2656-8.
23. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Nat Genet. 2011;43(10):1012-7.
24. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). Nat Genet. 2011;43(10):929-31.
25. Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S, et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMAC syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. Blood. 2013;121(5):822-9.
26. Dickinson RE, Milne P, Jardine L, et al. The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. Blood. 2014;123(6):863-74.
27. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. Blood. 2014;123(6):809-21.
28. Ganapathi KA, Townsley DM, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency-associated bone marrow disorder differs from idiopathic aplastic anemia. Blood. 2015;125(1):56-70.
29. Hyde RK, Liu PP. GATA2 mutations lead to SMD and LMA. Nat Genet. 2011;43(10):926-7.
30. Narumi S, Amano N, Ishii T, et al. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. Nat Genet. 2016;48(7):792-7.
31. Buonocore F, Kuhnen P, Suntharalingham JP, et al. Somatic mutations and progressive monosomy modify SAMD9-related phenotypes in humans. J Clin Invest. 2017;127(5):1700-13.
32. Tesi B, Davidsson J, Voss M, et al. Gain-of-function SAMD9L mutations cause a syndrome of cytopenia, immunodeficiency, SMD, and neurological symptoms. Blood. 2017;129(16):2266-79.
33. Schwartz JR, Wang S, Ma J, et al. Germline SAMD9 mutation in siblings with monosomy and myelodysplastic syndrome. Leukemia. 2017;31(8):1827-30.
34. Lobitz S, Velleuer E. Guido Fanconi (1892- 1979): a jack of all trades. Nat Rev Cancer. 2006;6(11):893-8.
35. Alter BP. Fanconi anemia and the development of leukemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2014;27(3-4):214-21.
36. Bagby G. Recent advances in understanding hematopoiesis in Fanconi anemia. F1000 Res. 2018;7:105.
37. Peffault de Latour R, Soulier J. How I treat SMD and LMA in Fanconi anemia. Blood. 2016;127(24):2971-9.
38. Giampietro PF, Verlander PC, Davis JG, Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an international Fanconi Anemia Registry Study. Am J Med Genet. 1997;68(1):58-61.
39. Diamond LK, Blackfan KD. Hypoplastic anemia. Am J Dis Child. 1938;56:464-7.
40. Vlachos A, Blanc L, Lipton JM. Diamond Blackfan anemia: a model for the translational approach to understanding human disease. Expert Rev Hematol. 2014;7(3):359-72.
41. Vlachos A, Ball S, Dahl N, et al. Participants of Sixth Annual Daniella Maria Arturi International Consensus Conference. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. Br J Haematol. 2008;142(6):859-76.
42. Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. Blood. 2014;124(18):2775-83.
43. Bertuch AA. The molecular genetics of the telomere biology disorders. RNA Biol. 2016;13(8):696-706.
44. Agarwal S. Evaluation and management of hematopoietic failure in dyskeratosis congenita. Hematol Oncol Clin North Am. 2018;32(4):669-85.
45. Savage SA. Beginning at the ends: telomeres and human disease. F1000Res. 2018;7:F1000 Faculty Rev-524.
46. Alter BP, Giri N, Savage SA, et al. Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. Haematologica. 2018;103(1):30-9.
47. Alter BP, Giri N, Savage SA, et al. Cancer in dyskeratosis congenita. Blood. 2009;113(26):6549-57.
48. Alter BP, Giri N, Savage SA, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. Br J Haematol. 2010;150(2):179-88.
49. Alter BP, Baerlocher GM, Savage SA, et al. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. Blood. 2007;110(5):1439-47.
50. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, et al. Associated investigators of the

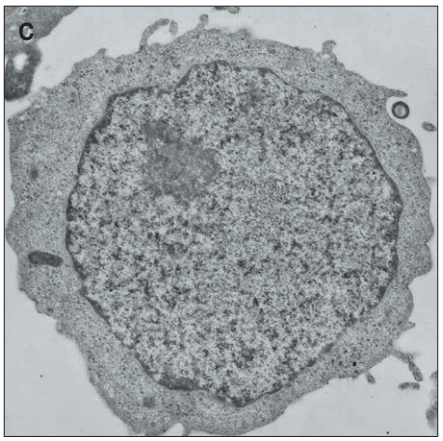
French Severe Chronic Neutropenia Registry. Classification of and risk factors for hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. Haematologica. 2012;97(9):1312-9.
51. Ip WF, Dupuis A, Ellis L, et al. Serum pancreatic enzymes define the pancreatic phenotype in patients with Shwachman-Diamond syndrome. J Pediatr. 2002;141(2):259-65.
52. Boocock GR, Morrison JA, Popovic M, et al. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. Nat Genet. 2003;33(1):97-101.
53. Finch AJ, Hilcenko C, Basse N, et al. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. Genes Dev. 2011;25(9):917-29.
54. Baliakas P, Tesi B, Wartiovaara-Kautto U, et al. Nordic Guidelines for Germline Predisposition to Myeloid Neoplasms in Adults: Recommendations for Genetic Diagnosis, Clinical Management and Follow-up. Hemasphere. 2019;3(6):e321.



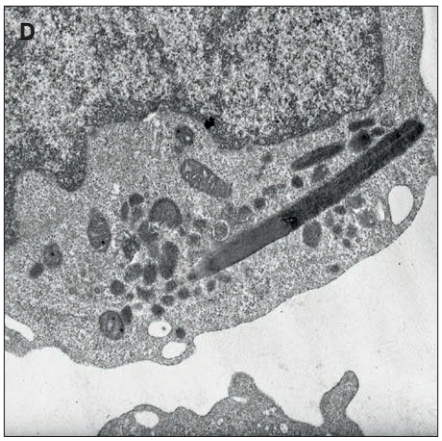
A: Leucemia Mieloide Acuta M3: blasti granulati al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



B: Leucemia Mieloide Acuta M1: blasto al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



C: Leucemia Mieloide Acuta M0: blasto indifferenziato al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



D: Leucemia Mieloide Acuta M2. blasto con corpo di Auer citoplasmatico al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Predisposizione genetica, neoplasie mieloidi, mutazioni geniche

Ringraziamenti

Si ringrazia la Fondazione Beat Leukemia di Milano (www.beat-leukemia.org) per il contributo alla realizzazione del progetto

Indirizzi per la corrispondenza

Matteo Giovanni Della Porta
Cancer Center
IRCCS Humanitas Research Hospital & Humanitas University
Via Manzoni 56, 20089 - Rozzano, Milano
E-mail: matteo.della_porta@hunimed.eu

Trapianto di cellule emopoietiche allogeniche



Anna Ghiso, Carmela Di Grazia, Riccardo Varaldo, Emanuele Angelucci

Ematologia e Centro Trapianti. IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

Introduzione

Il trapianto allogenico di cellule emopoietiche (allo-HCT) è uno dei più efficaci trattamenti post-remissione, potenzialmente curativo, per i pazienti affetti da leucemia acuta mieloide (LAM) [1]. Il ruolo dell'allo-HCT è in continua evoluzione nell'era del monitoraggio della malattia minima residua (MRD) e degli sviluppi della sua determinazione. Negli anni più recenti la stratificazione prognostica attraverso lo studio di citogenetica e di biologia molecolare alla diagnosi proposta da *European Leukemia Net* (ELN) nel 2017 [2], accoppiata alla misurazione della MRD misurabile pre-trapianto [3], ha migliorato la capacità di identificare i pazienti affetti da LAM per i quali il trapianto allogenico sia raccomandato, anche per classi di rischio apparentemente favorevoli [4]. La scelta di intraprendere un programma allo-trapiantologico si basa sempre su un'attenta analisi paziente-specifica dei rischi-benefici che derivano dalla possibilità di recidiva di malattia e dalla procedura stessa, che rimane gravata da mortalità e tossicità non trascurabili, anche se significativamente ridotte nelle ultime decadi. Attualmente nel mondo un terzo dei trapianti allogenici è effettuato come trattamento della LAM, più di ogni altra patologia [5], ma ancora è una procedura sottoutilizzata, in quanto solo circa il 30% dei pazienti adulti viene sottoposto a trapianto [6], considerando tutte le fasi della malattia.

L'utilizzo di nuove sorgenti cellulari per pazienti che non dispongono di donatori familiari HLA (*human leukocyte antigen*)-compatibili, ha reso la larga maggioranza dei pazienti dotata di un potenziale donatore. Inoltre, lo sviluppo di regimi di condizionamento a intensità ridotta, nei quali la tossicità correlata al trapianto è inferiore, permette di considerare eleggibili al trapianto allogenico pazienti di età fino a 70-75 anni con buon *performance status* [7], oppure pazienti più giovani con comorbidità. Considerando che la LAM è una patologia della popolazione adulta-anziana e che l'età >65 anni si associa a *relapse-free survival* (RFS) e a sopravvivenza globale inferiore rispetto ai pazienti più giovani anche nelle classi di LAM a rischio favorevole [8], il bacino di utenza del trapianto potrebbe allargarsi ulteriormente. Nonostante i progressi effettuati per quanto riguarda la terapia di supporto, la selezione del donatore, la profilassi della *graft versus host disease* (GvHD) e il trattamento delle complicanze, la recidiva di malattia rimane ancora la principale causa di fallimento e di mortalità post-trapianto nella LAM. Le attuali strategie terapeutiche per ridurre tale rischio sono ancora insufficienti. Sono necessari i risultati degli studi sulla terapia di mantenimento, con farmaci bersaglio-specifici nelle LAM con mutazioni geniche, e lo sviluppo di terapia immunologica o cellulare, come l'infusione di linfociti del donatore (DLI) profilattica o *pre-emptive* [9]. Rimangono oggetto di discussione diversi argomenti che illustriamo in questo testo.

Indicazioni al trapianto allogenico

Quali pazienti hanno indicazione in prima remissione?

I dati forniti dalle meta-analisi di pazienti randomizzati biologicamente in base alla disponibilità o meno di un donatore e da numerosi studi prospettici, hanno dimostrato il beneficio dell'allo-trapianto nelle classi di rischio citogenetico sfavorevole e intermedio ormai da diversi anni [10]. Attualmente la decisione di procedere ad allo-HCT in un paziente affetto da LAM in prima remissione completa (CR1) prevede un'analisi più complessa, basata sulla supposizione che il più basso rischio di recidiva di malattia sia maggiore del più elevato rischio di *non relapse mortality* (NRM) correlata al trapianto. La valutazione dei rischi e dei benefici deve essere pesata attentamente per ogni paziente e prevede non solo l'analisi delle caratteristiche biologiche della malattia, ma anche delle comorbidità del paziente, del tipo di donatore, del regime di condizionamento [11]. Sono stati sviluppati approcci *risk-adapted*: quello proposto da Cornelissen [4] presuppone un vantaggio proiettato superiore al 10% in RFS dopo allo-HCT per giustificare questo approccio terapeutico. Effettua una valutazione tra il rischio di recidiva di LAM, in considerazione della classe di rischio ELN 2017 alla diagnosi, lo stato di MRD dopo terapia di consolidamento, valutata mediante citofluorimetria o PCR quantitativa di markers molecolari specifici, e il rischio di NRM correlato al trapianto.

Pertanto i pazienti a rischio favorevole, ovvero con mutazioni dei geni del *core-biding factor*, mutazione di *NMP1* in assenza di mutazione di *FLT3 internal tandem duplication* (ITD), mutazione biallelica di *CEBPA*, che notoriamente non beneficiano dell'allo-HCT in prima remissione completa, in caso di MRD persistentemente positiva trovano indicazione, qualora venga predetta una NRM accettabile e in presenza di donatore HLA-compatibile, familiare o non apparentato. Per i pazienti a rischio intermedio allo-HCT è raccomandato sia in caso di MRD positività, anche da donatore alternativo, che in caso di MRD negatività, purché sia predetta una NRM accettabile e sia disponibile un donatore HLA-compatibile.

Nelle LAM a cariotipo normale e *FLT3-ITD* mutato, rimane controverso il ruolo dell'allo-trapianto per i pazienti che appartengono al rischio ELN favorevole, ovvero con carico allelico basso (<0,5) e concomitante mutazione di *NPM1*, e che raggiungono MDR negatività. In questi casi il trapianto può essere ritardato fino alla prima recidiva, come da raccomandazioni ELN, o effettuato in CR1 come da linee guida NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*). In generale, gli altri pazienti con FLT3-ITD devono essere avviati a trapianto in CR1 [12,13].

I pazienti a rischio sfavorevole hanno infine indicazione assoluta: in caso di MRD positività andrebbero avviati a trapianto non appena raggiunta la remissione completa ematologica, anche da donatore alternativo.

In caso di MRD negatività, persistendo l'elevato rischio di recidiva, vi è altresì indicazione al trapianto, da qualsiasi tipologia di donatore, sebbene pazienti con rischio di NRM troppo elevato possano essere avviati a un ulteriore ciclo chemioterapico o a trapianto autologo o a trattamento all'interno di trials clinici (Figura 1).

Oltre la prima remissione completa

Hanno indicazione al trapianto tutte le categorie di rischio in remissione più avanzate. Nei pazienti che hanno ottenuto la seconda remissione completa morfologica è indicato procedere ad allo-trapianto immediatamente e non vi sono evidenze che sostengano l'utilità di ulteriori cicli chemioterapici prima del trapianto, purché il donatore sia stato identificato e sia prontamente disponibile. Complessivamente la sopravvivenza a lungo termine è inferiore rispetto ai pazienti trapiantati in CR1[14]. Nelle LAM con anomalie del *core binding factor*, la RFS a 2 e 5 anni è risultata 59% e 54%, mentre la probabilità di sopravvivenza è risultata 65% e 58% rispettivamente, in un grande studio retrospettivo [15].

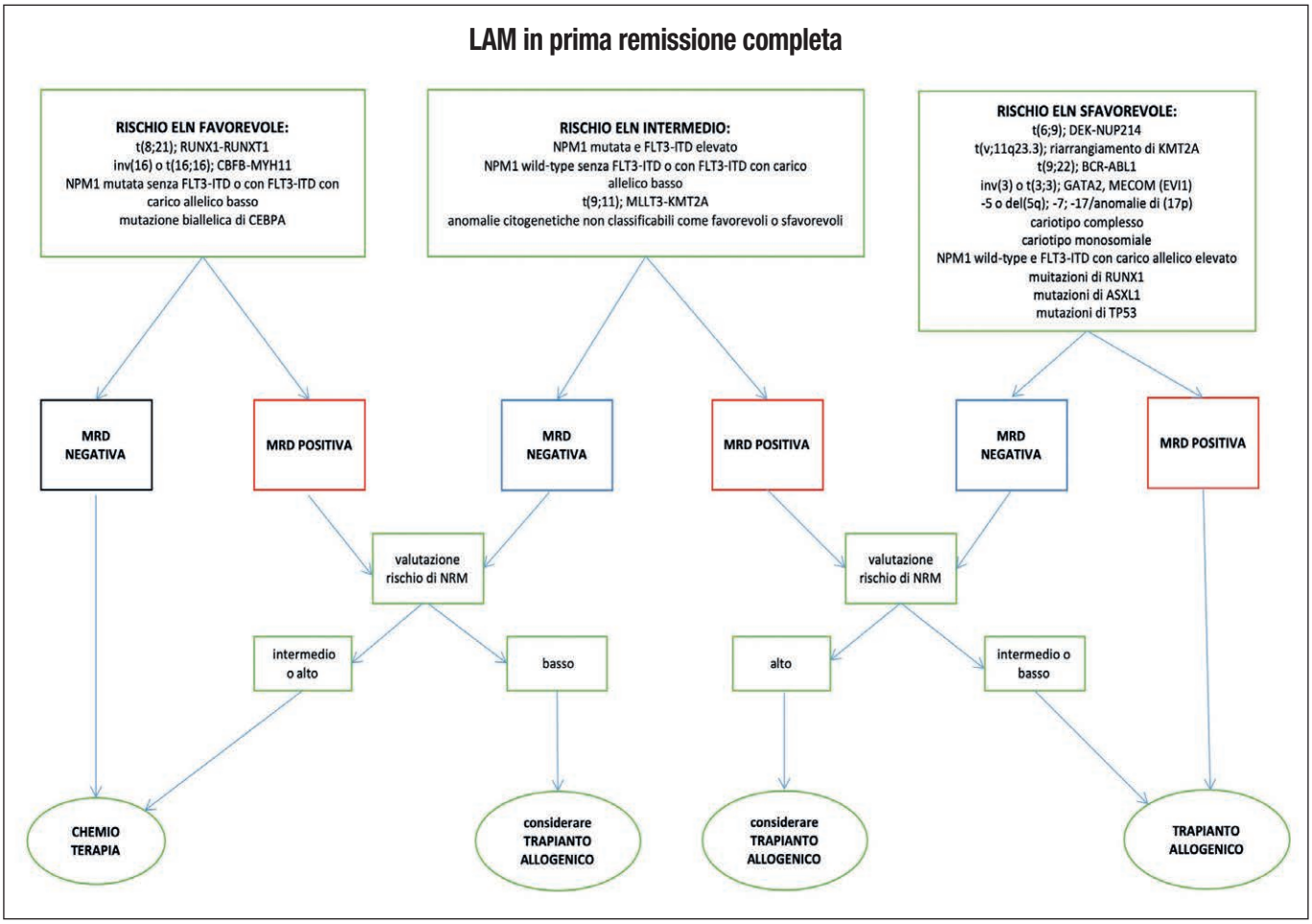


***Figura 1** - Algoritmo di indicazione ad allo-HCT nella leucemia mieloide acuta in prima remissione completa.*

In molteplici studi sono stati evidenziati fattori di rischio sfavorevoli per i pazienti trapiantati oltre la prima remissione, come l'età avanzata, il basso *performance status*, il rischio citogenetico intermedio e sfavorevole, un lungo intervallo di tempo tra la diagnosi iniziale e il trapianto, il donatore *mismatched* non familiare. Questi fattori correlano con maggiore possibilità di recidiva, ma non modificano l'indicazione al trapianto [16] se non nel rafforzare l'indicazione in prima remissione completa.
Non sono stati ancora effettuati studi randomizzati sulla tipologia di condizionamento ottimale per i pazienti in remissione oltre la prima. Da un report prodotto da *European Society of Blood and Transplantation* (EBMT) *Acute Myeloid Leukemia Working Party*, analizzando 1879 pazienti in CR2 negli anni 2007-2016, non emergono sostanziali differenze nel trapianto preceduto da condizionamento mieloablativo (MAC) rispetto a quello ad intensità ridotta (RIC). Nei pazienti di età inferiore a 50 anni, l'esito a 2 anni è equivalente tra MAC e RIC, con RSF 54% per entrambi i regimi, OS 61% *vs* 62%, NRM 18% *vs* 15%. Anche per i pazienti ≥50 anni, l'esito a 2 anni risulta sovrapponibile; la NRM è invece significativamente inferiore dopo RIC, 27% *vs* 19%, mentre la GvHD cronica risulta modestamente peggiore dopo RIC (32% *vs* 39%), anche se la forma estesa è equivalente [17].

Ruolo nella LAM refrattaria

Circa 30-40% dei pazienti affetti da LAM non ottiene la remissione completa dopo terapia di induzione (da 1 a 2 cicli) e vengono definiti refrattari. Non vi sono al momento pubblicati studi prospettici che esplorino l'allo-trapianto in questo setting di pazienti, ma rappresenta per questi ultimi l'unica alternativa ad intento curativo, con possibilità di ottenere lungo sopravviventi in una percentuale che va dall'8 al 30% [18].
È importante identificare pazienti con caratteristiche di malattia e parametri individuali che possano beneficiare maggiormente di questo programma terapeutico. In uno studio di Duval *et al.* [19] sono state identificate 5 variabili pre-trapianto che influenzano negativamente la sopravvivenza in caso di malattia refrattaria o recidivata: durata della remissione inferiore a 6 mesi, presenza di blasti circolanti, donatore non HLA-identico, Karnofsky o Lansky score < 90 e rischio citogenetico sfavorevole. La sopravvivenza globale a 3 anni è del 42% in presenza di punteggio =0 e scende fino al 6% con punteggio >3. Studi retrospettivi hanno successivamente dimostrato esito sfavorevole nei pazienti refrattari, che hanno ricevuto > 2 cicli di chemioterapia, con trapianto in fase di recidiva superiore alla prima, rischio citogenetico sfavorevole, > 25% di blasti midollari, presenza di blasti circolanti e età > 60 anni [20,21].
L'intensità del regime di condizionamento non sembra ridurre il rischio di recidiva, come dimostrato da studi di coorte retrospettivi [21,22], probabilmente perché non ha un forte impatto su una malattia chemio-refrattaria. Il condizionamento mieloablativo è gravato da NRM, che può raggiungere il 40% nei pazienti con malattia refrattaria; il condizionamento ad intensità ridotta induce meno mortalità, ma non sembra sufficiente a provocare controllo di malattia. Per quanto riguarda la scelta del donatore in questa tipologia di pazienti, è stata riportata una sopravvivenza comparabile tra allo-trapianto da donatore aploidentico rispetto a donatore non familiare HLA-compatibile o mismatched in uno studio EBMT, con RFS a 2 anni rispettivamente del 23%, 28% e 22%, ma più alta GvHD acuta e cronica nel *mismatched* [20]. I pazienti refrattari possono quindi essere avviati a trapianto, se valutati eleggibili, meglio se all'interno di percorsi di cura sperimentali.

Ruolo nelle LAM secondarie

Le LAM secondarie includono le forme che insorgono dopo chemioterapia e/o radioterapia e quelle che si sviluppano da una precedente patologia mieloide (mielodisplasia o sindrome mieloproliferativa) e costituiscono circa il 25% di tutte le LAM. Hanno una prognosi significativamente inferiore rispetto alla forma *de-novo*. L'allo-HCT rappresenta l'unica possibilità ad intento curativo: studi caso-controllo hanno dimostrato una migliore sopravvivenza nelle LAM secondarie sottoposte ad allo-HCT rispetto a quelle non avviate a trapianto [23].
In generale, i pazienti con forme secondarie hanno meno possibilità di intraprendere questo iter terapeutico, dovuto alla minore capacità di ottenere remissioni complete, alla mortalità precoce dopo terapia di induzione e alle comorbidità dovute ai precedenti trattamenti [24]. I fattori che si associano a sopravvivenza inferiore sono il rischio citogenetico sfavorevole, la presenza di malattia attiva al trapianto, l'età sopra i 35 anni e l'utilizzo di donatore non familiare [25]. Sembra esserci un vantaggio nell'utilizzo del condizionamento mieloablativo rispetto a quello ad intensità ridotta [26].
In conclusione, il trapianto allogenico è indicato nei pazienti con LAM secondaria in prima remissione completa e che siano considerati eleggibili: la sopravvivenza risulta simile a quella dei pazienti con LAM de novo sottoposti a trapianto (OS a 5 anni fino al 48% dal registro Svedese), mentre nelle forme che non raggiungono la remissione completa il beneficio del trapianto è meno chiaro [27].

Possiamo trapiantare i pazienti anziani?

La LAM è una patologia principalmente dell'età anziana, con una età mediana alla diagnosi oltre i 60 anni. L'esito inferiore dopo allo-trapianto nei pazienti anziani è dovuto alla più elevata frequenza di malattia ad alto rischio e ad aumentata NRM secondaria alla scarsa tolleranza ai regimi di condizionamento mieloablativi rispetto ai pazienti più giovani [28]. I miglioramenti nella terapia di induzione per gli anziani hanno permesso a un maggior numero di pazienti di raggiungere lo stato di remissione e di essere pertanto candidabili a terapia post-remissionale. Studi retrospettivi e osservazionali hanno dimostrato una sopravvivenza maggiore nei pazienti sottoposti ad allo-trapianto rispetto a quelli trattati con la sola chemioterapia [29]. Per i pazienti an-

ziani è necessario adattare il regime di condizionamento in base sia all'età biologica che alle comorbidità: l'utilizzo di regimi mieloablativi ma comunque meno intensivi nei pazienti fit o di condizionamenti ad intensità ridotta per i pazienti più fragili. Uno studio prospettico di fase II del *Cancer and Leukemia Group B* (CALGB) ha valutato l'outcome di pazienti di età compresa tra 60 e 74 anni, sottoposti a trapianto allogenico con RIC (fludarabina/busulfano): la sopravvivenza a due anni è stata del 42%, la RFS del 48% e la NRM del 15%, sempre a due anni [30].
Attualmente, l'età anagrafica non deve essere considerata un fattore limitante nella eleggibilità di un paziente alla procedura trapiantologica; è necessario effettuare non solo gli score prognostici trapiantologici, ma anche la valutazione geriatrica, delle comorbidità e di biomarkers che possano predire la NRM in maniera più appropriata. Nella pratica clinica l'intento consiste nell'identificare, tra i pazienti anziani, quelli nei quali le varie tossicità del trapianto rappresentino un rischio accettabile.

Valutazione trapiantologica

Ogni Centro Trapianti dispone di un prestabilito piano di lavoro per la valutazione dell'indicazione e dell'idoneità di un paziente al programma trapiantologico. L'utilizzo di procedure standardizzate riduce il rischio di errori o di omissioni. Il punto di partenza è costituto dalla tipizzazione HLA del paziente e dei familiari, che nella LAM deve essere eseguito all'esordio della malattia per tutti i pazienti suscettibili di trattamento di induzione. La valutazione allo-trapiantologica del paziente affetto da LAM deve essere effettuata *upfront*, non appena siano disponibili le indagini citogenetiche e di biologia molecolare. Il programma trapiantologico necessita di varie fasi, con disponibilità di tempo limitata e se possibile il trapianto deve essere pianificato nel percorso terapeutico e non rincorso come terapia di salvataggio. L'indicazione al trapianto dipende dalle caratteristiche della malattia e da fattori correlati al paziente (età, patologie concomitanti, volontà). La prima visita consiste nell'effettuare l'anamnesi patologica personale e familiare, esame obiettivo, valutazione del *performance status* e delle comorbidità note. Successivamente, per la valutazione dell'idoneità, il ricevente viene sottoposto ad esami ematochimici, sierologici, virologici, volti ad accertare ulteriori comorbidità; tali indagini laboratoristiche sono affiancate da esami strumentali, e da eventuali consulenze specialistiche qualora indicate. Nel contempo va iniziata la ricerca del potenziale donatore. Una volta identificato il donatore e accertata la sua idoneità, vengono programmate ulteriori sedute informative con lo scopo di fornire informazioni al ricevente su tipologia di trapianto, potenziali benefici forniti dalla procedura proposta, rischi a breve e lungo termine, possibili alternative terapeutiche; vengono inoltre illustrati e ottenuti i consensi informati inerenti la procedura trapiantologica [31]. Tale percorso deve essere effettuato contestualmente all'iter terapeutico che il paziente con LAM deve necessariamente completare in determinate tempistiche (ciclo di induzione e consolidamento).

Rischio correlato al trapianto

Le determinanti critiche della NRM dopo allo-HCT nei pazienti con LAM sono fattori correlati al paziente e altri alla procedura trapiantologica, ovvero il grado di compatibilità HLA tra donatore e ricevente e l'intensità del regime di condizionamento [32].
Sono sostanzialmente due gli score prognostici di rischio più validati nel tempo e più ampiamente utilizzati:
- l'EBMT *risk score* [33] è uno score predittivo, sviluppato per la leucemia mieloide cronica e successivamente validato per altre patologie, inclusa la LAM; si basa su caratteristiche sia del paziente (età, stato di malattia al trapianto) che del trapianto stesso (intervallo diagnosi-trapianto, tipologia di donatore, sesso di donatore e ricevente); permette di determinare popolazioni di pazienti, in base al punteggio ottenuto, per i quali la probabilità di NRM a 5 anni va dal 14% al 41%;
- *Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index* (HCT-CI) [34] origina dal *Charlson Comorbidity Index* e consiste nell'analisi di 17 comorbidità: la somma dei punteggi di ognuna costituisce uno score cumulativo, a cui è stato successivamente aggiunto il parametro dell'età (< o > 40 anni) [35]. HCT-CI score di 0,1-2 e > 3 predice un'incidenza di NRM del 14%, 21% e 41% rispettivamente, e un tasso di sopravvivenza del 71%, 60% and 34%, rispettivamente.
- di rilevante interesse è anche il *Disease Risk Index* (DRI), indice prognostico basato unicamente sulle caratteristiche della malattia e sullo stato di malattia al trapianto: classifica 4 gruppi prognostici che correlano con OS, PFS, incidenza cumulativa di recidiva e NRM [36].

Questi score prognostici hanno una accuratezza predittiva ancora subottimale per il singolo paziente, ma sono funzionali nell'elaborazione di grandi dati e all'interno di studi clinici. Inoltre sono meno riproducibili nel setting del trapianto a ridotta intensità e non stratificano il rischio per le diverse fasce dell'età adulta-anziana, considerando un unico fattore prognostico l'età oltre i 40 anni. Sono stati pertanto sviluppati due modelli di score dall'EBMT *Acute Leukemia Working Party*. Il primo è un algoritmo basato su 10 variabili: età, Karnofsky, diagnosi (leucemie acute mieloidi o linfoblastiche), stato di malattia (prima o seconda remissione o altri stati), intervallo diagnosi-trapianto, sierologia per citomegalovirus (CMV) di donatore-ricevente, tipo di donatore (HLA-compatibile familiare o non familiare) e di condizionamento (mieloablativo, ad intensità ridotta), il numero annuale di trapianti effettuati presso il centro [37]. Lo score ottenuto predice la NRM a 100 giorni e a 2 anni, RFS e la sopravvivenza globale a 2 anni. Il secondo score è un'integrazione dell'EBMT *risk score* e del HCT-CI attraverso la rivalutazione dei parametri individuali in riceventi con LAM in CR1 sottoposti a trapianto con condizionamento ad intensità ridotta; sono identificati 3 gruppi con aumentato potere predittivo sulla NRM a 5 anni, che va da 24% in presenza di score 0-3, fino al 57% con score > 7 [38].

Scelta del donatore

Quando viene posta indicazione alla procedura allo-trapiantologica, l'approccio standard consiste nella ricerca di un donatore HLA compatibile. Per stabilire la compatibilità HLA, è effettuata la tipizzazione in alta risoluzione di donatore e ricevente per i loci A, B, C, DRB1 e DQB1 dell'HLA (10 alleli); per ogni mismatched si associa un aumentato rischio di GvHD acuta e cronica, di NRM e di mortalità globale. Vi sono inoltre crescenti evidenze sulla rilevanza di un ulteriore locus, DPB1, il cui mismatched tra donatore non familiare e ricevente si associa ad aumentato rischio di GvHD acuta [39]. La prima scelta consiste nel donatore HLA-compatibile familiare: tutti gli studi retrospettivi e prospettici hanno dimostrato la superiorità rispetto a qualsiasi altro donatore in termini di sviluppo di complicanze, in particolare GvHD, e di sopravvivenza globale. Attualmente però meno del 30% dei pazienti trova un donatore HLA-compatibile all'interno della propria famiglia. La seconda scelta consiste nella ricerca di un donatore alternativo, HLA-compatibile non familiare, attraverso l'utilizzo dei registri nazionali e internazionali (circa 30 milioni di persone sono registrate nel mondo), che consente di trovare un donatore da un estremo del 16% (America Centrale) al 75% dei casi (Europa) in base all'etnia [40].

Va sottolineato che la ricerca di un donatore da registro deve essere avviata non appena sia noto che il paziente non dispone di donatore HLA-compatibile all'interno del nucleo familiare. È stato dimostrato in numerosi studi clinici un esito sovrapponibile nei trapianti da donatore da registro HLA-compatibile rispetto a quelli da donatore familiare [41] per i pazienti affetti da LAM in prima remissione con rischio citogenetico sfavorevole; si rilevava tuttavia un'aumentata incidenza cumulativa di GvHD acuta grado 2-4 nei trapianti da donatori non consanguinei (38% *vs* 54%).

Qualora non fosse disponibile o non risultasse idoneo alla donazione un donatore HLA-compatibile (familiare o non) vengono considerati altri donatori alternativi: donatore non apparentato HLA-mismatched, donatore familiare aploidentico o sangue cordonale (Figura 2). L'utilizzo di un donatore non familiare HLA-mismatched correla con sopravvivenza globale diminuita, con incrementata NRM e con più elevata insorgenza di GvHD acuta severa e di GvHD cronica [42]. Recenti lavori dimostrano però come l'uso della ciclofosfamide (CY) post-trapianto per la profilassi della GvHD, in sostituzione della profilassi standard con il siero antilinfocitario (ATG), possa migliorare l'outcome in questa tipologia di donatore, con livelli di sopravvivenza sovrapponibili al trapianto da donatore HLA-identico: ridotta GvHD acuta di grado III e IV, aumentata RFS (55% *vs* 34%) e OS (56% *vs* 38%) a 2 anni rispetto ai pazienti trattati con ATG [43].

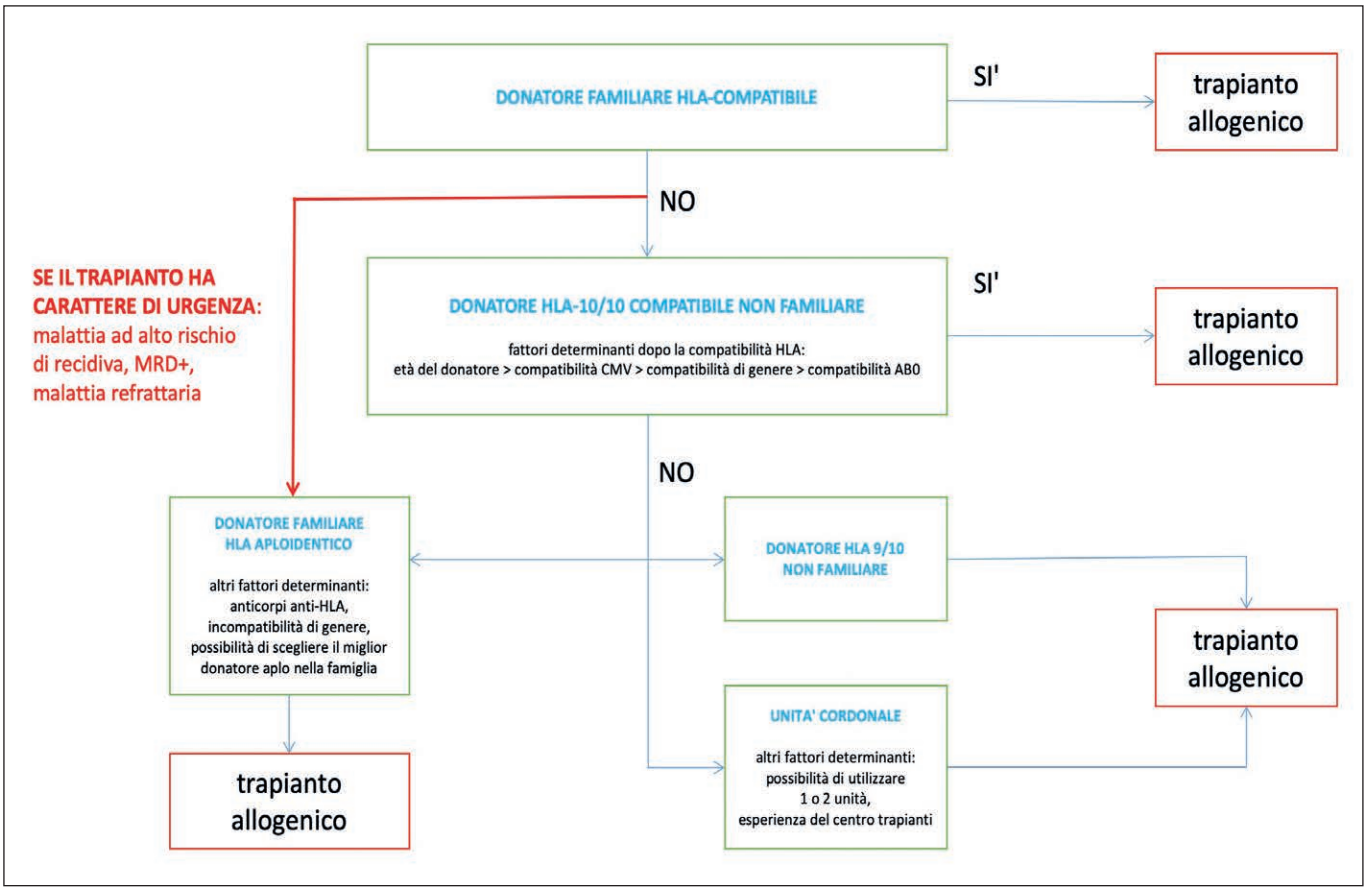


Figura 2 - Algoritmo sulla scelta del donatore di cellule emopoietiche.

Per quanto riguarda il trapianto da donatore familiare aploidentico, oltre il 90% dei pazienti dispone di uno o spesso di più donatori all'interno della famiglia, considerando che può essere effettuata una ricerca familiare allargata ai parenti di secondo grado. In diverse analisi retrospettive è stato documentato come questa tipologia di trapianto, seguito dalle alte dosi di CY post-trapianto come profilassi della GvHD, abbia un esito non inferiore a quello del trapianto da donatore HLA-compatibile non correlato, ma con significativamente ridotto rischio di GvHD cronica, sia che la sorgente cellulare sia sangue midollare che cellule da sangue periferico mobilizzate [44]. Il *Centre for International Blood and Marrow Transplant Research* (CIBMTR) ha comparato l'outcome dopo trapianto aploidentico rispetto al trapianto da donatore HLA-compatibile nei pazienti con LAM in CR1: non sono state rilevate differenze in sopravvivenza globale, RFS, NRM, GvHD acuta, ma è stata dimostrata una ridotta GvHD cronica nel trapianto aploidentico [45].

Anche il programma aploidentico proposto dal gruppo cinese dell'Università di Beijing, basato sulla deplezione T *in vivo* utilizzando il siero antilinfocitario, presenta esito sovrapponibile a trapianto da donatore familiare HLA-identico nei pazienti in prima remissione completa [46]. Nella LAM, in caso di patologie refrattarie con MRD positiva o ad elevato rischio di recidiva, il fattore tempo gioca un ruolo cruciale e la possibilità di disporre di un donatore familiare aploidentico permette di poter procedere al trapianto in tempi più rapidi, rispetto a un donatore da registro. Questo fattore ha condotto a un grande sviluppo del trapianto aploidentico nell'ultima decade. Riportiamo i dati forniti dal nostro Centro Trapianti nel trapianto aploidentico (Figura 3): OS e DFS nei pazienti affetti da LAM trapiantati in prima remissione completa (n. 71) e con malattia attiva (n. 41) negli anni 2013-2018, con un follow-up minimo di 2 anni.

L'uso del sangue cordonale come sorgente di cellule emopoietiche sta andando incontro, al momento, a un progressivo declino con l'aumentare del trapianto aploidentico, ma rappresenta una opzione valida per le minoranze etniche e in campo pediatrico; offre il vantaggio di una maggiore tolleranza nella disparità HLA e un basso rischio di GvHD. La cellularità cordonale rimane una problematica attiva, per cui sono stati sviluppati la tecnica di infusione intraossea e l'utilizzo di due unità cordonali per trapianto. Studi retrospettivi e da registro hanno comunque dimostrato una sopravvivenza a lungo termine paragonabile a quella correlata a HLA-compatibile non familiare [47] a fronte di un aumento di NRM, dovuta principalmente a complicanze infettive, correlate ad attecchimento e a ricostituzione immunologica ritardati.

Oltre all'istocompatibilità donatore-ricevente, uno dei fattori determinanti l'outcome dopo trapianto da donatore non familiare è l'età del donatore: lo studio di Kollman del 2016 riporta una riduzione della sopravvivenza del 5% per ogni incremento di 10 anni nell'età del donatore; più recentemente una grande analisi ha confermato un vantaggio di OS con donatore da regi-

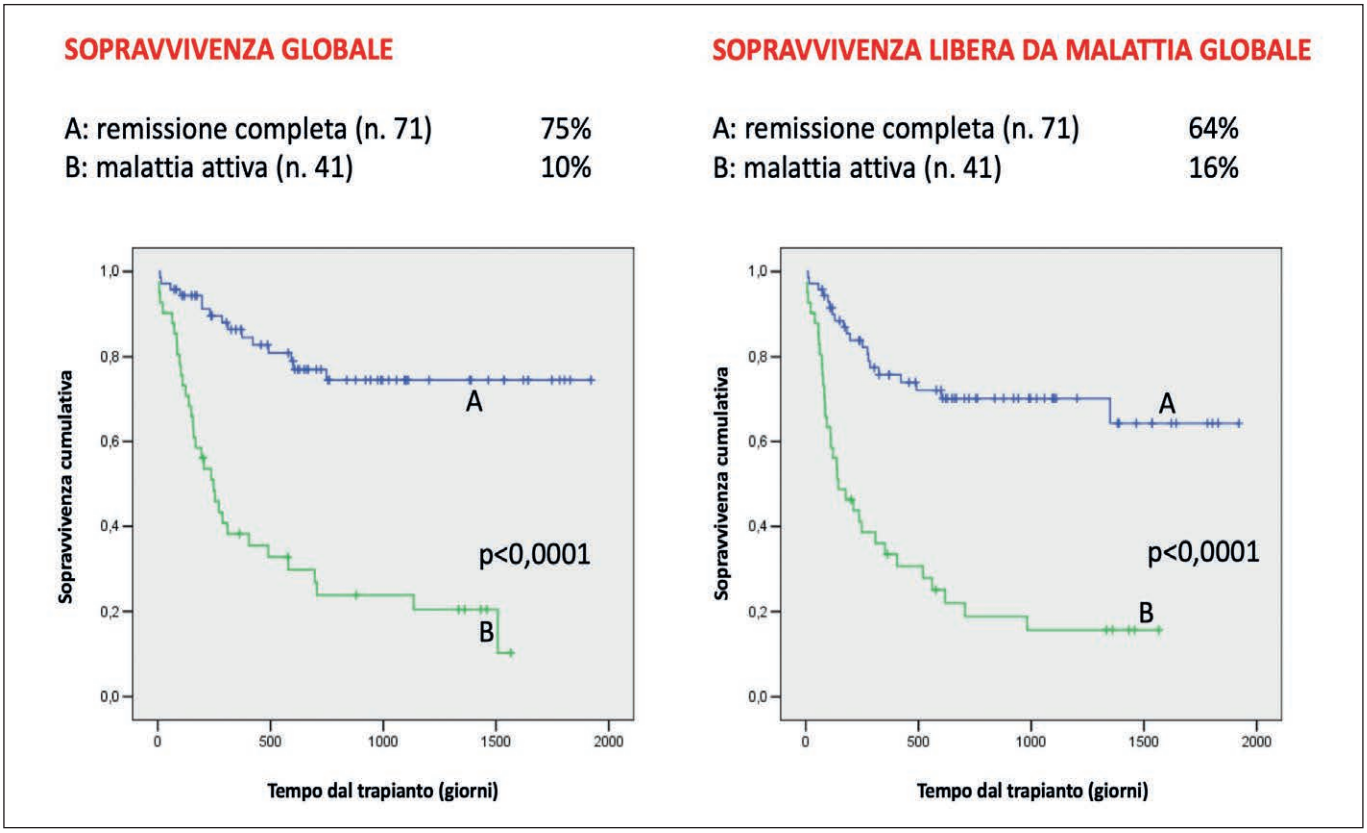


***Figura 3** - Algoritmo sulla scelta del donatore di cellule emopoietiche.*

stro più giovane di 10 anni [48] e anche nel donatore aploidentico esiste tale riscontro [49]. Questo dato ha avuto un impatto nella pratica clinica: la selezione di donatori sotto i 30 anni di età è aumentata dal 36% nel periodo 1988-2006, al 51% nel 1999-2011 fino al 69% nel 2012-2014 [50].

A parità di compatibilità HLA, gli altri fattori che contribuiscono alla scelta del donatore più idoneo sono i seguenti:

- la sierologia per CMV di donatore e ricevente: ridotta OS in caso di donatore CMV sieropositivo in ricevente sieronegativo; nel trapianto mieloablativo l'uso di donatore CMV sieronegativo in ricevente CMV sieropositivo si associa a aumentato rischio di NRM [51]. L'utilizzo di nuovi farmaci nella profilassi della riattivazione ha migliorato negli ultimi anni la mortalità correlata al CMV [52];
- l'incompatibilità di gruppo AB0: fattore meno impattante con l'incrementato utilizzo di cellule staminali periferiche mobilizzate; l'incompatibilità maggiore, in presenza di elevati titoli, può comunque determinare un ritardato attecchimento della serie eritroide fino all'aplasia eritrocitaria [48];
- la disparità di genere donatore e ricevente: argomento controverso, sono riportati dati di peggiore outcome nel caso donatore femmina in ricevente maschio [50]; nel setting aploidentico il peggior donatore risulta essere la madre [49];
- la presenza di anticorpi anti-HLA: si associa ad aumentato rischio di *graft failure* e a ridotta sopravvivenza dopo trapianto aploidentico [53].

In assenza di donatore familiare HLA-compatibile, identificare il donatore alternativo ideale rimane un focus di ricerca ancora in corso. Ad oggi, il donatore aploidentico familiare o il donatore non correlato mismatched per un antigene sono di norma preferibili all'unità cordonale, anche se la decisione va pesata all'interno del centro trapianti, in base all'esperienza clinica e di ricerca prodotta dal centro stesso.

Quale sorgente cellulare utilizzare?

Per quanto riguarda la sorgente cellulare, attualmente nel mondo il 70-90% dei trapianti utilizza cellule staminali periferiche mobilizzate (PBSC). Nella pratica clinica l'utilizzo di sangue midollare necessita dell'idoneità anestesiologica del donatore al prelievo; nei casi in cui il rischio anestesiologico sia considerato troppo elevato si deve ricorrere all'uso di PBSC; per entrambe le sorgenti cellulari è prevista l'idoneità alla procedura posta dalla medicina trasfusionale. Dalla meta-analisi condotta nel 2005, l'uso di PBSC si associava a più bassa recidiva, ma un effettivo miglioramento della RFS e dell'OS era limitato a pazienti in stadio di malattia avanzato [54]. Lo studio prospettico di Anasetti tra PBSC e sangue midollare in trapianti da donatore HLA-compatibile non familiare, non riportava differenze in termini di OS a 2 anni, né di incidenza di GvHD acuta o di recidiva; l'utilizzo di PBSC si associava a più bassa incidenza di *graft failure* (3% *vs* 9%), ma a una maggiore incidenza di GvHD cronica a 2 anni (53% *vs* 41%) [55]. Anche le più recenti analisi condotte da EBMT confermano il dato di maggior rischio di GvHD cronica con l'uso di PBSC [56]. L'utilizzo di PBSC prevede maggiore terapia immunosoppressiva per la profilassi della GvHD, come il siero antilinfocitario a basse dosi nel setting del trapianto da donatore familiare HLA-identico. Nel trapianto aploidentico T-repleto è di norma raccomandato l'uso di sangue midollare, quando viene utilizzata la CY post-trapianto come profilassi della GvHD [57].

In conclusione, l'uso di sangue midollare correla con sopravvivenza equivalente a PBSC, ma inferiore rischio di GvHD cronica e dovrebbe essere preferibile nel setting del trapianto preceduto da condizionamento mieloablativo; l'utilizzo di PBSC può offrire un vantaggio per i pazienti che ricevono un condizionamento ad intensità ridotta, con migliore RFS e attecchimento più rapido [58].

Regimi di condizionamento

Il regime di condizionamento somministrato prima del trapianto allogenico nella LAM deve essere sufficientemente immunosoppressivo per permettere l'attecchimento e avere un ruolo antileucemico. I regimi di condizionamento sono suddivisi convenzionalmente in tre categorie: mieloablativo (MAC), che causa citopenia irreversibile e nel quale il supporto di cellule emopoietiche è mandatorio; non mieloablativo, che induce una minima citopenia, che potrebbe essere superata anche senza supporto di cellule staminali; ad intensità ridotta (RIC) definito per esclusione, in quanto non rientra in nessuna delle due definizioni precedenti [59].

MAC

Attualmente rimane lo standard terapeutico nei pazienti al di sotto dei 45 anni o tra i 45 e i 60 anni in assenza di comorbidità e in CR1, in quanto induce i più bassi tassi di recidiva. Esistono condizionamenti basati sulla irradiazione corporea totale (*total body irradiation*, TBI) e basati sulla sola chemioterapia.

Il regime più utilizzato nei pazienti con LAM era costituito da TBI 12 Gray associata a CY 120 mg/kg. I regimi a base di TBI nella LAM non hanno dimostrato superiorità rispetto ai condizionamenti con sola chemioterapia e conservano un ruolo solo per pazienti selezionati, con coinvolgimento del sistema nervoso centrale o con sarcoma extramidollare [59].

L'utilizzo del busulfano (BU) ha rivoluzionato l'approccio al trapianto mieloablativo; il BU è un farmaco radiomimetico, ha attività mielotossica e antileucemica, la formulazione endovenosa ha dimostrato migliore biodisponibilità e inferiore tossicità della formulazione orale [60]. In uno studio prospettico di Bredson *et al.* [61] venivano confrontate dosi mieloablative di BU (> 9 mg/kg) in formulazione endovenosa con regimi basati sulla TBI in neoplasie mieloidi, per la maggior parte LAM: il regime con BU ha prodotto una sopravvivenza superiore (probabilità di sopravvivenza a 2 anni del 56% e 48% per BU e TBI, rispettivamente), senza incremento di NRM o aumentato rischio di

recidiva. L'associazione più comune è costituita da BU-CY, che ha condotto a sopravvivenza a lungo termine di poco inferiore a TBI-CY [62] in pazienti con LAM in CR1, trapiantati da donatori HLA-compatibili, ma con GvHD acuta di grado 2-4 e cronica significativamente ridotte rispetto all'uso della TBI [63]. Più recentemente, l'associazione di BU e fludarabina ha prodotto risultati simili a BU-CY, ma con una NRM più bassa [64], facendone un regime di condizionamento molto utilizzato nei pazienti fit in remissione completa al di sotto dei 55 anni.
Anche nel setting aploidentico T-repleto con CY post-trapianto, i regimi TBI non hanno dimostrato superiorità rispetto a quelli non TBI in termini di ricaduta, RFS e NRM e sopravvivenza globale, mentre il rischio di sviluppo di GvHD cronica era maggiore nei pazienti sottoposti a TBI [65]. Il condizionamento mieloablativo ideato dal gruppo di Valencia nel trapianto da cordone, ovvero l'associazione di tiotepa, BU e fludarabina (TBF) [66] nel trapianto aploidentico T-repleto [67] ha dimostrato buona tollerabilità ed efficacia, con GvHD acuta di grado 2-4 del 10-40%, NRM a 1 anno 10-20% e DFS a 2 anni 50-60%. Il regime TBF è attualmente in larga misura utilizzato anche nel trapianto da donatore HLA-compatibile, familiare e non; uno studio multicentrico retrospettivo ha paragonato BF con TBF, indicando migliore OS a 5 anni e ridotto tasso di recidive per TBF, con NRM comparabile [68]. La riduzione del BU a 2 giorni di somministrazione lo rende uno schema mieloablativo applicabile anche nei pazienti > 60 anni. Più recentemente il treosulfano, alchilante bifunzionale dalle proprietà mielotossiche e immunosoppressive, risulta associato a una bassa tossicità; l'associazione più favorevole è con fludarabina, alla dose di 12-14 g/m^2 [69].

RIC

Trova indicazione nei pazienti anziani, pesantemente pre-trattati o con comorbidità, in quanto la riduzione dell'intensità determina tossicità e NRM ridotte, mentre viene impiegata una forte immunosoppressione per permettere l'attecchimento e l'effetto *graft versus leukemia* (GvL). Non esiste attualmente un regime RIC ottimale nella LAM: i regimi maggiormente utilizzati prevedono l'associazione di fludarabina con BU a dosaggio ridotto (6,4 mg/kg in 2 giorni), oppure con melfalan (140 mg/m^2) o con CY (1 g/m^2 x 2 giorni). Non vi sono dati prospettici, ma una recente metanalisi indica una migliore OS a 3 anni per i pazienti che hanno ricevuto fludarabina e melfalan [70]. Ciurea *et al.* hanno recentemente documentato un beneficio in sopravvivenza a lungo termine, PFS a 5 anni e ridotta NRM nei pazienti anziani sottoposti a RIC cosituito da fludarabina 160 mg/m^2 e melfalan 100 mg/m^2, con una maggiore evidenza nei pazienti con *performance status* inferiore [71]. Sono stati inoltre sviluppati programmi sequenziali che prevedono l'utilizzo del RIC: Schmid *et al.* [72] hanno elaborato un approccio terapeutico con una prima fase di chemioterapia citoriduttiva FLAMSA seguita da un condizionamento a ridotta intensità ed infine DLI profilattiche nei pazienti che non sviluppavano GvHD. I risultati ottenuti sono promettenti: OS a 2 anni del 63%, NRM a 1 anno 17%, recidiva a 1 anno 29%. Anche nel trapianto aploidentico T-repleto con CY post-trapianto sono state dimostrate fattibilità ed efficacia di un approccio sequenziale comprendente tiotepa, etoposide e CY, seguito da RIC costituito da fludarabina e BU [73].
Il rischio di seconda neoplasia non è comunque ridotto nel RIC e persiste per tutta la durata della vita; l'ipogonadismo e l'infertilità costituiscono un importante problema clinico dopo condizionamento sia MAC che RIC [59].
Il ruolo dell'intensità del condizionamento nelle LAM è stato valutato in numerosi studi retrospettivi. In una meta-analisi tra MAC e RIC in pazienti con LAM, il RIC ha dimostrato inferiore GvHD acuta di grado 2-4, superiore incidenza di recidiva, ma sovrapponibile sopravvivenza globale [74]. Tre studi randomizzati hanno fallito nel dimostrare la superiorità dell'uno rispetto all'altro: due hanno dimostrato superiore NRM nei riceventi di regime MAC, ma anche ridotta recidiva; il più recente US CNT trial è stato interrotto precocemente in quanto il braccio RIC, pur dimostrando inferiore NRM, aveva maggiore recidiva, determinando ridotta EFS [75]. Lo studio prospettico randomizzato BMT CNT 0901 ha dimostrato una sopravvivenza a 18 mesi del 67,7% e del 77,5% rispettivamente nei bracci RIC e MAC. Inoltre ha confermato ridotta NRM (4% *vs* 16% dopo RIC *vs* MAC) e significativa maggiore recidiva nel braccio RIC (48% *vs* 14%), con un vantaggio in RFS per il braccio MAC [76]. Inoltre, come dimostrato da diversi lavori retrospettivi e dallo studio prospettico di Hourigan *et al.* [77], i pazienti con MRD positività pre-trapianto beneficiano fortemente di un condizionamento ad alta intensità, mentre il RIC si associa a aumentato rischio di recidiva, ridotta RFS e minore OS.
In conclusione, il MAC offre miglior controllo di malattia e DFS nei pazienti giovani e con buon *performance status*, fino a 45-55 anni; nei pazienti più anziani indicativamente oltre 65 anni o per i pazienti con comorbidità il RIC rappresenta una opzione accettabile; sono necessari più dati per definire il ruolo e l'intensità del condizionamento nei pazienti di fascia di età intermedia. Il MAC rappresenta inoltre la prima scelta in presenza di MRD positiva al momento del trapianto (Tabella 1).

Recidiva post-trapianto

I principali fattori che concorrono ad aumentare il rischio della recidiva post-trapianto sono la fase di malattia al trapianto, la citogenetica all'esordio e l'intensità dell'immunosoppressione post-trapianto [22]. Numerosi studi retrospettivi hanno dimostrato come la persistenza di MRD positiva al trapianto sia il principale fattore di rischio per la recidiva post-trapianto [3]. Per MRD si intende una alterazione genica o una aberrazione immunofenotipica presente alla diagnosi, misurabile attraverso citofluorimetria multiparametrica o PCR transcrittasi inversa quantitativa (RT-PCR). Al momento la RT-PCR (sensibilità 10^{-5} -10^{-6}) è applicabile nelle LAM con mutazioni del CBF o NPM1 mutate; nelle altre forme di LAM è applicabile la citofluorime-

CONDIZIONAMENTO MIELOABLATIVO	CONDIZIONAMENTO AD INTENSITÀ RIDOTTA
Correla con il più basso rischio di recidiva	Induce minori tossicità e NRM
Rappresenta lo standard nel paziente giovane < 40-45 anni	È il condizionamento ideale per pazienti anziani > 65 anni o in presenza di comorbidità sia per anziani che per fascia di età 45-65 anni
Se MRD+ al trapianto correla con miglior esito	Se MRD+ al trapianto non sostanziali differenze in OS rispetto al mieloablativo
TBI non offre vantaggi rispetto a chemioterapici TBI 1200 cGy/Cy 120 mg/kg TBI 1200 cGy/fludarabina 120 mg/m^2	
Bu/Cy (12 mg/kg - 120 mg/kg) Bu/Flu (12 mg/kg - 150 mg/m^2) TBF (tiotepa 10 mg/kg - busulfano 9,6 mg/kg - fludarabina 150 mg/m^2) TBF 2 (tiotepa 10 mg/kg - busulfano 6,4 mg/kg - fludarabina 150 mg/m^2)	Bu/Flu (< 9 mg/kg - 160 mg/m^2) Flu/Mel 140 (160 mg/m^2 - 140 mg/m^2) Flu/Mel 100 (160 mg/m^2 - 100 mg/m^2)

Tabella 1 *- Caratteristiche dei regimi di condizionamento mieloablativo e ad intensità ridotta*

tria multiparametrica (sensibilità 10^{-3}-10^{-4}). Più recentemente la MRD viene studiata mediante NGS (*next-generation sequencing*); anche con questa metodica è stata riscontrata inferiore OS ed elevata recidiva indipendentemente dal rischio ELN, nei casi di MRD positiva post-trapianto [78]. La ricomparsa di MRD positività post-trapianto correla anch'essa con prognosi quanto più infausta, quanto più è precoce. Il monitoraggio della MDR post-trapianto riveste un ruolo cruciale nell'identificare una iniziale ricaduta e intraprendere strategie terapeutiche. Dalla recente analisi effettuata da Nagler *et al.*, il monitoraggio nei pazienti con LAM viene effettuato ogni 2-3 mesi per una durata di 2 anni o fino alla recidiva, in base alle direttive dei vari Centri Trapianto europei [79].

Si sono sviluppate strategie nelle fasi pre-, durante e post-trapianto volte a ridurre il rischio di recidiva (Figura 4). Nella fase post-trapianto l'intento è massimizzare la risposta GvL. Sono stati fatti tentativi volti a ridurre la profilassi della GvHD, ma l'incremento della attività GvL si associava a sviluppo di GvHD, soprattutto nelle ricadute precoci. L'elaborazione di terapie di mantenimento, ad esempio con inibitori di FLT3, inibitori di IDH1/2 e veneto-

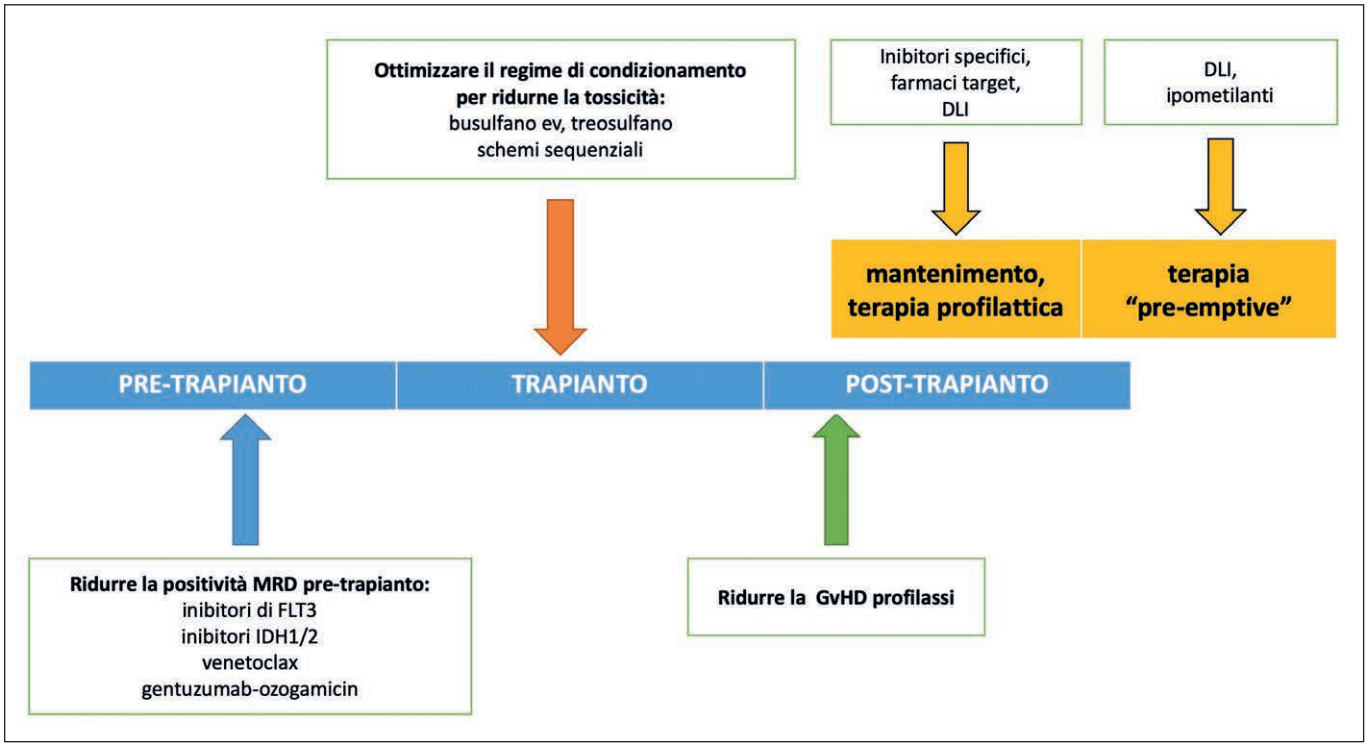


Figura 4 *- Algoritmo sulla scelta del donatore di cellule emopoietiche.*

clax, sono oggetto di studio o di trial clinici ancora in corso. Il ruolo dell'uso profilattico di ipometilanti dopo trapianto rimane incerto e il loro utilizzo non è raccomandato al di fuori di trial clinici. Uno studio di fase III che paragona il mantenimento con azacitidina per un anno *vs* nessun mantenimento si è concluso precocemente e i dati preliminari non mostrano differenze in RFS tra i due bracci [80]. Anche il beneficio di DLI profilattici non è ancora chiaro: un'analisi condotta da EBMT ha evidenziato un miglioramento di sopravvivenza in un sottogruppo di pazienti ad alto rischio che hanno ricevuto DLI dal donatore HLA-compatibile [81]. I DLI da donatori HLA-compatibili sono utilizzati anche come terapia pre-emptive, ovvero quando si positivizza la MRD, e si sono dimostrati sicuri ed efficaci nel migliorare l'outcome [82]. Anche i DLI da donatori aploidentici determinano un beneficio, senza rischio eccessivo di GvHD [9].

La ricaduta ematologica post-trapianto incide pesantemente sulla sopravvivenza (OS a 2 anni 14-25%). È riconosciuto come l'evoluzione clonale sia un importante meccanismo sottostante la recidiva post-trapianto [75]; l'osservazione che mutazioni come FLT3-ITD vengono comunemente perse nella recidiva supporterebbe un approccio a terapie di mantenimento che utilizzino farmaci o terapie cellulari con attività anti-tumorale più ampia e opposte alle terapie-target. Ci sono inoltre evidenze che una alterata regolazione acquisita tra il sistema immunitario del donatore e l'emopoiesi del ricevente giochi un ruolo cruciale nella recidiva [83]. Nei pazienti che recidivano dopo trapianto aploidentico si osserva frequentemente l'isodisomia uniparentale acquisita dei geni dell'HLA sul cromosoma 6p, tale da indurre perdita dell'allele aploidentico mismatched [84]. La recente scoperta della perdita trascrizionale dell'HLA di classe II indica un ulteriore meccanismo con cui l'attività della GvL viene aggirata [85]. La principale sfida nella gestione della recidiva post-trapianto consiste nella tollerabilità di questa tipologia di pazienti alla terapia di salvataggio. La chemioterapia standard, nei pazienti giovani [86], può condurre a tassi di remissione completa dal 27 al 65% e a OS a 2 anni variabile dal 4% al 42%, tali dati sono però dipendenti dalla possibilità e dalla tempistica di un secondo allotrapianto. Un secondo trapianto allogenico si associa a OS a 2 anni tra il 18% e il 38%, come emerge da molteplici studi osservazionali o di registro; il successo del secondo trapianto dipende dalla selezione dei pazienti, il cui *performance status* può essere gravato da comorbidità insorte dopo il primo trapianto. I fattori principali che si associano ad outcome sfavorevole sono la ricaduta precoce dopo il primo trapianto allogenico (6 o 12 mesi in base ai diversi lavori) e il non raggiungimento di remissione ematologica completa prima del trapianto. Non sono riportate differenze statisticamente significative tra l'utilizzo dello stesso donatore del primo trapianto o di donatore differente, né tra il condizionamento mieloablativo e ad intensità ridotta in termini di sopravvivenza globale [87]. In alternativa al trapianto allogenico, la terapia cellulare con DLI [88] porta a una remissione nel 30% dei casi circa e OS a 2 anni del 20%; la terapia epigenetica con azacitidina e DLI [89] permette di ottenere CR del 15% e OS a 2 anni del 12%; una più recente associazione di azacitidina e lenalidomide indica una risposta promettente, complessiva del 47% [90]. Sono in fase di studio ulteriori strategie terapeutiche, come l'utilizzo di cellule NK e di farmaci inibitori di altre vie di segnale coinvolte nella patogenesi della LAM.

Conclusioni

Sono stati effettuati molti progressi in campo trapiantologico nella LAM: una più precisa e complessa indicazione nei pazienti in CR1, probabilmente ancora in divenire, una migliore determinazione della MRD, indispensabile sia nel pre- che nel post-trapianto, una più ampia scelta di donatori e di sorgenti cellulari, un più attento adattamento del regime di condizionamento per i pazienti con comorbidità e anziani.

Grazie a questi sviluppi l'utilizzo del trapianto allogenico può aumentare ulteriormente, anche e soprattutto nella popolazione anziana. A fronte di una riduzione di mortalità correlata al trapianto, la recidiva rimane ancora oggi la principale causa di fallimento; sono necessari i risultati degli studi in corso e di nuove strategie farmacologiche e cellulari per cercare di ridurne il rischio.

La valutazione trapiantologica riveste un ruolo cruciale nell'iter terapeutico dei pazienti affetti da LAM e deve essere effettuata quanto prima, per avviare un percorso complesso, che richiede indagini, fasi e specialisti diversi, il tutto dettato dal fattore tempo, determinante soprattutto nelle forme di malattia ad alto rischio e refrattarie alla terapia di induzione.

Bibliografia

1. Gupta V, Tallman MS, Weisdorf DJ, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. Blood. 2011;117(8):2307-18.
2. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424-47.
3. Buckley SA, Wood BL, Othus M, et al. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. Haematologica. 2017;102(5):865-73.
4. Versluis J, Cornelissen J. Risks and benefits in a personalized application of allogeneic transplantation in patients with AML in first CR. Seminars in Hematology 2019;(56);164-70.
5. Niederwieser D, Baldomero H, Szer J, et al. Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. Bone Marrow Transplant. 2016;51(6):778-85.

6. Estey E. Acute myeloid leukemia: 2021 update on risk-stratification and management. Am J Hematol. 2020;95(11):1368-98.
7. Ringdén O, Boumendil A, Labopin M, et al. Outcome of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients Age >69 Years with Acute Myelogenous Leukemia: On Behalf of the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2019;25(10):1975-83.
8. Ostronoff F, Othus M, Lazenby M, et al. Prognostic significance of NPM1 mutations in the absence of FLT3-internal tandem duplication in older patients with acute myeloid leukemia: a SWOG and UK National Cancer Research Institute/Medical Research Council report. J Clin Oncol. 2015;33(10):1157-64.
9. Di Grazia C, Pozzi S, Geroldi S, et al. Wilms Tumor 1 Expression and Preemptive Immunotherapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia Undergoing an Allogeneic Hemopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(7):1242-6.
10. Cornelissen JJ, van Putten WL, Verdonck LF, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? Blood. 2007;109(9):3658-66.
11. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. Blood. 2016;127(1):62-70.
12. Bazarbachi A, Bug G, Baron F, et al. Clinical practice recommendation on hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with FLT3-internal tandem duplication: a position statement from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Haematologica. 2020;105(6):1507-16.
13. Pagel JM, Othus M, Garcia-Manero G, et al. Rapid Donor Identification Improves Survival in High-Risk First-Remission Patients With Acute Myeloid Leukemia. JCO Oncol Pract. 2020;16(6):e464-e475.
14. Tauro S, Craddock C, Peggs K, et al. Allogeneic stem-cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen has the capacity to produce durable remissions and long-term disease-free survival in patients with high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplasia. J Clin Oncol. 2005;23(36):9387-9.
15. Halaburda K, Labopin M, Mailhol A, et al. Allogeneic stem cell transplantation in second complete remission for core binding factor acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation Haematologica. 2020;105(6):1723-30.
16. Breems DA, Van Putten WLJ, Huijgens PC, et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. J Clin Oncol. 2005;23(9):1969-78.
17. Gilleece MH, Labopin M, Savani BN, et al. Allogeneic haemopoietic transplantation for acute myeloid leukaemia in second complete remission: a registry report by the Acute Leukaemia Working Party of the EBMT. Leukemia. 2020;34(1):87-99.
18. Nagler A, Savani BN, Labopin M, et al. Outcomes after use of two standard ablative regimens in patients with refractory acute myeloid leukaemia: a retrospective, multicentre, registry analysis. Lancet Haematol. 2015;2(9):e384-92.
19. Duval M, Klein JP, Wensheng He, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure J Clin Oncol. 2010;28(23):3730-8.
20. Brissot E, Labopin M, Ehninger G, et al. Haploidentical versus unrelated allogeneic stem cell transplantation for relapsed/refractory acute myeloid leukemia: a report on 1578 patients from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. Haematologica. 2019;104(3):524-32.
21. Todisco E, Ciceri F, Oldani E, et al. The CIBMTR score predicts survival of AML patients undergoing allogeneic transplantation with active disease after a myeloablative or reduced intensity conditioning: a retrospective analysis of the Gruppo Italiano Trapianto Di Midollo Osseo. Leukemia. 2013;27(10):2086-91.
22. Craddock C, Labopin M, Pillai S, et al. Factors predicting outcome after unrelated donor stem cell transplantation in primary refractory acute myeloid leukaemia. Leukemia. 2011;25(5):808-13.
23. Boddu PC, Kantarjian HM, Ravandi F, et al. Characteristics and outcomes of older patients with secondary acute myeloid leukemia according to treatment approach. Cancer. 2017;123(16):3050-60.
24. Granfeldt Østgård LS, Medeiros BC, Sengeløv H, et al. Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. J Clin Oncol. 2015;33(31):3641-9.
25. Litzow MR, Tarima S, Pérez WS, et al. Allogeneic transplantation for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Blood. 2010;115(9):1850-7.
26. Lee CJ, Labopin M, Beelen D, et al. Comparative outcomes of myeloablative and reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for therapy-related acute myeloid leukemia with prior solid tumor: A report from the acute leukemia working party of the European society for blood and bone marrow transplantation. Am J Hematol. 2019;94(4):431-8.
27. Nilsson C, Hulegårdh E, Garelius H, et al. Secondary Acute Myeloid Leukemia and the Role of Allogeneic Stem Cell Transplantation in a Population-Based Setting. Biol Blood Marrow Transplant. 2019;25(9):1770-8.
28. Van der Holt B, Breems DA, Berna Beverloo H, et al. Various distinctive cytogenetic abnormalities in patients with acute myeloid leukemia aged 60 years and older express adverse prognostic value: results from a prospective clinical trial. Br J Haematol. 2007;136(1):96-105.
29. Kurosawa S, Yamaguchi T, Uchida N, et al. Comparison of allogeneic hematopoietic cell transplantation and chemotherapy in elderly patients with non-M3 acute myelogenous leukemia in first complete remission. Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17(3):401-11.
30. Devine SM, Owzar K, Blum W, et al. Phase II study of allogeneic transplantation for older patients with acute myeloid leukemia in first complete remission using a reduced-intensity conditioning regimen: results from Cancer and Leukemia Group B 100103 (Alliance for Clinical Trials in Oncology)/Blood and Marrow Transplant Clinical Trial Network 0502. J Clin Oncol. 2015;33(35):4167-75.
31. Carreras E, Rambaldi A. Evaluation and Counseling of candidates. In: The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. 7th edition. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 11.
32. Walter RB, Pagel JM, Gooley TA, et al. Comparison of Matched Unrelated and Matched Related Donor Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation for Adults with Acute Myeloid Leukemia in First Remission. Leukemia. 2010;24(7):1276-82.
33. Gratwohl A, Stern M, Brand R, et al. Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. Cancer. 2009;115(20):4715-26.
34. Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. Blood. 2005;106(8): 2912-9.
35. Mohamed L. Sorror ML, Rainer F. Storb BM, et al. Comorbidity-Age Index: A Clinical Measure of Biologic Age Before Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Brenda M. J Clin Oncol. 2014;32(29):3249-56.
36. Armand P, Kim HT, Logan BR, et al. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. Blood. 2014;123(23):3664-71.
37. Shouval R, Labopin M, Bondi O, et al. Prediction of Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Mortality 100 Days After Transplantation Using a Machine Learning Algorithm: A European Group for Blood and Marrow

Transplantation Acute Leukemia Working Party Retrospective Data Mining Study. J Clin Oncol. 2015;33(28):3144-51.
38. Barba P, Martino R, Pérez-Simòn JA, el at. Combination of the Hemopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index and the European Group for Blood and Marrow Transplantation score allows a better stratification of high-risk patients undergoing reduced-toxicity allogeneic hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20(1):66-72.
39. Fleischhauer K, Shaw BE. HLA-DP in unrelated hematopoietic cell transplantation revisited: challenges and opportunities. Blood 2017;130(9):1089-96.
40. Buck K, Wadsworth K, Setterholm M, et al. High-Resolution Match Rate of 7/8 and 9/10 or Better for the Be The Match Unrelated Donor Registry. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(4):759-63.
41. Gupta V, Tallman MS, He W, et al. Comparable survival after HLA-well-matched unrelated or matched sibling donor transplantation for acute myeloid leukemia in first remission with unfavorable cytogenetics at diagnosis. Blood. 2010;116(11):1839-48.
42. Verneris MR, Lee SJ, Ahn KW, et al. HLA-Mismatch Is Associated with Worse Outcomes after Unrelated Donor Reduced Intensity Conditioning Hematopoietic Cell Transplantation: An Analysis from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Biol Blood Marrow Transplant. 2015;21(10):1783-9.
43. Battipaglia G, Labopin M, Kroger N, et al. Posttransplant cyclophosphamide vs antithymocyte globulin in HLA-mismatched unrelated donor transplantation. Blood. 2019;134(11):892-9.
44. Ciurea SO, Zhang M-J, Bacigalupo A, et al. Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. Blood. 2015;126(8):1033-40.
45. Rashidi A, Hamadani M, Zhang M-J, et al. Outcomes of haploidentical vs matched sibling transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission. Blood Adv. 2019;3(12): 1826-36.
46. Chang Y-C, Wang Y, Liu Y-R, et al. Haploidentical allograft is superior to matched sibling donor allograft in eradicating pre-transplantation minimal residual disease of AML patients as determined by multiparameter flow cytometry: a retrospective and prospective analysis. J Hematol Oncol. 2017;10(1):134.
47. Solh M. Haploidentical vs cord blood transplantation for adults with acute myelogenous leukemia. World J Stem Cells. 2014;6(4): 371-9.
48. Shaw BE, Logan BR, Spellman SR, et al. Development of an Unrelated Donor Selection Score Predictive of Survival after HCT: Donor Age Matters Most. Biol Blood Marrow Transplant. 2018;24(5):1049-56.
49. Ciurea SO, Malki MMA, Kingtim P, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus recommendations for donor selection in haploidentical hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2020;55(1):12-24.
50. Kollman C, Spellman SR, Zhang M-J, et al. The effect of donor characteristics on survival after unrelated donor transplantation for hematologic malignancy. Blood. 2016;127(2):260-7.
51. Ljungman P. The role of cytomegalovirus serostatus on outcome of hemopoietic stem cell transplantation. Curr Opin Hematol. 2014;21(6):466-9.
52. Ljungman P, Schmitt M, Marty MF, et al. A Mortality Analysis of Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus (CMV) in CMV-seropositive Recipients of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. Clin Infect Dis. 2020;70(8):1525-33.
53. Ciurea SO, Cao K, Fernadez-Vina M, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Consensus Guidelines for the Detection and Treatment of Donor Specific Anti-HLA Antibodies (DSA) in Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. Bone Marrow Transplant. 2018;53(5):521-34.
54. Stem Cell Trialists' Collaborative Group. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. J Clin Oncol. 2005;23(22):5074-87.
55. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, et al. Peripheral-blood stem cell versus bone marrow from unrelated donors. N Engl J Med. 2012;367(16):1487-96.
56. Savani BN, Lapobin M, Blaise D, el at. Peripheral blood stem cell graft compared to bone marrow after reduced intensity conditioning regimens for acute leukemia: a report from the ALWP of the EBMT. Haematologica. 2016;101(2):256-62.
57. Yu X, Liu L, Xie Z, et al. Bone marrow versus peripheral blood as a graft source for haploidentical donor transplantation in adults using post-transplant cyclophosphamide-A systematic review and meta-analysis. Crit Rev Oncol Hematol. 2019;133;120-8.
58. Dholaria B, Savani BN, Hamilton BK, et al. Hematopoietic Cell Transplantation in the Treatment of Newly Diagnosed Adult Acute Myeloid Leukemia: An Evidence-Based Review from the American Society of Transplantation and Cellular Therapy. Biol Blood Marrow Transplant. 2020:S1083-8791(20)30584-X.
59. Jethava YS, Sica S, Savani B, et al. Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. Bone Marrow Transplant. 2017;52(11):1504-11.
60. Nath CE, Shaw PJ. Busulphan in blood and marrow transplantation: dose, route, frequency and role of therapeutic drug monitoring. Curr Clin Pharmacol. 2007;2(1):75-91.
61. Bredson C, LeRademacher J, Kato K, et al. Prospective cohort study comparing intravenous busulfan to total body irradiation in hematopoietic cell transplantation. Blood. 2013;122(24):3871-8.
62. Litzow MR, Perez WS, Klein JP, et al. Comparison of outcome following allogeneic bone marrow transplantation with cyclophosphamide-total body irradiation versus busulfan-cyclophosphamide conditioning regimens for acute myelogenous leukemia in first remission. Br J Haematol. 2002;119(4):1115-24.
63. Nagler A, Rocha V, Labopin M, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: comparison of intravenous busulfan plus cyclophoaphamide (Cy) vs total-body irradiation plus Cy as conditioning regimen--a report from the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation. J Clin Oncol. 2013;31(28):3549-56.
64. Giralt S. Busulfan-based conditioning regimens: not all partners are equal. Lancet Oncol. 2015;16(15):1448-9.
65. Dholaria B, Labopin M, Angelucci E, et al. Impact of total body irradiation- vs chemotherapy-based myeloablative conditioning on outcomes of haploidentical hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. Am J Hematol. 2020 Jul 13. doi: 10.1002/ajh.25934.
66. Sanz J, Boluda JCH, Martín C, et al. Single-unit umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in patients with hematological malignancy using busulfan, thiotepa, fludarabine and ATG as myeloablative conditioning regimen. Bone Marrow Transplant. 2012;47(10):1287-93.
67. Raiola AM, Dominietto A, Ghiso A, et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. Biol Blood Marrow Transplant. 2013;19(1):117-22.
68. Sora F, Di Grazia C, Chiusolo P, et al. Allogeneic Hemopoietic Stem Cell Transplants in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) Prepared with Busulfan and Fludarabine (BUFLU) or Thiotepa, Busulfan, and Fludarabine (TBF): A Retrospective Study. Biol Blood Marrow Transplant. 2020;26(4):698-703.
69. Shimoni A. Treosulfan-based or busulfan-based conditioning for allogeneic transplantation: the role of dose intensity. Lancet Haematol. 2020;7(1):e4-e5.

70. Malki MMA, Nathwani N, Yang D, et al. Melphalan-Based Reduced-Intensity Conditioning is Associated with Favorable Disease Control and Acceptable Toxicities in Patients Older Than 70 with Hematologic Malignancies Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2018;24(9):1828-35.

71. Ciurea SO, Kongtim P, Varma A, et al. Is there an optimal conditioning for older patients with AML receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation? Blood. 2020;135(6):449-52.

72. Owattanapanich W, Ungprasert P, Wais V, et al. FLAMSA-RIC for Stem Cell Transplantation in Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Clin Med. 2019;8(9):1437.

73. Duléry R, Ménard AL, Chantepie S, et al. Sequential Conditioning with Thiotepa in T Cell- Replete Hematopoietic Stem Cell Transplantation for the Treatment of Refractory Hematologic Malignancies: Comparison with Matched Related, Haplo-Mismatched, and Unrelated Donors. Biol Blood Marrow Transplant. 2018;24(5):1013-21.

74. Zeng W, Huang L, Meng F, et al. Reduced-intensity and myeloablative conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a meta-analysis and systematic review. J Clin Exp Med. 2014;7(11):4357-68.

75. Loke J, Malladi R, Moss P, et al. The role of allogeneic stem cell transplantation in the management of acute myeloid leukaemia: a triumph of hope and experience. Br J Haematol. 2020;188(1):129-46.

76. Scott BL, Pasquini MC, Brent RL, et al. Myeloablative Versus Reduced-Intensity Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. J Clin Oncol. 2017;35(11):1154-61.

77. Hourigan CS, Dillon LW, Gui G, et al. Impact of Conditioning Intensity of Allogeneic Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With Genomic Evidence of Residual Disease. J Clin Oncol. 2020;38(12):1273-83.

78. Kim T, Moon JH, Ahn J-S, et al. Next-generation sequencing-based posttransplant monitoring of acute myeloid leukemia identifies patients at high risk of relapse. Blood. 2018;132(15):1604-13.

79. Nagler A, Baron F, Labopin M, et al Measurable residual disease (MRD) testing for acute leukemia in EBMT transplant centers: a survey on behalf of the ALWP of the EBMT. Bone Marrow Transplant. 2021;56(1):218-224.

80. Oran B, de Lima M, Garcia-Manero G, et al. Maintenance with 5-Azacytidine for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome Patients. Blood. 2018;132(Suppl.1):971.

81. Schmid C, Labopin M, Schaap N, et al. Prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation in acute leukaemia - a matched pair analysis by the Acute Leukaemia Working Party of EBMT. Br J Haematol. 2019;184(5):782-7.

82. Tan Y, Du K, Luo Y, et al. Superiority of preemptive donor lymphocyte infusion based on minimal residual disease in acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transfusion. 2014;54(6):1493-500.

83. Barrett J, Craddock C. Bone marrow transplantation in the United Kingdom - past, present and future. Br J Haematol. 2020;191(4):612-6.

84. Vago L, Perna SK, Zanussi M, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. N Engl J Med. 2009;361(5):478-88.

85. Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. Nat Med. 2019;25(4):603-11.

86. Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. Blood. 2012;119(6):1599-606.

87. Moukalled NM, Kharfan-Dabaja MA. What is the role of a second allogeneic hematopoietic cell transplant in relapsed acute myeloid leukemia? Bone Marrow Transplant. 2020;55(2):325-31.

88. Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. J Clin Oncol 2007;25(31):4938-45.

89. Craddock C, Jilani N, Siddique S, et al. Tolerability and Clinical Activity of Post-Transplantation Azacitidine in Patients Allografted for Acute Myeloid Leukemia Treated on the RICAZA Trial. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(2):385-90.

90. Craddock C, Slade D, De Santo C, et al. Combination Lenalidomide and Azacitidine: A Novel Salvage Therapy in Patients Who Relapse After Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2019;37(7):580-8.

Parole Chiave

Leucemia mieloide acuta, trapianto allogenico, donatore, condizionamento.

Indirizzi per la corrispondenza

Emanuele Angelucci
Ematologia e Centro Trapianti
IRCCS Ospedale Policlinico San Martino
Largo Rosanna Benzi 10, 16132 Genova
Tel(+39)0105553651 - Fax (+39)0105556789
E-mail: emanuele.angelucci@hsanmartino.it

Nuovi Farmaci



Raffaele Palmieri, Adriano Venditti

Ematologia, Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Università "Tor Vergata" di Roma

Introduzione

Sin dagli anni '70, lo schema 3+7, ossia l'associazione daunorubicina e citarabina, ha storicamente rappresentato il cardine del trattamento della leucemia mieloide acuta (LMA). Nel corso degli anni sono stati messi in atto diversi tentativi di potenziamento del 3+7 al fine di migliorarne i risultati, tanto in termini di frequenza che di durata della risposta. Questi tentativi sono esitati nell'utilizzo di varianti del 3+7, come ad es. l'inserimento di un terzo farmaco (etoposide) o la sostituzione della daunorubicina con l'idarubicina. Un ulteriore tentativo è stato espletato impiegando un approccio terapeutico a 3 farmaci ma nel cui contesto, alla citarabina, si associano fludarabina e idarubicina [1]. Nonostante i numerosi tentativi ai quali si è ricorso, il 3+7 ha rappresentato per più di 40 anni il *golden standard* per la terapia della LMA. Dopo circa quattro decadi di stagnazione da un punto di vista delle novità terapeutiche, il 2017 ha rappresentato un anno di svolta per il trattamento della LMA. Infatti, quattro nuove molecole (midostaurina, enasidenib, CPX-351 e gemtuzumab ozogamicin) hanno ottenuto l'approvazione da parte della *Food and Drug Administration* (FDA) statunitense. Successivamente, ulteriori cinque farmaci (gilteritinib, ivosidenib, venetoclax, glasdegib e CC-486) hanno concluso con successo l'iter approvativo presso FDA, anch'essi aggiungendosi all'armamentario terapeutico nella lotta alle LMA [2]. L'auspicio è che l'introduzione di tali nuove molecole, promuovendo il ricorso a strategie di personalizzazione terapeutica ispirate alle caratteristiche individuali dei pazienti, abbiano inaugurato la transizione ad una nuova era nel trattamento della LMA.

In questo articolo descriveremo appunto i farmaci di più recente approvazione o candidati ad essa, ed i rispettivi campi di applicazione nella terapia della LMA.

CPX-351

Una possibile strategia per ottimizzare l'efficacia di terapie già note consiste nello sviluppo e applicazione clinica di nuove formulazioni di vecchi farmaci come quelli inclusi nel 3+7.

CPX-351 rappresenta il paradigma di tali sforzi. CPX-351 è una nuova formulazione liposomiale che incapsula citarabina e daunorubicina in un rapporto molare fisso di 5:1. Il CPX-351 ha mostrato un'attività antileucemica *in vivo* superiore rispetto all'associazione dei due farmaci somministrati singolarmente. L'incapsulamento di citarabina e daunorubicina all'interno dei liposomi favorisce l'accumulo intramidollare del farmaco, ne aumenta l'entità e la durata di esposizione, preserva il rapporto molare 5:1 fino al rilascio nella cellula leucemica bersaglio e potenzialmente aumenta la specificità del rilascio. Tutto ciò mitiga i fenomeni di dispersione del farmaco e, di conseguenza, si traduce in una significativa riduzione degli effetti *off-target* [3].

Uno studio randomizzato di fase 2 che ha confrontato CPX-351 verso 3+7 in pazienti con LMA di nuova diagnosi ha mostrato tassi di *Overall Response Rate* (ORR) più elevati nel gruppo CPX-351 rispetto al braccio di controllo (66,7% *vs* 51,2%,). Il trattamento con CPX-351 era associato a tossicità ematologica più frequente e profonda e, quindi, a tempistiche di recupero ematologico più prolungate. Il tasso di mortalità a 60 giorni era significativamente inferiore rispetto al regime 3+7 (4,7% *vs* 14,6%). Seppure l'obiettivo principale dello studio non era raggiunto poiché non emergevano differenze tra i due bracci in termini di *Overall Survival* (OS), una *post-hoc* analisi dimostrava che i pazienti con LMA secondaria che avevano ricevuto CPX-351 avevano una durata di *Event Free Survival* (EFS) significativamente superiore rispetto al braccio di controllo (12,1 *vs* 6,1 mesi, p=0,01) [4]. Sulla base di questi risultati, 309 pazienti con età ≥ 60 anni e con LMA secondaria sono stati arruolati in uno studio di fase 3 che confrontava CPX-351 e 3+7. CPX-351 ha prolungato significativamente la OS mediana rispetto al gruppo di controllo (9,56 *vs* 5,95 mesi; HR=0,69; IC 95%, da 0,52 a 0,90; p=0,003). Inoltre, il tasso di Remissione Completa (RC) è stato significativamente più elevato con CPX-351 rispetto a 3+7 (47,7% *vs* 33,3%, p=0,016). Anche in questo caso, il tasso di mortalità a 60 giorni dei pazienti arruolati al braccio CPX-351 è stato significativamente inferiore rispetto al braccio di controllo (13,7% *vs* 21,2%) [3]. Sulla base di questi risultati, CPX-351 ha ricevuto l'approvazione da parte della FDA e dell'*European Medicines Agency* (EMA) per il trattamento di pazienti adulti affetti da LMA *therapy-related* (t-AML) o LMA con *Myelodysplasia-related changes* (AML-MRC) di nuova diagnosi.

La notevole efficacia di questa combinazione di farmaci nel sottogruppo di pazienti t-AML ed AML-MRC può rappresentare una risposta all'esigenza tutt'ora insoddisfatta costituita dalla mancanza di un trattamento efficace per specifici sottogruppi di LMA (t-AML e AML-MRC), caratterizzati da intrinseca chemioresistenza [4]. La superiore efficacia di CPX-351 si coniuga peraltro con un profilo di tossicità extra-ematologica di estrema maneggevolezza che bene si allinea con le caratteristiche di fragilità di una popolazione di pazienti anziana.

Farmaci coniugati ad anticorpi monoclonali (*Antibody-Drug Conjugate* - ADCs)

Gli ADCs, attraverso il legame di agenti citotossici con specifici anticorpi che legano marcatori cellulari di superfice, favoriscono la somministrazione di un farmaco citotossico ad alto dosaggio a fronte di una ridotta tossicità. Nell'ultimo decennio, diversi tentativi di produzione di ADCs si sono concentrati sull'utilizzo del CD33 come potenziale bersaglio terapeutico nella LMA. Poiché il CD33 viene internalizzato rapidamente quando legato ad anticorpi, la coniugazione di molecole citotossiche con anticorpi specifici per questo marcatore cellulare di superficie favorisce un'efficace penetrazione e distribuzione intracellulare del farmaco. Nel caso del gemtuzumab ozogamicin (GO), l'anticorpo anti-CD33 è coniugato con l'agente intercalante calicheamicina mediante un *linker* idrolizzabile. Una volta che il coniugato del farmaco viene internalizzato nella cellula, la calicheamicina viene rilasciata a seguito dell'idrolisi intralisosomiale del *linker*. Una volta libera, calicheamicina ha accesso al nucleo dove genera rotture del DNA con successiva morte cellulare [5,6].

Sulla base dei risultati di tre studi di fase 2, GO ha nel 2000 ricevuto l'approvazione accelerata da parte di FDA per l'uso come singolo agente nel trattamento della LMA recidivata o refrattaria. A questi iniziali *trial* clinici ne sono seguiti altri di fase 3 [5,7,8]. Nello studio di fase 3 SWOG S0106, che ha incluso 595 pazienti con LMA *de novo* di età <60 anni, i soggetti venivano randomizzati a ricevere 3+7±GO, in singola somministrazione al dosaggio di 6 mg/m^2. Questo studio fu interrotto precocemente in quanto un'analisi *ad interim* dimostrò che l'aggiunta di GO alla chemioterapia non era associata ad un miglioramento del tasso di RC (70% *vs* 69%) e/o di OS (tasso di sopravvivenza a 5 anni 46% *vs* 50%), a fronte di tassi di mortalità più elevati (5,5% *vs* 1,4%) [8]. Sulla base di questi risultati, che evidenziavano un'aumentata incidenza di malattia ostruttiva sinusoidale epatica nel bracco GO + chemioterapia, il farmaco fu ritirato dal commercio nel 2010. Successivi studi hanno indagato diversi dosaggi e combinazioni di GO, nel tentativo di ridurne la tossicità e massimizzarne l'efficacia. Ad esempio, nello studio di fase 3 ALFA-0701, 278 pazienti con LMA *de novo* (50-70 anni) venivano randomizzati a ricevere chemioterapia intensiva di induzione con l'aggiunta o meno di GO frazionato (3 mg/m^2 nei giorni 1, 4 e 7 durante l'induzione e una singola dose, al giorno 1, durante il consolidamento). Sebbene il tasso di RC fosse simile tra i due bracci, i pazienti che avevano ricevuto GO+3+7 avevano una EFS significativamente più lunga (19,6 *vs* 11,9 mesi, p=0,00018) [8]. La durata di EFS era l'*endpoint* principale dello studio e, sulla base di questo dato, il GO è stato riapprovato da FDA nel 2017 e da EMA nel 2018. Vi è da segnalare che FDA ha approvato GO in combinazione con 3+7 per il trattamento di LMA *de novo* CD33 positive e come singolo agente per il trattamento di LMA CD33 positive recidivate o refrattarie. L'approvazione EMA si limita alla combinazione GO+3+7 per la terapia delle LMA *de novo*. In linea con quanto già osservato in altre esperienze, l'analisi dei sottogruppi dimostrava che il beneficio clinico era limitato ai pazienti con LMA a rischio citogenetico favorevole o intermedio. L'analisi del profilo di sicurezza ha mostrato tempi di recupero piastrinico significativamente più lunghi per chi riceveva GO; di contro non si osservava nessuna differenza nell'incidenza di malattia ostruttiva sinusoidale epatica né nella popolazione in generale né in coloro che sono stati avviati a trapianto allogenico. Una metanalisi di cinque studi di fase 3, comprendente un totale di 3325 pazienti con LMA, ha dimostrato una significativa riduzione della frequenza di ricaduta e un miglioramento della OS a favore del trattamento con GO. Anche in questo caso e indipendentemente dalla schedula e dose (3 mg/m^2 o 6 mg/m^2), il beneficio derivato dalla somministrazione di GO riguardava i pazienti con LMA a rischio citogenetico favorevole o intermedio [9].

Gli studi menzionati dimostrano che GO, somministrato secondo uno schema di dosaggio frazionato, possiede un profilo di tossicità maneggevole, senza che questo ne comprometta l'efficacia clinica [10,11]. Va attentamente monitorato l'evento avverso di piastrinopenia persistente, così come il rischio di malattia ostruttiva sinusoidale epatica.

Inibitori di FLT3

FLT3 (tirosin chinasi 3 correlata alla FMS) è un recettore delle citochine (CD135) appartenente alla classe dei recettori delle tirosin chinasi di classe III ed è espresso sulla superficie dei progenitori ematopoietici. FLT3 svolge un ruolo fondamentale nella proliferazione e sopravvivenza delle cellule mieloidi e linfoidi. Nella LMA sono state identificate due mutazioni ricorrenti a carico del gene FLT3: le duplicazioni tandem interne del dominio iuxtamembranoso di FLT3 (FLT3-ITDs) che si osservano in circa il 25% dei pazienti; le mutazioni puntiformi a carico del dominio chinasico di FLT3 (FLT3-TKD, tipicamente a carico del codone D835) descritte in circa il 5-10% dei pazienti [12]. Entrambe le aberrazioni genetiche determinano un'attivazione costitutiva della chinasi che promuove la crescita cellulare, la sopravvivenza e i meccanismi anti-apoptotici [13]. Le mutazioni di FLT3-ITD sono associate a prognosi avversa in quanto si associano ad elevati tassi di recidiva, in particolare in caso di un'alta carica allelica (*Allelic Ratio*). L'impatto prognostico delle mutazioni che coinvolgono il dominio chinasico di FLT3 non è ancora del tutto chiaro [14].

Sin dal 2002 numerosi inibitori di FLT3 sono stati testati nel contesto di diversi studi clinici.

Sorafenib, un inibitore polispecifico di tirosin chinasi, è un farmaco approvato nel trattamento di diversi tumori solidi. In un primo studio che ha arruolato pazienti giovani affetti da LMA FLT3-ITD positiva, l'uso di sorafenib in combinazione con idarubicina e citarabina ad alte dosi era associato a frequenze di RC pari al 93%, con sopravvivenza ad 1 anno pari al 74%. Nel successivo studio, randomizzato di fase 1 noto come SORAML, 276 pazienti con LMA di nuova diagnosi e di età <60 anni venivano randomizzati per ricevere chemioterapia intensiva associata a sorafenib o placebo. Gli autori hanno riportato tassi di EFS a 3 anni significativamente più elevati per i pazienti che avevano ricevuto sorafenib (40% sorafenib *vs* 22% braccio placebo, p=0,013), a fronte di risultati sovrapponibili in termini di OS [15]. Nel contesto di approcci terapeutici a ridotta intensità, l'associazione di sorafenib e azacitidina si è dimostrata una valida alternativa terapeutica in pazienti con LMA FLT3-ITD positiva, sia come trattamento di prima linea (ORR pari al 78%, RC pari al 26%) che di fasi di malattia più avanzate quali situazioni di recidiva o resistenza (R/R) (ORR 46%, RC 16%) [16]. Sulla base di incoraggianti risultati generati nell'ambito di studi volti a valutare l'efficacia del sorafenib come terapia di mantenimento dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT), è stato attivato il *trial* clinico SORMAIN: è uno studio di fase III, in doppio cieco sorafenib *vs* placebo, che ha appunto inteso esplorare il ruolo del sorafenib come mantenimento dopo HSCT in pazienti affetti da LMA FLT3-ITD positiva. Con un follow-up mediano di 41,8 mesi, l'EFS mediana era di 30,9 mesi nel gruppo placebo, e non raggiunta nel gruppo sorafenib, traducendosi in una sopravvivenza libera da recidiva a 2 anni del 53% per il placebo contro l'85% per il gruppo sorafenib (p=0,0135) [17].

Midostaurina è anch'essa un inibitore polispecifico di tirosin chinasi di prima generazione. Weinberg *et al* sono stati i primi a dimostrare una sua attività inibitoria nei confronti di FLT3 mediante studi di inibizione farmacologica *in vitro* [18]. Alcuni studi di fase 1, che hanno impiegato midostaurina in monoterapia, ne hanno dimostrato l'effetto anti-leucemico pur in assenza di risposte midollari significative. Quest'osservazione ha costituito il background per implementare trial clinici che utilizzassero midostaurina in associazione a chemioterapia intensiva. In 40 pazienti giovani (<60 anni) con LMA, l'associazione di midostaurina con chemioterapia intensiva ha fornito un tasso cumulativo di RC pari all'80% [90% in pazienti FLT3-ITD positivi, 74% in pazienti FLT3-*wild type* (WT)], in assenza di un significativo impatto sulla OS. Nello studio randomizzato di fase 3 RATIFY, 717 pazienti affetti da LMA FLT3 positiva di nuova diagnosi (FLT3-ITD e FLT3-TKD) sono stati randomizzati a ricevere chemioterapia intensiva con o senza midostaurina. L'aggiunta di midostaurina (50 mg per via orale due volte al giorno) non ha determinato un tasso di RC più elevato ma ha migliorato significativamente i tassi di OS (probabilità a 4 anni, 51% *vs* 44%; p = 0,009) e di EFS (probabilità a 4 anni, 28% rispetto al 21%; p = 0,002). In generale, la midostaurina è stata ben tollerata e solo nel 3,1% dei pazienti gli eventi avversi hanno comportato l'interruzione del trattamento. Il vantaggio in termini di OS, che si era osservato nei pazienti che nel RATIFY avevano ricevuto midostaurina, è stato confermato in uno studio condotto da Lewis *et al*. Gli autori hanno dimostrato che i pazienti trattati con midostaurina avevano tassi di risposta profonda e di negativizzazione della malattia minima residua (MRD) significativamente più alti rispetto ai soggetti che avevano ricevuto placebo [19].

I risultati dello studio RATIFY hanno condotto nel 2017 all'approvazione di midostaurina in associazione a chemioterapia intensiva nel trattamento di prima linea della LMA con mutazione di FLT3. Un successivo studio di fase 1/2 ha esplorato la combinazione midostaurina + azacitidina in pazienti anziani con LMA non candidabili a chemioterapia intensiva. I pazienti erano arruolati indipendentemente dallo stato mutazionale di FLT3 e dall'aver precedentemente ricevuto inibitori di FLT3. I pazienti FLT3-ITD positivi, non precedentemente trattati, avevano un tasso di ORR del 33% con una durata della risposta significativamente più lunga rispetto ai pazienti FLT3-ITD positivi precedentemente esposti ad altri inibitori di FLT3 (31 *vs* 16 settimane, p=0,05) [20].

Quizartinib è un inibitore tirosin chinasico di seconda generazione altamente selettivo per FLT3 e poche altre chinasi come KIT. Gli effetti collaterali di quizartinib sono generalmente lievi ma il prolungamento dell'intervallo QT si verifica comunemente alle dosi più elevate del farmaco (90-135 mg/die). Effettivamente, utilizzando dosaggi inferiori a 90 mg/die (30-60 mg/die), sono stati osservati equivalenti tassi di risposta ma una minore incidenza di prolungamento dell'intervallo QT [21]. In un ampio studio di fase 2 che ha arruolato 333 pazienti affetti da LMA FLT3-ITD positiva R/R, quizartinib in monoterapia ha mostrato tassi di risposta cumulativa (RCc) pari al 50%, a fronte di RC con completo recupero ematologico del 3%. La profonda e persistente citopenia osservata in questo studio sembrerebbe attribuibile alla concomitante inibizione di c-KIT indotta da quizartinib, piuttosto che alla persistenza di malattia. Quizartinib ha anche mostrato attività in sottogruppi di pazienti affetti da LMA FLT3 WT, con tassi di RCc>30%. Sebbene per questi pazienti il tempo mediano di durata della risposta fosse inferiore a 3 mesi, il 35% dei soggetti più giovani rispondenti al trattamento è stato avviato con successo a HSCT [22]. Nello studio randomizzato di fase 3 QuANTUM-R, pazienti con LMA R/R e con mutazione di FLT-ITD venivano randomizzati fra quizartinib agente singolo o chemioterapia di salvataggio. La coorte di pazienti trattata con quizartinib aveva una OS mediana (6,2 *vs* 4,7 mesi; p=0,017) e un tasso di RCc (48% *vs* 27%, p=0,0001) significativamente superiori rispetto a quella di controllo [23]. L'analisi *ad interim* di uno studio di fase 1/2, che ha arruolato 52 pazienti con LMA con o senza mutazioni di FLT3 e che ha combinato quizartinib con azacitidina o citarabina a basso dosaggio, ha dimostrato un ORR del 67%. Le probabilità di sopravvivenza a 1 anno erano significativamente maggiori per il

braccio azacitidina rispetto al braccio citarabina a basso dosaggio (72% *vs* 32%, p=0,027) [24]. Infine, è in corso uno studio randomizzato quizartinib *vs* placebo (QuANTUM-FIRST) che indaga l'efficacia di quizartinib in combinazione con chemioterapia intensiva in pazienti con LMA di nuova diagnosi con mutazione di FLT3-ITD (NCT02668653).

Crenolanib è un inibitore delle tirosin chinasi di seconda generazione che inibisce le mutazioni FLT3-ITD e -TKD. Crenolanib è stato ben tollerato al dosaggio di 200 mg/m^2/die tre volte al giorno con eventi avversi principalmente gastrointestinali. In uno studio di fase 1 che ha arruolato pazienti affetti da LMA FLT3-ITD positiva, crenolanib in monoterapia ha ottenuto un ORR del 50% in 18 pazienti precedentemente non sottoposti a terapia con inibitori di FLT3 e del 31% in 36 pazienti precedentemente trattati con un inibitore di FLT3 (sorafenib o quizartinib) [25]. In pazienti giovani (<60 aa) affetti da LMA con mutazione di FLT3 trattati con crenolanib in combinazione con chemioterapia intensiva, il tasso complessivo di RCc è stato dell'83%, con una clearance della mutazione FLT3 nel 91% dei pazienti valutabili. Tra i pazienti che hanno ottenuto una RCc, il 94% ha ottenuto la negativizzazione della MRD dopo un solo ciclo di trattamento. L'OS dopo un *follow-up* mediano di 18 mesi è stata del 79% [26]. Sono attualmente in corso più studi di fase 3, inclusi quelli che confrontano *head-to-head* crenolanib e midostaurina in associazione a chemioterapia intensiva (NCT02298166, NCT03258931).

Gilteritinib è un altro potente e selettivo inibitore di FLT3-ITD (e in misura minore di FLT3-TKD) e di AXL. AXL è una tirosinchinasi che promuove la proliferazione e la resistenza all'apoptosi nelle cellule leucemiche. Assunto in monoterapia alla dose di 120 mg, glteritinib ha dimostrato un'incoraggiante RCc del 30% in 252 pazienti affetti da LMA R/R (con un tasso di RCc del 41% e di RC dell'11% in 169 pazienti con mutazioni di FLT3-ITD o FLT3-TKD) [27]. Gli eventi avversi non ematologici più comuni sono stati diarrea e ipertransaminasemia. I risultati dello studio di fase 3 ADMIRAL, che ha valutato l'efficacia di gilteritinib verso chemioterapia di salvataggio (tanto intensiva che a bassa intensità) in pazienti adulti con LMA R/R e con mutazioni di FLT3, hanno portato all'approvazione del farmaco da parte di FDA ed EMA. In questo studio, con un tempo mediano alla risposta di 4,6 mesi, il 21% dei pazienti ha ottenuto una RCc, con una durata mediana di risposta di 3,6 mesi [28]. Infine, gilteritinib è attualmente in corso di valutazione come terapia di prima linea in associazione a chemioterapia intensiva e come terapia di mantenimento dopo il trattamento di induzione/consolidamento in prima remissione (NCT02236013, NCT0292762). L'efficacia provata di questi farmaci, sia in monoterapia che in combinazione con la chemioterapia intensiva, sembrerebbe in grado di controbilanciare l'impatto negativo delle mutazioni di FLT3. Di conseguenza, l'approvazione di questi agenti sta aprendo la strada a nuovi approcci terapeutici potenzialmente in grado di migliorare la prognosi dei pazienti con LMA portatori di mutazioni FLT3, indipendentemente dall'intensità del trattamento somministrato.

Inibitori di IDH

Le isocitrato deidrogenasi IDH1 e IDH2 sono due enzimi ubiquitariamente espressi che hanno il compito di catalizzare il processo di decarbossilazione ossidativa dell'alfa-chetoglutarato (aKG) all'interno del citoplasma e dei mitocondri delle cellule. Mutazioni dei geni che codificano per questi 2 enzimi possono osservarsi in circa il 20% dei casi di LMA [29]. Queste mutazioni codificano proteine enzimatiche ad attività neomorfica che impediscono la funzione fisiologica dell'enzima e conferiscono quindi la capacità di catalizzare la conversione di aKG nell'oncometabolita R-2-idrossiglutarato; quest'ultimo è responsabile dell'alterata metilazione del DNA nelle porzioni istoniche delle cellule staminali ematopoietiche [30]. È importante sottolineare come queste due mutazioni siano mutualmente esclusive. Gli inibitori degli enzimi IDH mutanti sono in grado di diminuire il livello sierico totale di R-2-idrossiglutarato, riducendo quindi l'ipermetilazione aberrante delle porzioni istoniche del DNA e ripristinando quindi i fisiologici processi di differenziazione mieloidi [31].

Enasidenib è un inibitore bivalente delle mutazioni R140Q e R172K di IDH2, ed è stato il primo inibitore di questa classe ad essere sperimentato. Enasidenib si è dimostrato in grado di promuovere, *in vivo*, la differenziazione terminale di blasti mieloidi in neutrofili. In uno studio di fase 1/2, enasidenib al dosaggio di 100 mg al giorno per via orale ha indotto un ORR del 39% con una RCc del 30%, in pazienti affetti da LMA R/R IDH2 mutata. In questo studio, l'OS mediana è stata di 8,8 mesi per l'intera popolazione, e di 19,7 mesi per coloro che avevano ottenuto una RC. Il raggiungimento della RC si associava alla riduzione della carica allelica di IDH2. Gli eventi avversi più comunemente osservati sono stati iperbilirubinemia e trombocitopenia. Circa il 6% dei pazienti ha sviluppato una sindrome da differenziazione caratterizzata da febbre, dispnea da impegno polmonare e distress respiratorio, versamenti e leucocitosi [32]. L'osservazione che la concomitante presenza di mutazioni di NRAS, KRAS o FLT3 si associa ad una frequenza di risposta inferiore, fa ipotizzare che queste possano conferire resistenza all'enasidenib. Nel complesso i risultati di questo studio hanno condotto all'approvazione da parte di FDA di enasidenib in monoterapia per il trattamento della LMA R/R con mutazione di IDH2. In un successivo studio di fase 1, l'associazione di enasidenib con chemioterapia intensiva nel trattamento di prima linea di pazienti con LMA IDH2 mutata ha fornito risposte incoraggianti, con tassi di RCc del 72%. È da sottolineare che il 45% dei pazienti in RC otteneva anche una concomitante negativizzazione della MRD [33]. Il beneficio dell'aggiunta di enasidenib alla chemioterapia di induzione, consolidamento e mantenimento per i pazienti con LMA IDH2 mutata di nuova diagnosi è in fase di ulteriore valutazione in studi randomizzati di fase 3 (NCT03839771, NCT02577406).

Ivosidenib è un potente e selettivo inibitore della mutazione IDH1 il cui utilizzo, in studi di fase 1/2, ha fornito risultati promettenti. L'efficacia clinica di ivosidenib è stata inizialmente investigata in uno studio *dose-finding* di fase 1 che ha arruolato 258

pazienti con neoplasie ematologiche IDH1 mutate. Nella corte dei 125 pazienti affetti da LMA R/R sono stati riportati tassi di ORR del 41%, di RCc del 30% e di RC del 22% [34]. L'ottenimento di una RCc era associato ad un vantaggio di sopravvivenza, con una OS mediana di 18 mesi di chi rispondeva verso 8,8 mesi dei non rispondenti. Gli eventi avversi più frequentemente osservati nei pazienti trattati con ivosidenib sono stati leucocitosi, prolungamento dell'intervallo QTc e sindrome da differenziazione. I risultati di questo studio hanno portato all'approvazione da parte di FDA di ivosidenib in monoterapia per il trattamento della LMA R/R IDH1 mutata.

In un ulteriore studio che ha arruolato 34 pazienti con LMA non precedentemente trattata, ivosidenib in monoterapia ha mostrato un'incoraggiante ORR del 58%, con un tasso di RCc del 42%, traducendosi in una OS mediana di 12,6 mesi (*follow up* mediano: 23,1 mesi) [34]. Inoltre, nel 64% dei pazienti che hanno ottenuto la RCc l'analisi mutazionale in NGS ha dimostrato la *clearance* midollare della mutazione IDH1. Un successivo studio di fase 1 ha impiegato ivosidenib, come trattamento di prima linea, in combinazione con chemioterapia intensiva. Una RCc è stata ottenuta nell'80% dei pazienti reclutati. In particolare, l'88% dei pazienti che hanno raggiunto la RC è divenuto anche MRD negativo, con *clearance* della mutazione IDH1 dimostrata nel 41% di questi. Pertanto, l'uso di ivosidenib in combinazione con chemioterapia intensiva sembrerebbe in grado di garantire elevati tassi di risposta e di negativizzazione della MRD in pazienti affetti da LMA con mutazione di IDH1. Tale, preliminare, efficacia di ivosidenib in combinazione con chemioterapia è in fase di ulteriore valutazione in studi randomizzati di fase 3 (NCT03173248, NCT03839771). L'utilizzo di inibitori delle mutazioni di IDH1/2 potrebbe rappresentare una ulteriore *chance* di erogare una terapia mirata a ridotta intensità, senza rinunciare all'obiettivo di ottenere remissioni profonde e durature. In questo senso, è significativa l'esperienza presentata al congresso della Società Europea di Ematologia 2020 dalla dottoressa Di Nardo [35]. Centouno pazienti con età mediana di 75 anni sono stati randomizzati, nel contesto di un *trial* di fase 3, per ricevere azacitidina più enasidenib verso azacitidina da sola. Gli autori hanno riportato una frequenza di RC del 53% nel braccio di combinazione verso il 12% di quello azacitidina (p=0.00001). La durata mediana della OS era di 17,2 mesi per i pazienti nel braccio AZA+ENA verso 10.8 mesi nel braccio AZA.

Inibitori della via di Hedgehog

La via di segnalazione dei geni Hedgehog (HH)/*Glioma associated Oncogene Homolog* (GLI) svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale ed è di solito silenziata nei tessuti adulti [36]. Disfunzioni a carico di questa via di segnalazione sono state documentate in diverse fasi dell'oncogenesi, favorendo fenomeni quali instabilità genomica, invasività tumorale, infiammazione e meccanismi di evasione della sorveglianza immunitaria [37]. Diversi studi hanno documentato un ruolo cruciale delle alterazioni a carico della via di HH/GLI nei meccanismi di auto-rinnovamento ed elusione dell'apoptosi da parte delle cellule staminali leucemiche, in soggetti affetti da LMA. Questi risultati preclinici forniscono il razionale per combinare la chemioterapia intensiva con inibitori della via HH/GLI per il trattamento delle neoplasie mieloidi [38].

Glasdegib è un potente inibitore della via di segnalazione di HH/GLI, attraverso l'inibizione selettiva del recettore Smoothened (SMO). In studi *in vitro*, glasdegib in monoterapia o in combinazione con agenti chemioterapici ha determinato un arresto completo della crescita tumorale in linee cellulari di pazienti affetti da LMA. Questi risultati hanno rappresentato il razionale per un successivo studio di fase 1 di *dose-finding* che ha arruolato 42 pazienti affetti da neoplasie mieloidi (di cui 28 con LMA) resistenti o intolleranti a precedenti terapie. La dose massima tollerata di glasdegib è stata di 400 mg una volta al giorno, con eventi avversi prevalentemente non ematologici quali disgeusia, diminuzione dell'appetito, affaticamento e alopecia. Tra i 28 pazienti con LMA, in 16 (57%) si è ottenuta una RC, mentre 4 hanno ottenuto una remissione parziale, 4 una risposta minore e 7 hanno mantenuto una condizione di malattia stabile [39]. Nel successivo studio di fase 1/2 che includeva 42 pazienti con LMA e Sindrome Mielodisplastica ad alto rischio di nuova diagnosi, glasdegib è stato somministrato con citarabina a basse dosi, decitabina o chemioterapia intensiva. Le percentuali di RCc tra i diversi bracci di trattamento sono state rispettivamente dell'8%, 28% e 54%. La OS mediana era rispettivamente di 4,4, 11,7 e 34 mesi (10 pazienti nel braccio chemioterapia intensiva sono stati successivamente sottoposti a HSCT) [40]. Uno studio multicentrico di fase 2 ha arruolato 132 pazienti con diagnosi di LMA o Sindrome Mielodisplastica ad alto rischio, che venivano randomizzati per ricevere citarabina a basse dosi ± glasdegib (100 mg per via orale). L'analisi di efficacia ha mostrato un vantaggio della terapia di associazione (RC pari al 25%) rispetto al braccio di controllo (RC pari al 17%). Tale vantaggio si è tradotto in una OS mediana di 8,8 contro 4,9 mesi a favore di citarabina più glasdegib (p=0,0004) [41]. Sulla base di questo studio, glasdegib ha ricevuto l'approvazione da parte di FDA e di EMA, in combinazione con citarabina a basse dosi, per il trattamento di pazienti con LMA ritenuti non idonei alla chemioterapia intensiva. Attualmente, ulteriori studi stanno valutando i benefici di glasdegib in combinazione con chemioterapia intensiva o azacitidina (NCT03416179).

Inibitori di BCL2

Nelle sindromi mielodisplastiche e nelle LMA gli agenti citotossici convenzionali e i farmaci ipometilanti inducono apoptosi mediata dai mitocondri, una forma di morte cellulare programmata in risposta allo stress cellulare, regolato dalle proteine della famiglia BCL2 [42,43]. Le proteine della famiglia BCL2 sono caratterizzate dalla presenza di almeno 1 dei 4 domini omologhi BCL2 (BH1-4) e sono classificate in proteine pro e anti-apoptotiche. Le proteine pro-apoptotiche sono in grado di attivare direttamente le proteine effettrici o di antagonizzare le proteine anti-apoptotiche della famiglia BCL2, portando così all'attivazione della cascata

delle caspasi. Nelle LMA, è documentato che la sovraespressione delle proteine anti-apoptotiche della famiglia BCL2, come BCL2, BCL2L1 e MCL1, è significativamente associata con l'emergere di meccanismi di chemio-resistenza [44].

Venetoclax, un inibitore orale di BCL2, ha dimostrato attività di induzione dell'apoptosi in linee cellulari di LMA sia *in vitro* che nei modelli di xenotrapianto murini [45,46]. Venetoclax è stato studiato inizialmente in monoterapia in pazienti con LMA R/R, ottenendo tassi di ORR del 19% (15% RCc) [47]. La possibilità di sviluppare una sindrome da lisi tumorale, originariamente osservata nella leucemia linfatica cronica, ha suggerito di valutare l'effetto di venetoclax come singolo agente mediante l'erogazione di dosaggi crescenti, fino ad un massimo di 800 mg al giorno. Gli eventi avversi più comuni correlati all'uso del farmaco sono stati nausea, diarrea e neutropenia febbrile. Le risposte sono state solo di breve durata con un intervallo mediano libero da progressione di soli 2,5 mesi. In uno studio di fase 1/2b condotto su pazienti affetti da LMA ritenuti non idonei alla chemioterapia intensiva, venetoclax al dosaggio di 600 mg in combinazione con citarabina a basse dosi ha mostrato un tasso di RCc del 54%. A differenza di quanto osservato con venetoclax in monoterapia, la durata della risposta in combinazione con citarabina a basse dosi è stata significativamente più duratura (8,1 mesi) con una OS mediana di 10,1 mesi [48]. Venetoclax (400, 800 o 1200 mg) è stato successivamente testato in combinazione con farmaci ipometilanti (azacitidina o decitabina) in uno studio di *dose-finding* che arruolava pazienti anziani (> 65 anni) con LMA, ritenuti non eleggibili a chemioterapia intensiva. Il tasso di RCc, per l'intera popolazione e indipendentemente dal dosaggio, è stato del 67%. Nel braccio che ha erogato ipometilante più venetoclax al dosaggio di 400 mg, il tasso di RCc è stato del 73%. I pazienti con citogenetica a rischio sfavorevole e quelli di età superiore a 75 anni hanno mostrato tassi di RCc significativamente più elevati rispetto ai controlli storici, suggerendo un potenziale vantaggio dell'utilizzo della terapia di combinazione di venetoclax e farmaci ipometilanti in questi specifici sottogruppi di pazienti. Il tempo mediano di durata della risposta per i pazienti in RCc è stato di 11,3 mesi con un'OS mediana di 17,5 mesi [49]. Un successivo studio randomizzato ha valutato l'efficacia della combinazione venetoclax/farmaci ipometilanti rispetto a venetoclax/placebo in pazienti con LMA considerati non eleggibili a chemioterapia convenzionale per età (>75 anni) o comorbidità pre-esistenti. In questo studio, la sopravvivenza mediana è stata di 14,7 mesi nel gruppo venetoclax/farmaci ipometilanti rispetto ai 9,6 mesi del braccio di controllo ($p<0.001$), con tassi di remissione completa significativamente più elevati nel gruppo di pazienti trattati con venetoclax/ipometilanti (RC pari a 36,7% *vs* 17.9% del braccio di controllo; $p<0.001$). Tanto nello studio che ha combinato venetoclax e basse dosi di citarabina che in quelli che hanno combinato venetoclax con agenti ipometilanti non sono stati osservati casi di sindrome da lisi tumorale e la maggior parte delle risposte si è verificata entro due cicli [50]. Grazie ai risultati di questi studi, venetoclax ha ricevuto l'approvazione da parte di FDA come terapia di combinazione con citarabina a basse dosi o farmaci ipometilanti, ed è in corso di valutazione da parte di EMA come terapia in combinazione con farmaci ipometilanti.

Azacitidina orale nella terapia di mantenimento

La chemioterapia intensiva di induzione è in grado di garantire tassi di risposta completa che oscillano tra il 40 e il 60% a seconda degli studi. Tuttavia, a fronte di questi dati, la LMA è una patologia caratterizzata da elevato rischio di recidiva, soprattutto in quelle categorie di pazienti che per età o comorbidità concomitanti non possono essere sottoposti ad ulteriore chemioterapia, né tantomeno a procedure di trapianto di cellule staminali ematopoietiche [51]. Per queste tipologie di pazienti sono pertanto state valutate diverse strategie terapeutiche in grado di prolungare la durata della sopravvivenza libera da malattia. Tra i farmaci a ridotta intensità sperimentati in questa categoria di pazienti, la FDA ha approvato nel 2020 il farmaco CC-486, una formulazione orale di azacitidina, come terapia di mantenimento in pazienti adulti affetti da LMA in prima remissione dopo chemioterapia intensiva. L'approvazione ha fatto seguito all'analisi dei risultati dello studio di fase III QUAZAR AML-001. Questo studio randomizzato arruolava pazienti di età pari o superiore a 55 anni con diagnosi di LMA in RC o RC con incompleto recupero ematologico dopo chemioterapia intensiva e che non erano candidati a HSCT. L'obiettivo principale era la durata di OS. Lo studio ha arruolato 472 pazienti, randomizzati (con rapporto 1:1) a ricevere CC-486 al dosaggio di 300 mg (n=238) o placebo (n=234) una volta al giorno per 14 giorni ogni 28 giorni. La durata mediana del trattamento è stata di 12 cicli (range=1-82) per i pazienti nel gruppo CC-486, e 6 cicli nel gruppo placebo (range=1-76).

Il trattamento con CC-486 ha determinato un prolungamento della OS, statisticamente significativo, di circa 10 mesi rispetto al placebo. L'OS mediana dal momento della randomizzazione superava i 2 anni per i pazienti che trattati con CC-486 rispetto ai 14,8 mesi dei pazienti trattati a placebo ($p=0,0009$). Il trattamento è stato continuato fino a progressione della malattia o tossicità inaccettabile. In entrambi i gruppi gli eventi avversi più comunemente osservati sono stati di tipo gastrointestinale, prevalentemente di grado 1-2. Eventi avversi di grado 3-4 frequenti sono stati neutropenia (41% nel gruppo CC-486 e 24% nel gruppo placebo) e trombocitopenia (22% e 21%, rispettivamente); solo l'1% dei pazienti del gruppo CC-486 ha interrotto la terapia per eventi avversi ematologici [52].

Conclusioni

Nel corso degli anni si è verificato un sostanziale capovolgimento nel paradigma del trattamento dei tumori del sangue, con un passaggio graduale dai trattamenti definiti oggi convenzionali e diretti a specifiche patologie, ad approcci personalizzati.

Nel campo della LMA, la sempre più profonda comprensione dei meccanismi di leucemogenesi ha aperto la strada alla sperimentazione e successiva introduzione di nuove terapie mirate. Pertanto, dopo circa 4 decadi caratterizzate dalla pressoché totale assenza di nuovi farmaci, stiamo ora assistendo a una nuova era nel trattamento della LMA. In particolare, a partire dal 2017 un numero sempre crescente di nuove molecole ha ricevuto l'approvazione da parte dei principali enti regolatori, segnando il successo degli sforzi di ricerca clinica e biomedica degli ultimi decenni (Tabella1). Una delle sfide che affronteremo negli anni a venire consisterà nella corretta collocazione di queste nuove terapie, non solo come agenti singoli, ma soprattutto all'interno di schemi di combinazione.

Farmaco	Meccanismo d'azione	Indicazioni
CPX-351	Formulazione liposomiale di daunorubicina e citarabina	Pazienti con nuova diagnosi di t-AML o AML-MRC (FDA, EMA)
Gentuzumab Ozogamicin	Anticorpo anti-CD33 coniugato con calicheamicina	Terapia di combinazione con chemioterapia di induzione 3+7 in pazienti con età > 15 anni affetti da LMA di nuova diagnosi con espressione di CD33 (EMA)
		Terapia di combinazione con chemioterapia di induzione 3+7 (LMA di nuova diagnosi) o in monoterapia (LMA R/R) in pazienti adulti o pediatrici di età > 2 anni affetti da LMA con espressione di CD33 (FDA)
Midostaurina	Inibitore di FLT3	Terapia di combinazione con chemioterapia di induzione 3+7 e in monoterapia come trattamento di mantenimento in pazienti adulti affetti da LMA di nuova diagnosi con mutazione di FLT3 (FDA, EMA)
Gilteritinib	Inibitore di FLT3	In monoterapia nel trattamento di pazienti adulti affetti da LMA R/R con mutazione di FLT3 (FDA, EMA)
Ivosidenib	Inibitore di IDH1	In monoterapia nel trattamento di pazienti anziani o ritenuti a chemioterapia intensiva, affetti da LMA R/R con mutazione di IDH1 (FDA)
Enasidenib	Inibitore di IDH2	In monoterapia nel trattamento di pazienti adulti affetti da LMA R/R con mutazione di IDH2 (FDA)
Glasdegib	Inibitore di Smoothened (via di segnalazione di HH/GLI)	In combinazione con citarabina a basse dosi in pazienti di età >75 anni o ritenuti non idonei a chemioterapia intensiva, affetti da LMA di nuova diagnosi (FDA)
Venetoclax	Inibitore di BCL-2	In combinazione con ipometilanti (FDA, EMA) o citarabina a basse dosi (FDA) in pazienti di età >75 anni o ritenuti non idonei a chemioterapia intensiva, affetti da LMA di nuova diagnosi
CC-486	Ipometilazione DNA (formulazione orale di azacitidina)	Terapia di pazienti adulti con LMA in prima RC o prima RC con incompleto recupero ematologico dopo chemioterapia intensiva di induzione, e giudicati non idonei a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche

***Tabella 1** - Farmaci recentemente approvati da FDA o EMA per il trattamento della LMA e corrispettive indicazioni.*

Bibliografia

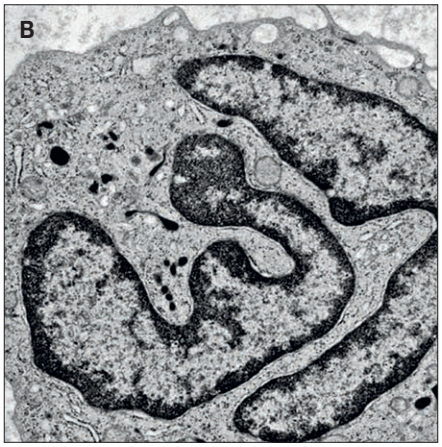
1. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2015;373(12):1136-52.
2. Perl AE. The role of targeted therapy in the management of patients with AML. Blood Adv. 2017;1(24):2281-94.
3. Feldman EJ, Lancet JE, Kolitz JE, et al. First-in-man study of CPX-351: a liposomal carrier containing cytarabine and daunorubicin in a fixed 5:1 molar ratio for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2011;29(8):979-85.
4. Lancet JE, Cortes JE, Hogge DE, et al. Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. Blood. 2014;123(21):3239-46.
5. Castaigne S, Pautas C, Terré C, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukemia (ALFA-0701): A randomised, open-label, phase 3 study. Lancet. 2012;379(9825):1508-16.
6. Godwin CD, Gale RP, Walter RB. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2017;31(9):1855-68.
7. Raza A, Jurcic JG, Roboz GJ, et al. Complete remissions observed in acute myeloid leukemia following prolonged exposure to lintuzumab: A phase 1 trial. Leuk

Lymphoma. 2009;50(8):1336-44.
8. Petersdorf SH, Kopecky KJ, Slovak M, et al. A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2013;121(24):4854-60.
9. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis of individual patient data from randomized controlled trials. Lancet Oncol. 2014;15(9):986-96.
10. Schlenk RF, Paschka P, Krzykalla J, et al. Gemtuzumab Ozogamicin in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML): Results from the Prospective Randomized AMLSG 09-09 Phase-3 Study. J Clin Oncol. 2020;38(6):623-32.
11. Takeshita A. Efficacy and resistance of gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. Int J Hematol. 2013;97(6):703-16.
12. Lyman SD, James L, Vanden Bos T, et al. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. Cell. 1993;75(6):1157-67.
13. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood. 2002;100(5):1532-42.
14. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. Blood Cancer J. 2021;11(2):41.
15. Rollig C, Serve H, Huttmann A, et al. Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukemia (SORAML): A multicentre, phase 2, randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2015;16(16):1691-9.
16. Ravandi F, Alattar ML, Grunwald MR, et al. Phase 2 study of azacitidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation. Blood. 2013;121(23):4655-4662.
17. Ohanian M, Garcia-Manero G, Levis M, et al. Sorafenib Combined with 5-azacitidine in Older Patients with Untreated FLT3-ITD Mutated Acute Myeloid Leukemia. Am J Hematol. 2018;93(9):1136-41.
18. Grunwald MR, Levis MJ. FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. Int J Hematol. 2013;97(6):683-694.
19. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. N Engl J Med. 2017;377(5):454-64.
20. Larson RA, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. An Analysis of Maintenance Therapy and Post-Midostaurin Outcomes in the International Prospective Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]) for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients with FLT3 Mutations. Blood. 2017;130(Suppl. 1):145.
21. Cortes JE, Kantarjian H, Foran JM, et al. Phase 1 study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status. J Clin Oncol. 2013;31(29):3681-7.
22. Cortes J, Perl AE, Dohner H, et al. Quizartinib, an FLT3 inhibitor, as monotherapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2018;19(7):889-903.
23. Cortes JE, Khaled SK, Martinelli G, et al. Efficacy and Safety of Single-Agent Quizartinib (Q), a Potent and Selective FLT3 Inhibitor (FLT3i), in Patients (pts) with FLT3-Internal Tandem Duplication (FLT3-ITD)-Mutated Relapsed/Refractory (R/R) Acute Myeloid Leukemia (AML) Enrolled in the Global, Phase 3, Randomized Controlled Quantum-R Trial. Blood. 2018;132(Suppl. 1):563.
24. Abdelall W, Kantarjian HM, Borthakur G, et al. The Combination of Quizartinib with Azacitidine or Low Dose Cytarabine Is Highly Active in Patients (Pts) with FLT3-ITD Mutated Myeloid Leukemias: Interim Report of a Phase I/II Trial. Blood. 2016;128(22):1642. doi.org/10.1182/blood.V128.22.1642.1642
25. Cortes JE, Kantarjian HM, Kadia TM, et al. Crenolanib besylate, a type I pan-FLT3 inhibitor, to demonstrate clinical activity in multiply relapsed FLT3-ITD and D835 AML. J Clin Oncol. 2016;34(15_suppl.):7008. doi: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.7008
26. Wang ES, Tallman MS, Stone RM, et al. Low Relapse Rate in Younger Patients ≤ 60 Years Old with Newly Diagnosed FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML) Treated with Crenolanib and Cytarabine/Anthracycline Chemotherapy. Blood. 2017;130(Suppl.1):566. doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.566.566
27. Perl AE, Altman JK, Cortes J, et al. Selective inhibition of FLT3 by gilteritinib in relapsed or refractory acute myeloid leukemia: a multicentre, first-in-human, open-label, phase 1-2 study. Lancet Oncol. 2017;18(8):1061-75.
28. Perl AE, Cortes JE, Strickland SA, et al. An open-label, randomized phase III study of gilteritinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3 mutation-positive acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2017;35(15_suppl.):TPS7067. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.TPS7067
29. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. Leukemia. 2017;31(2):272-81.
30. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. Cancer Cell. 2010;17(3):225-34.
31. McKerrell T, Park N, Moreno T, et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. Cell Rep. 2015;10(8):1239-45.
32. Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. Blood. 2019;133(7):676-87.
33. Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, et al. Ivosidenib or Enasidenib Combined with Induction and Consolidation Chemotherapy in Patients with Newly Diagnosed AML with an IDH1 or IDH2 Mutation Is Safe, Effective and Leads to MRD-Negative Complete Remissions. Blood. 2018;132(Suppl.1):560. doi: 10.1182/blood-2018-99-110449
34. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. N Engl J Med. 2018;378(25):2386-98.
35. DiNardo C, Schuh A., Stein E, et al. Enasidenib plus Azacitidine significantly improves complete remission and overall response rates versus Azacitidine monotherapy in mutant-IDH2 newly diagnosed acute myeloid leukemia (ND-AML). EHA 2020, 294959; S139.
36. Ok CY, Singh RR, Vega F. Aberrant activation of the hedgehog signaling pathway in malignant hematological neoplasms. Am J Pathol. 2012;180(1):2-11.
37. Armas-Lopez L, Zuniga J, Arrieta O, et al. The Hedgehog-GLI pathway in embryonic development and cancer: implications for pulmonary oncology therapy. Oncotarget. 2017;8(36):60684-703.
38. Aberger F, Hutterer E, Sternberg C, et al. Acute myeloid leukemia - strategies and challenges for targeting oncogenic Hedgehog/GLI signaling. Cell Commun Signal. 2017;15(1):8. doi: 10.1186/s12964-017-0163-4.
39. Martinelli G, Oehler VG, Papayannidis C, et al. Treatment with PF-04449913, an oral smoothened antagonist, in patients with myeloid malignancies: a phase 1 safety and pharmacokinetics study. Lancet Haematol. 2015;2:e339-46.
40. Savona MR, Pollyea DA, Stock W, et al. Phase 1b Study of Glasdegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Combination with Standard Chemotherapy in Patients with AML or High-Risk MDS. Clin Cancer Res. 2018;24(10):2294-303.
41. Cortes JE, Heidel FH, Hellmann A, et al. Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. Leukemia. 2019;33(2):379-89.
42. Vo TT, Ryan J, Carrasco R, et al A. Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML. Cell.

2012;151(2):344-55.
43. Fandy TE, Jiemjit A, Thakar M, et al. Decitabine induces delayed reactive oxygen species (ROS) accumulation in leukemia cells and induces the expression of ROS generating enzymes. Clin. Cancer Res. 2014;20(5):1249-58.
44. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(1):49-63.
45. Pan R, Ruvolo VR, Wei J, et al. Inhibition of Mcl-1 with the pan-Bcl-2 family inhibitor (–)BI97D6 overcomes ABT-737 resistance in acute myeloid leukemia. Blood. 2015;126(3):363-72.
46. Souers AJ, Leverson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. Nat Med. 2013;19(2):202-8.
47. Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, et al. Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase 2 Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. Cancer Discov. 2016;6(10):1106-17.
48. Wei AH, Strickland SA Jr, Hou JZ, et al. Venetoclax Combined with Low-Dose Cytarabine for Previously Untreated Patients with Acute Myeloid Leukemia: Results from a Phase Ib/II Study. J Clin Oncol. 2019;37(15):1277-84.
49. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2019;133(1):7-17.
50. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2020;383(7):617-29.
51. Palmieri R, Paterno G, De Bellis E, Therapeutic Choice in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Matter of Fitness. Cancers 2020;12(1):120.
52. Wei AH, Dohner H, Pocock C, et al. Oral Azacitidine Maintenance Therapy for Acute Myeloid Leukemia in First Remission. N Engl J Med. 2020;383(26):2526-37.



A: Leucemia Mieloide acuta M5: Mieloblasto al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



B: Leucemia Mieloide acuta M4: Monoblasto al ME a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Leucemia mieloide acuta, ipometilanti, inibitori di FLT3, CPX-351, genetoclax, glasdegib

Indirizzi per la corrispondenza

Adriano Venditti
Associate Professor of Hematology
Director of the Hematology Unit
Fondazione Policlinico "Tor Vergata"
Viale Oxford 81, 00133 Rome
Office: +39 06 20903226
Fax: +39 06 20903221/12
E-mail: adriano.venditti@uniroma2.it

Prospettive della terapia con cellule CAR-T



Piera Angelillo, Chiara Bonini, Matteo Carrabba, Monica Casucci, Sara Mastaglio

[1] *Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit, IRCCS San Raffaele Hospital, Milan, Italy.*
[2] *Vita-Salute San Raffaele University and Experimental Hematology Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, IRCCS San Raffaele Hospital, Milan, Italy.*
[3] *Innovative Immunotherapies Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, IRCCS San Raffaele Hospital, Milan, Italy*

Introduzione

Le CAR-T rappresentano l'ultima frontiera delle terapie cellulari e gemmano direttamente dall'esperienza nella terapia cellulare più utilizzata nella pratica clinica: il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) [1].

A più di 60 anni dal primo trapianto, con più di un milione di pazienti trattati con trapianto autologo o allogenico [2] prevalentemente per malattie neoplastiche, prima fra tutte la leucemia mieloide acuta, si è chiaramente dimostrato che la terapia cellulare è praticabile, è in grado di promuovere un effetto terapeutico spesso duraturo, a volte più complesso rispetto agli obiettivi che si era posti in partenza. Sviluppatosi con scopo rigenerativo, il trapianto allogenico (allo-HSCT) ha ben presto rivelato il suo valore immunoterapico [3]. I linfociti del donatore, trapiantati insieme alle cellule staminali, sono in grado di riconoscere cellule neoplastiche ed eliminarle attraverso l'effetto *Graft-versus-Leukemia* (GvL). Questo effetto benefico del trapianto ha però un prezzo in tossicità, la *Graft-versus-Host Disease* (GvHD), una grave complicanza dell'allo-HSCT scatenata dal riconoscimento di antigeni non-self da parte dei linfociti alloreattivi del donatore.

Gran parte delle strategie di isolamento, espansione e manipolazione genica dei linfociti T sono nate con l'obiettivo di sfruttare la GvL senza pagare il prezzo della GvHD. Molte delle competenze biotecnologiche che si sono sviluppate in questo percorso sono oggi al servizio delle CAR-T, farmaci cellulari ingegnerizzati geneticamente per riconoscere cellule tumorali. I risultati clinici ottenuti su pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (LLA) e linfomi non Hodgkin con CAR-T specifiche per l'antigene di differenziazione B CD19 hanno portato alla registrazione delle prime CAR-T. Vi è oggi grande aspettativa per lo sviluppo di CAR-T attive contro altre forme di tumore, inclusa la leucemia mieloide acuta, una patologia aggressiva e che richiede urgente sviluppo di nuove strategie terapeutiche. In questa review, si vogliono riassumere i passi principali ottenuti con le CAR-T ad oggi, e le sfide e le opportunità per lo sviluppo di CAR-T specifiche per la leucemia mieloide acuta (LMA).

Una nuova classe di farmaci

Dal principio di funzionamento delle CAR-T ai primi studi clinici

I recettori chimerici dell'antigene (CAR) sono molecole artificiali capaci di reindirizzare la specificità della cellula in cui vengono espressi contro un antigene bersaglio scelto *ad hoc*. Nella loro applicazione più comune, i CAR sono usati per generare linfociti T in grado di riconoscere e sviluppare una potente risposta immunitaria contro diversi tipi di cancro. Normalmente, lo sviluppo di risposte antitumorali spontanee ed efficaci è ostacolato dalla tolleranza verso il *self*, che riduce al minimo la frequenza di linfociti T ad alta affinità per antigeni tumorali. Ad oggi, grazie allo sviluppo di approcci di ingegneria genetica sempre più avanzati, è possibile reindirizzare la specificità di un linfocita T grazie al trasferimento di geni codificanti per T cell receptors (TCR) o CAR tumore-specifici.

Il principio su cui si basano i CAR è stato concepito quasi 30 anni fa, quando Zelig Eshhar ha pensato di combinare in un unico recettore i due rami dell'immunità adattativa, gli anticorpi e i linfociti T [4]. Questo è stato possibile fondendo la porzione variabile a singola catena (scFV) derivata da un anticorpo monoclonale, con la catena ζ del CD3 derivata dal complesso TCR/CD3. I linfociti T esprimenti i CAR (CAR-T) combinano quindi i vantaggi del riconoscimento anticorpale con quelli della terapia adottiva con linfociti T. Da una parte, come gli anticorpi, sono indipendenti dalla restrizione MHC e dal processamento dell'antigene e possono bersagliare anche zuccheri e lipidi, dall'altra, come i linfociti T naturali, sono capaci di attivare molteplici meccanismi effettori e di agire come farmaci vivi in grado di moltiplicarsi e generare memoria immunologica. Tuttavia, i CAR non possono riconoscere antigeni intracellulari e non possono contare su un sistema di attivazione finemente regolato come il TCR.

I primi studi clinici con CAR-T hanno prodotto risultati subottimali, in gran parte legati all'incapacità dei primi CAR di indurre i segnali intracellulari normalmente trasmessi dai TCR. La struttura originaria dei CAR è stata quindi ottimizzata nel corso degli anni, con l'aggiunta di domini co-stimolatori, singoli o in combina-

zione, che hanno permesso di migliorare l'espansione, la persistenza e il rilascio di citochine da parte delle CAR-T [5]. La scelta del co-stimolo non è irrilevante. Per esempio, il co-stimolo 41BB induce effettori T meno potenti ma caratterizzati da un fenotipo memoria più precoce e da un minore esaurimento, che li rende capaci di persistere più a lungo [6,7]. Diversamente, il co-stimolo CD28 induce linfociti T più litici e capaci di un'espansione più rapida e intensa, ma meno durevoli. D'altra parte, mentre il 41BB è più sensibile alla densità antigenica, il CD28 permette un migliore riconoscimento di antigeni espressi a bassi livelli [8,9]. Un'ulteriore evoluzione delle CAR-T è rappresentata dalle TrUCK [10], CAR-T ingegnerizzate per esprimere molecole addizionali, quali citochine, o recettori di *homing* che aumentino l'indice terapeutico delle cellule (Figura 1).

I geni codificanti i CAR possono essere veicolati nei linfociti T grazie all'uso di vettori retrovirali, lentivirali o sistemi non virali, ad esempio basati sull'utilizzo di trasposoni che, oltre ad essere molto più economici, portano con sé un minor rischio di mutagenesi inserzionale [11]. Più comunemente, questi vettori includono promotori costitutivi che inducono l'espressione del CAR in modo continuativo e ad alti livelli. Recentemente, grazie all'applicazione di tecnologie di *editing* genetico, sono stati dimostrati i vantaggi di inserire il CAR nel *locus* del TCR in assenza di un promotore esogeno [12]. Questo permette un'espressione del CAR più fisiologica, perché regolata dai sistemi di controllo dei TCR, che risulta in un minor esaurimento, migliore persistenza e aumentata efficacia antitumorale delle cellule CAR-T. Allo stesso tempo, l'eliminazione nucleasi-mediata del TCR endogeno permette di abbattere il rischio di sviluppare reazioni del trapianto contro l'ospite (GvHD) [13,14], particolarmente rilevanti nel caso in cui si vogliano usare linfociti T allogenici [15]. La possibilità di andare oltre il contesto T autologo permetterebbe di superare i difetti intrinseci di linfociti T ottenuti da pazienti oncologici spesso intensamente pre-trattati, di ridurre i costi e di espandere l'applicabilità della terapia CAR-T. Conseguentemente, ha recentemente avuto molto spazio la ricerca di sorgenti cellulari alternative a basso potenziale di GvHD, come le cellule *natural killer* (NK) [16]. Tuttavia, per generare prodotti *off-the-shelf* è anche indispensabile limitare il rigetto delle cellule CAR-T, un problema cui si sta cercando di porre rimedio con immunosoppressione prolungata o delezione del gene della beta2 microglobulina [17].

Le prime evidenze cliniche di efficacia di CAR-T specifiche per il CD19 (CD19-CAR-T) in pazienti con leucemie B e linfomi refrattari ad altri tipi di trattamento datano circa 10 anni [18-22]. Questi risultati sorprendenti hanno alimentato la ricerca nel settore, che ha portato alla recente approvazione da parte degli enti regolatori americani ed europei dei primi prodotti CD19-CAR-T per il trattamento di alcuni tipi di linfomi non-Hodgkin e della LLA. L'esperienza clinica con le CD19-CAR-T ha permesso di identificare nella perdita dell'antigene e nella poca funzionalità del prodotto cellulare *in vivo* le due principali cause di fallimento terapeutico [23]. Questo ha portato ad intensificare gli sforzi per sviluppare approcci che bersaglino più antigeni contemporaneamente e/o migliorino la fitness delle CAR-T, agendo sul processo di produzione, sugli schemi di linfodeplezione o adottando approcci di ingegneria genetica innovativa. I *trial* clinici con le

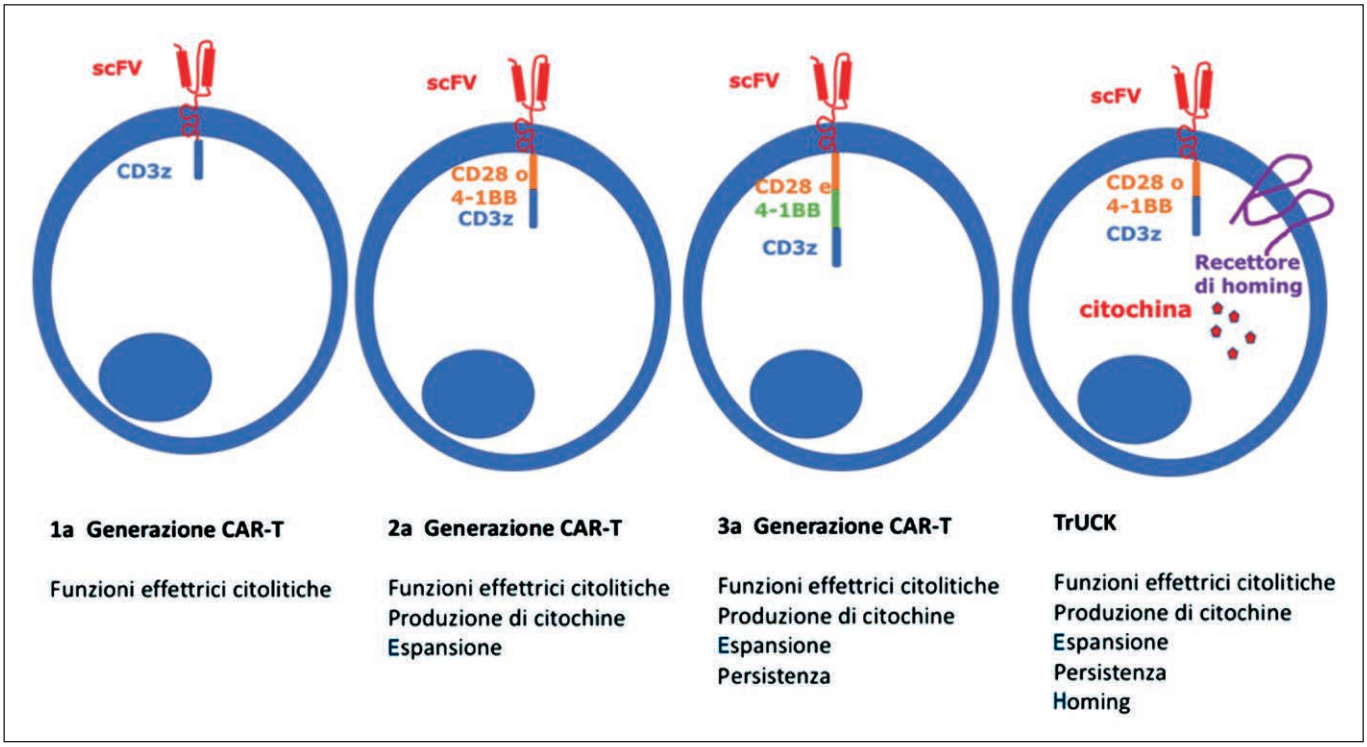


Figura 1 *- Le generazioni di cellule CAR-T e le loro caratteristiche*

CD19-CAR-T hanno anche evidenziato lo sviluppo di importanti tossicità associate all'effetto antitumorale, come la tossicità *on target off tumor*, la sindrome da rilascio di citochine (CRS) e la neurotossicità [24]. La prima, attesa, è dovuta al danneggiamento di cellule e tessuti sani che esprimono l'antigene bersaglio. Questa tossicità nel caso del CD19-CAR si traduce nell'aplasia delle cellule B, una condizione gestibile tramite terapia sostitutiva con immunoglobuline, ma risulta molto più pericolosa nel caso di antigeni espressi in tessuti vitali. La CRS e neurotossicità non erano state predette dagli studi preclinici e la loro patogenesi si sta delineando solo recentemente grazie all'esperienza sui pazienti [25-28] e allo sviluppo di modelli animali avanzati [29,30]. Entrambe sono scatenate dall'attivazione delle CAR-T ma propagate dalle cellule del compartimento mieloide, che rilasciano in circolo grandi quantità di mediatori solubili di infiammazione, come l'IL-1 e l'IL-6. Entrambe sono state poi associate ad una massiccia attivazione endoteliale. In aggiunta, è recentemente emerso come la neurotossicità da CD19-CAR sia legata all'espressione del CD19 sui periciti cerebrali, che la rende almeno in parte una tossicità *on target off tumor* [31]. Un'intensa attività preclinica è tuttora in corso per aumentare la sicurezza della terapia CAR-T, tramite l'uso di geni suicida, anticorpi a bassa affinità o costrutti CAR che permettano l'attivazione del linfocita solo in risposta al tumore o ad un farmaco specifico [32].

Tuttavia, il successo delle terapie CAR-T è ad oggi limitato ad alcuni tipi di tumori delle cellule B e una delle maggiori sfide del settore è quello di traslare questi risultati positivi in altre indicazioni terapeutiche, come i tumori solidi o le leucemie mieloidi.

Dai *trials* clinici alle attuali indicazioni cliniche

Il campo della ricerca riguardante la terapia cellulare e genica negli Stati Uniti continua ad espandersi ad un ritmo veloce, con una serie di prodotti che avanzano nelle varie fasi dello sviluppo clinico. Esistono diversi prodotti cellulari che hanno ottenuto l'approvazione da parte delle principali autorità regolatorie e sono attualmente disponibili sul mercato per il trattamento di alcuni disordini oncoematologici. Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi *trials* clinici internazionali randomizzati che hanno fornito dati di efficacia e tossicità a supporto delle indicazioni per cui la terapia cellulare è attualmente disponibile in campo oncoematologico: alcuni tipi di linfomi non Hodgkin a cellule B, il mieloma multiplo, la leucemia linfoblastica acuta pediatrica e del giovane adulto. È importante però non dimenticare che il numero di pazienti che hanno effettivamente accesso al trattamento è limitato da criteri di inclusione ed esclusione al trattamento che vengono definiti dai singoli enti regolatori in maniera indipendente. È anche questa la ragione per cui le indicazioni e l'eleggibilità a terapia con CAR-T sono diverse in diversi paesi: al fine di avere una panoramica più ampia di seguito verranno riportate le indicazioni approvate dalla *Food and Drug Administration* (FDA) negli Stati Uniti, in essere al momento della pubblicazione di questo documento (Tabella 1).

Il 30 agosto 2017, FDA ha approvato tisagenlecleucel (Kymriah, Novartis) il primo prodotto cellulare sviluppato per il trattamento di alcuni pazienti pediatrici e giovani adulti fino a 25 anni di età affetti da LLA-B refrattaria o in seconda o successive ricadute. La sicurezza e l'efficacia di Kymriah nella LLA sono state valutate in uno studio multicentrico a braccio singolo (ELIANA, NCT02228096) [33]. In totale 63 pazienti (età media 11 anni) sono stati valutati per gli *outcome* di efficacia e 52 (83%) hanno raggiunto una risposta completa (RC) documentata dalla negatività alla valutazione citofluorimetrica della malattia minima residua. Al 13 aprile 2018 erano stati sottoposti a *screening* 113 pazienti, di questi 97 sono stati arruolati, ci sono stati 8 fallimenti del processo produttivo (8%), e 10 pazienti (10%) non sono stati infusi a causa di morte o eventi avversi (EA). Settantanove pazienti hanno ricevuto una singola infusione di tisagenlecleucel. Con un *follow-up* mediano ≥3 mesi, 65 pazienti hanno ottenuto una RC. Alla pubblicazione dei dati la durata della risposta mediana (DOR) non era stata raggiunta (DOR massima pari a 29 mesi); 19

Prodotto	Nome Commerciale	Indicazione	ClinicalTrials.gov Identifier	Sigla	Autore
Tisagenlecleucel	Kymriah, Novartis	LAL	NCT02228096	ELIANA	Maude, NEJM 2018 [33]
Axicabtagene ciloleucel	Yescarta, Kite Pharma/Gilead Inc.	DLBCL/PMBCL/DHL	NCT02348216	ZUMA-1	Neelapu, NEJM 2017 [34]
Tisagenlecleucel	Kymriah, Novartis	DLBCL	NCT02445248	JULIET	Schuster, NEJM 2019 [35]
Lisocabtagene maraleucel	Breyanzi, Juno Therapeutics, Inc	DLBCL/HGBCL/ PMBCL/FL3B	NCT02631044	TRANSCEND-NHL-001	Abramson, Lancet 2020 [36]

LAL: leucemia acuta linfoblastica; **DLBCL**: linfoma diffuso a grandi cellule B; **PMBCL**: linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino; **DHL**: linfoma a cellule B ad alto grado con riarrangiamenti in MYC e BCL2 e/o BCL6; **HGBCL**: linfoma a cellule B ad alto grado, **FL3B**: linfoma follicolare grado 3B; **MCL**: linfoma a cellule mantellari

Tabella 1 *- Indicazioni cliniche per CAR-T (FDA) e studi clinici che hanno portato all'approvazione.*

pazienti hanno avuto una ricaduta prima e sono stati sottoposti ad un'ulteriore terapia antitumorale; 8 pazienti sono stati sottoposti a trapianto in corso di remissione. La probabilità di sopravvivenza libera da ricadute a 18 mesi era del 66%, la sopravvivenza globale (OS) mediana non è stata raggiunta con una OS a 18 mesi del 70%. La persistenza di tisagenlecleucel insieme all'aplasia delle cellule B nel sangue periferico è stata documentata fino ad oltre 2,5 anni in alcuni pazienti che hanno ottenuto una risposta.

Ad ottobre 2017, sulla scorta dei dati dello studio registrativo ZUMA-1, axicabtagene ciloleucel (Yescarta, Kite Pharma, Inc.) ha ottenuto l'approvazione di FDA per il trattamento di pazienti adulti con linfoma a grandi cellule B recidivato o refrattario dopo due o più linee di terapia sistemica [34]. Gli istotipi inclusi nell'indicazione sono: il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) non altrimenti specificato, il linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino (PMBCL), il linfoma a grandi cellule B con riarrangiamento di MYC e BCL2 e/o BCL6 e il DLBCL evoluto da linfoma follicolare. I dati di efficacia e sicurezza si basano su uno studio di fase 1/2, in aperto, multicentrico a braccio singolo (ZUMA-1) che ha valutato l'effetto di una singola infusione di axicabtagene ciloleucel, preceduta da chemioterapia di condizionamento in 108 pazienti adulti con LNH B aggressivo recidivato o refrattario. Nella porzione di fase 2 dello studio, 101 dei 111 pazienti sottoposti a leucaferesi hanno ricevuto axicabtagene ciloleucel. La maggior parte dei pazienti trattati (76%) aveva una diagnosi di DLBCL, il 16% di linfoma follicolare trasformato (FL) e l'8% aveva un PMBCL. Il numero mediano di terapie precedenti era 3, il 77% dei pazienti aveva una malattia refrattaria e il 21% era recidivato entro 1 anno da trapianto di cellule staminali autologhe. Nell'analisi *intention-to-treat*, il tasso globale di risposta (ORR) è stato del 72%, con una percentuale di RC del 51% e un tempo mediano alla risposta di 0,9 mesi. Con un *follow-up* stimato di 7,9 mesi, la DOR mediana stimata tra tutti i *responder* era di 9,2 mesi. Come atteso la durata della risposta era più lunga nei pazienti che avevano ottenuto una risposta più profonda. Tra i pazienti che hanno raggiunto la RC, la DOR mediana stimata non era stata raggiunta, mentre la DOR mediana stimata tra i pazienti in PR era di 2,1 mesi.

A poca distanza di tempo dall'immissione sul mercato di Yescarta, nel maggio 2018, Kymriah ha ricevuto la seconda approvazione da parte di FDA per il trattamento del DLBCL recidivato refrattario (R/R) a due precedenti linee di trattamento, con esclusione del DLBCL R/R primitivo del sistema nervoso centrale (SNC). L'indicazione di Kymriah per il trattamento del DLBCL R/R deriva dai risultati del trial Juliet [35], uno studio multicentrico di fase 2 a braccio singolo, in aperto, per pazienti adulti con DLBCL recidivato o refrattario dopo ≥2 precedenti linee di chemioterapia (includenti rituximab ed antracicline) e non candidabili a trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche. 93 pazienti arruolati nello studio sono stati valutati per efficacia dopo terapia linfodepletiva ed una singola infusione di Kymriah; con un *follow-up* mediano dall'infusione di 14 mesi, è stato osservato un tasso di risposta globale del 52%, con il 40% di RC. A 12 mesi dalla documentazione della risposta iniziale, il tasso di sopravvivenza libera da ricadute è stato stimato al 65% (79% tra i pazienti con una risposta completa).

Il 5 febbraio 2021, FDA ha approvato lisocabtagene maraleucel (Breyanzi, Juno Therapeutics, Inc.) per il trattamento di pazienti adulti con linfoma a grandi cellule B recidivato o refrattario (R/R) dopo due o più linee di terapia, compreso il DLBCL non altrimenti specificato (incluso DLBCL trasformato da linfoma indolente), linfoma a cellule B di alto grado, linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino e linfoma follicolare di grado 3B. L'efficacia del prodotto è stata valutata nello studio registrativo TRANSCEND [36], uno studio multicentrico a braccio singolo, in aperto, che ha valutato lisocabtagene maraleucel, preceduto da chemioterapia linfodepletiva, in adulti con linfoma R/R a grandi cellule B dopo almeno due linee di terapia. Dei 192 pazienti valutabili per la risposta, il tasso di risposta globale è stato del 73% con un tasso di RC del 54%. Dei 104 pazienti che hanno raggiunto la RC, il 65% ha avuto una remissione della durata di almeno 6 mesi e il 62% ha avuto una remissione della durata di almeno 9 mesi. La DOR non è stata raggiunta nel sottogruppo di pazienti che hanno raggiunto una RC. La DOR mediana stimata tra i pazienti con risposta parziale è stata di 1,4 mesi.

L'approvazione del primo prodotto cellulare registrato per il trattamento del linfoma mantellare (MCL) è arrivata invece il 24 luglio 2020, quando FDA ha approvato brexucabtagene autoleucel (Tecartus, Gilead) con procedura accelerata, per il trattamento di pazienti adulti che non hanno risposto o che hanno recidivato in seguito ad altri tipi di trattamento. Tecartus è stato approvato sulla base dei risultati dello studio multicentrico ZUMA-2, condotto su 60 adulti con MCL refrattario o recidivante [37]. Sono stati arruolati 74 pazienti in totale, 60 sono stati valutati per efficacia. La ORR è stata del 93%, il 67% dei pazienti ha ottenuto una risposta completa. In un'analisi *intention-to-treat* che ha coinvolto tutti i 74 pazienti, 85% ha avuto una risposta obiettiva; 59% ha avuto una risposta completa. Ad un *follow-up* mediano di 12,3 mesi, il 57% dei 60 pazienti nell'analisi di efficacia primaria era in remissione. A 12 mesi, la sopravvivenza libera da progressione e la sopravvivenza globale stimate erano rispettivamente del 61% e dell'83%.

In Italia, le indicazioni onco-ematologiche attualmente approvate da AIFA per i prodotti di terapia cellulare disponibili alla data di pubblicazione del presente documento sono:

Yescarta (axicabtagene ciloleucel) è indicato per il trattamento di:

1. Pazienti adulti con DLBCL
2. Pazienti adulti con linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B (PMBCL)

refrattari o recidivati, dopo due o più linee di terapia sistemica.

Kymriah (tisagenlecleucel) è indicato per il trattamento di:

1. Pazienti pediatrici e giovani adulti fino a 25 anni di età con LLA a cellule B refrattaria, in recidiva post-trapianto o in seconda o ulteriore recidiva
2. Pazienti adulti con DLBCL in recidiva o refrattario dopo due o più linee di terapia sistemica.

Gestione delle principali tossicità

Il profilo di tossicità osservata, con alcune differenze legate all'incidenza dei diversi eventi avversi, è condiviso dai diversi prodotti cellulari. I dati disponibili derivano prevalentemente dagli studi clinici di fase 1-2 condotti con cellule CAR-T anti-CD19; iniziano ad essere disponibili inoltre i dati derivanti dal trattamento dei pazienti in pratica clinica. Il profilo di tossicità osservato sembrerebbe replicare quello osservato nei protocolli clinici. Le più frequenti tossicità acute attese dopo la somministrazione di CAR-T includono, ma non sono limitate a: sindrome da rilascio citochinico (CRS); neurotossicità (inclusa CAR *Related Encephalopathy Syndrome* - CRES); sindrome da attivazione macrofagica (MAS); sindrome da lisi tumorale (TLS); coagulazione intravascolare disseminata (CID); reazioni infusionali e anafilassi [24]; infezioni opportunistiche, spesso legate a citopenia prolungata, ipogammaglobulinemia/aplasia B cellulare; GvHD (in caso di utilizzo di CAR-T allogeniche).

Tra le condizioni sopra elencate, particolare interesse è rivolto alla diagnosi ed al trattamento di CRS e CRES. Queste due condizioni rappresentano una forma di tossicità specifica del trattamento con cellule immuno-effettrici e possono manifestarsi con diversa gravità, fino a richiedere il ricovero del paziente in unità di terapia intensiva (TI), necessità di dialisi e/o la necessità di ventilazione meccanica.

Il fenomeno alla base della CRS è l'attivazione immunitaria che fa seguito all'infusione di cellule immuno-effettrici. Dopo infusione di CAR-T, la CRS è la tossicità più comunemente osservata. Le citochine responsabili di questa sindrome possono essere prodotte direttamente dalle CAR-T o da macrofagi in risposta a mediatori prodotti dalle CAR-T. È stata ipotizzata una correlazione tra una maggiore espansione in vivo di cellule CAR-T e più elevati valori di picco di IL-6, ferritina e PCR, così come più elevati carichi di malattia al momento dell'infusione sono stati correlati ad una maggiore incidenza di CRS di grado severo. La CRS osservata dopo infusione di CAR-T anti CD19 può essere caratterizzata da febbre alta, malessere, mialgie, artralgie, anoressia, stanchezza, nausea, mal di testa, dispnea, tachi-aritmie, brividi, ipotensione, shock, ipossia, alterazione della funzione renale, insufficienza epatica, coagulazione intravascolare disseminata e anormalie neurologiche (i.e. alterazione dello stato mentale, confusione, afasia, alterato livello di coscienza, mioclono e convulsioni o attività simil-convulsiva). I sintomi di CRS compaiono in genere entro 14 giorni dalla somministrazione di cellule CAR-T (ma possono in casi più rari comparire anche più tardivamente) e possono essere da lievi a molto severi, in qualche caso letali [18-22]. La CRS può iniziare già nelle prime 24 ore successive all'infusione e può progredire rapidamente. Uno stretto monitoraggio dei parametri vitali e dei segni e sintomi sospetti per CRS è fondamentale. Lo sviluppo di febbre alta (> 39°C) e/o sintomi suggestivi (i.e.: ipotensione, dispnea, tachicardia, brividi, artralgie, alterazione della funzione d'organo o sintomi neurologici) entro le 96 ore successive all'infusione delle cellule può essere indicativo di una rapida e precoce espansione delle cellule con conseguente aumentato rischio di sviluppare CRS e può richiedere un trattamento immediato (con Tocilizumab e/o steroidi, vedi oltre). È importante escludere una causa infettiva della febbre prima di iniziare la terapia della CRS. La CRS una volta sospettata deve essere graduata al fine di impostare, ove indicato, il trattamento adeguato. Sono state proposte diverse piattaforme per il *grading* della CRS, una delle più utilizzate è quella proposta dall'*American Society for Transplantation and Cellular Therapy* (ASTCT) [38]: in accordo con questa linea guida si definisce severa ogni CRS di grado pari o superiore a 3. I soggetti con CRS di grado 1 o 2 possono essere gestiti con la sola terapia di supporto, i soggetti che sviluppano febbre (TC ≥ 38°C), ipotensione o desaturazione devono essere valutati anche per escludere segni e sintomi di riferimento infettivo ed eventualmente trattati con antibiotici, supporto idroelettrolitico e terapia di supporto come da buona pratica clinica e procedure istituzionali. Nei soggetti con CRS G >2 (e nei soggetti con CRS G2 e fattori di rischio), è necessario impostare un trattamento specifico per la CRS. In caso CRS di grado ≥ 2 devono essere considerati:

- Tocilizumab 8 mg/Kg ev, ripetibile dopo 6 ore in assenza di miglioramento;

oppure

- Desametasone/Metilprednisone, con diverse posologie.

Tocilizumab è un anticorpo monoclonale specifico per il recettore di IL-6, registrato per patologie autoimmuni ma attualmente utilizzato anche nella terapia delle manifestazioni cliniche della CRS. IL-6 è una citochina coinvolta nella risposta di fase acuta, i cui livelli plasmatici sono aumentati in corso di CRS. Questo costituisce il razionale alla base dell'uso di Tocilizumab nel trattamento della CRS [39]. La dose raccomandata di Tocilizumab per il trattamento della CRS è di 8 mg/Kg, per un massimo di 800 mg per singola dose.

La terapia con CAR-T, sia in presenza che in assenza di CRS, può essere associata a CRES, che attualmente si ritiene correlata agli elevati livelli di citochine piuttosto che ad un effetto diretto delle CAR-T a livello del SNC. Le manifestazioni possono includere, ma non sono limitate a: confusione, delirio, afasia espressiva, ottundimento, mioclono, attività simil-convulsiva e attività epilettica con alterazioni all'elettroencefalogramma (EEG) [40]. In taluni casi, i sintomi neurologici possono essere i primi sintomi di una CRS; in altri, queste manifestazioni si verificano indipendentemente dalla CRS o a seguito di questa. La tossicità neurologica è stata reversibile nella maggior parte dei casi finora osservati in corso di trial con CAR-T anti CD19. Sulla base di queste osservazioni, la valutazione giornaliera dell'esame neurologico è ritenuta essenziale in corso di trattamento con CAR-T. Per i pazienti ad alto rischio di sviluppo di CRS (ovvero i soggetti con evidenza morfologica di malattia al momento dell'infusione e i soggetti con insorgenza precoce di febbre ≥ 38°C e sintomi di CRS entro 96 ore dall'infusione) e comunque per quelli con CRS >2 va prevista una valutazione al mattino ed una nel tardo pomeriggio. In genere, i sintomi neurologici hanno inizio da 5 a 7 giorni dopo l'infusione di CAR-T; una volta sospettata, anche la CRES va graduata utilizzando uno score specifico (Tabella 2).

CRS§	Manifestazioni cliniche	Trattamento&
Grado 1	Temperatura ≥ 38°C, NO ipotensione, NO ipossia	Antipiretici, fluidi endovena, antibiotico ad ampio spettro se infezione non escludibile
Grado 2*	Temperatura ≥ 38°C + ipotensione (no necessità di vasopressori) ± ipossia (O^2 terapia massimo 6 l/min)	Tocilizumab 8 mg/kg (max 800 mg) ogni 8 ore (max 4 dosi)
Grado 3*	Temperatura ≥ 38°C + ipotensione con necessità di vasopressori ± ipossia (O^2 terapia > 6 l/min)	Tocilizumab 8 mg/kg (max 800 mg) ogni 8 ore (max 4 dosi) + Desametasone 10 mg/kg ogni 6 ore per 1-3 gg
Grado 4*	Temperatura ≥ 38°C + ipotensione con necessità di più di un vasopressore (esclusa vasopressina) ± ipossia con necessità di pressione positiva	Tocilizumab 8 mg/kg (max 800 mg) ogni 8 ore (max 4 dosi) + Desametasone 20 mg/kg ogni 6 ore per 3 gg. Se non miglioramento: passaggio a metilprednisolone 1 g al giorno in bolo per 1-3 gg
CRES	**Manifestazioni cliniche**	**Trattamento&**
Grado 1	Alterato stato di coscienza (pz vigile spontaneamente) Score ICEç 7-9	Monitoraggio stretto^, attenzione alla terapia/nutrizione orale e protezione delle vie aeree
Grado 2*	Alterato stato di coscienza, limitante attività giornaliere di routine (pz risvegliabile alla chiamata) Score ICE 3-6	Desametasone 10 mg/kg ogni 6 ore per 1-3 gg$
Grado 3*	Alterato stato di coscienza con pz risvegliabile allo stimolo doloroso. Crisi epilettiche focali o generalizzate che regrediscono con terapia specifica Edema cerebrale focale/locale Score ICE 0-2	Desametasone 20 mg/kg ogni 6 ore per 1-3 gg$ Terapia anti epilettica se crisi Terapia iperosmolare se edema cerebrale
Grado 4*	Stupor/coma, pz non risvegliabile Crisi epilettiche subentranti Deficit focale severo (emi/paraparesi) Edema cerebrale diffuso Atteggiamento decerebrato o decorticato Paralisi VI nervo cranico Papilledema Triade di Cushing° Score ICE non valutabile	Metilprednisolone 1 g al giorno in bolo per 1-3 gg $ Terapia anti epilettica se crisi Terapia iperosmolare se edema cerebrale Acetazolamide se papilledema

ICRS: cytokine release syndrome; CRES: CAR related encephalopathy syndrome.

§ se i sintomi persistono per 24-48h, il grado di CRS incrementa al livello successivo anche in assenza di peggioramento clinico.

& Le indicazioni al trattamento di seguito elencate sono quelle tratte dale ultime raccomandazioni EBMT 66; i dosaggi e gli scali della terapia steroidea sono indicativi, e soggetti a variazioni a seconda della pratica clinica.

* allertare rianimatori e terapia intensiva.

Ç ICE: immune Effector Cell-Associated Encephalopathy (ICE). Score con un massimo di 10 punti: nozione di anno, mese, città, ospedale (4 punti); capacità di nominare tre oggetti (3 punti); capacità di eseguire semplici comandi (1 punto); capacità di scrivere una frase standard (1 punto); capacità di contare a ritroso da 100 a 10 di decina in decina (1 punto) [38].

° aumento della pressione intracranica, ipertensione, bradicardia

^ valutazione specialistica neurologica, risonanza magnetica nucleare dell'encefalo, puntura lombare con se possibile misurazione della pressione di apertura, elettroencefalogramma, esame del fundus oculi

$ se la CRES è associata a CRS, considerare sempre Tocilizumab in associazione allo steroide; Tocilizumab NON è invece indicato nella CRES isolata.

***Tabella 2** - Grading e gestione clinica delle tossicità da CAR-T.*

CAR-T per la leucemia mieloide acuta

Necessità di cura e sfide per lo sviluppo di CAR-T

Ottenere la guarigione dei pazienti affetti da LMA rimane un problema della medicina moderna. La percentuale di sopravvivenza di questi malati a 5 anni è del 30% [41].

La immunoterapia adottiva ed in particolare l'allo-HSCT sono oggi considerati un presidio essenziale per potere guarire molte forme di LMA. Essi fanno parte della terapia di prima linea in molti dei casi che vengono trattati con intento curativo [41,42]. L'effetto terapeutico dell'allo-HSCT si basa sull'azione del trapianto contro la leucemia, il cosiddetto effetto GvL che si verifica quando le cellule T del donatore riconoscono gli antigeni estranei sui tessuti ematopoietici dell'ospite e successivamente mediano l'eliminazione del tumore [43]. Il fenomeno della GvL è considerato una delle principali dimostrazioni della capacità dei linfociti T di eliminare le neoplasie ed in particolare i tumori di origine mieloide. Tuttavia, la GvL si accompagna al rischio di aggressione da parte dei linfociti T del donatore anche dei tessuti sani dell'ospite, il cosiddetto fenomeno di GvHD, e nonostante circa 20.000 persone siano sottoposte ad allo-HSCT ogni anno nei soli Stati Uniti, la GvHD e la recidiva di malattia dopo il trapianto mantengono un impatto negativo sulle reali possibilità di sopravvivenza a lungo termine, nonché sulla qualità della vita. Tra le principali cause della difficoltà che incontriamo nel curare in modo definitivo la LMA, possiamo elencare: la elevata eterogeneità inter ed intrapaziente delle cellule che la compongono, la mancanza di bersagli stabili e riproducibili per le terapie mirate, la capacità delle cellule neoplastiche di adattarsi sia alla pressione selettiva imposta dalle chemioterapie che a quella - immunomediata - imposta dal trapianto allogenico [44-48]. In patologie acute legate ad una alterazione di un precursore emopoietico orientato in senso linfoide anziché mieloide, le CAR-T si sono rilevate capaci di ottenere remissioni complete durature anche in forme ricadute/refrattarie ai trattamenti convenzionali incluso il trapianto allogenico [21,22,33,39,49]. Questo risultato è stato ottenuto orientando l'attività litica di queste cellule verso un antigene dei linfociti B altamente espresso su gran parte della malattia, sebbene non essenziale alla sopravvivenza della cellula neoplastica né, di per sé, strettamente legato alla staminalità. Studi condotti ad esempio sui casi di leucemia linfoblastica acuta a cellule B recidivati dopo CAR-T dimostrano infatti che mutazioni o perdite dell'antigene sono possibili.

La necessità di nuove terapie efficaci nell'eradicare la malattia e la provata attività terapeutica delle CAR-T in altre neoplasie acute che interessano l'emopoiesi stanno quindi sostenendo la messa a punto e lo sviluppo clinico di strategie CAR-T anche nelle LMA. Tra i potenziali ostacoli da affrontare in questa patologia ricordiamo che:

- non esistono antigeni di superficie veramente specifici per i blasti mieloidi, che come tali possano essere utilizzati come bersagli per le cellule CAR-T;
- gli antigeni delle LMA sono spesso condivisi dai precursori emopoietici normali o dalla loro progenie, rendendo la strategia difficilmente applicabile a causa di un inaccettabile attività *on target-off tumor*;
- la produzione stessa delle cellule CAR-T potrebbe risentire, nei pazienti con LMA attiva, della inibizione dell'espansione delle cellule T da parte dei blasti stessi o della precedente esposizione a chemioterapia;
- sono necessarie strategie che permettano di superare l'eterogeneità e la complessità genetica di quelle varianti di LMA che sono in grado di eludere altre forme di terapia adottiva.

La conoscenza dei meccanismi biologici di resistenza ed il rapido avanzamento della tecnologia di manipolazione cellulare con la possibilità di orientare le cellule T verso bersagli multipli, uniti all'introduzione di metodiche di *gene editing* quali l'utilizzo del sistema di CRISPR, fanno però ipotizzare che molti di questi ostacoli potrebbero essere superati in un prossimo futuro.

Studi preclinici

Idealmente, l'antigene bersaglio di una terapia CAR-T dovrebbe essere una molecola di superficie espressa ad alti livelli e in modo omogeneo dall'intera popolazione neoplastica. Nel contesto della LMA, affinché la terapia CAR-T sia potenzialmente curativa è poi cruciale che l'antigene sia espresso dalle cellule staminali leucemiche e sia importante per la sopravvivenza delle cellule neoplastiche, così da ridurre il rischio di *down*-modulazione sotto la pressione delle CAR-T. Di contro, esso dovrebbe essere assente o espresso a bassi livelli nei tessuti sani, quantomeno in quelli vitali, per limitare lo sviluppo di tossicità *on-target off-tumor* potenzialmente letali. La scelta dell'antigene bersaglio è un passo cruciale nel corso dello sviluppo di una nuova terapia CAR-T e dovrebbe scaturire da un minuzioso processo analitico. Questo concetto è alla base di due studi recenti, di cui uno applicato proprio nel contesto della LMA, che hanno descritto strategie di CAR *antigen discovery* basate su sofisticati algoritmi che integrano dati di trascrittomica e proteomica su cellule sane e tumorali [50,51].

Purtroppo, le proteine di superficie espresse dalla LMA sono generalmente condivise con le cellule staminali emopoietiche e il compartimento mieloide, la cui ablazione a lungo termine risulta clinicamente inaccettabile. La ricerca di antigeni tumore-specifici è in continua evoluzione e può beneficiare della capacità delle CAR-T di riconoscere antigeni non proteici. Le aberrazioni nei meccanismi di *splicing*, nella glicosilazione e nel metabolismo lipidico che caratterizzano le cellule leucemiche rispetto alla controparte sana possono offrire nuovi bersagli selettivi, come nel caso della variante di *splicing 6* del CD44 [52]. Esistono poi diverse strategie potenzialmente efficaci nel limitare la mieloablazione. La prima è variare l'affinità della scFV per permettere il riconoscimento selettivo delle cellule tumorali che esprimono l'antigene ad alti livelli rispetto alle cellule sane che lo esprimono a livelli più bassi, come è stato recentemente dimostrato per il CD123 [53]. Alternativamente, è possibile limitare la persistenza delle CAR-T prediligendo l'espressione transiente del CAR (e.g. elettroporazione dell'mRNA) o incorporando interruttori di sicurezza che

permettano di eliminare le cellule trasdotte grazie alla somministrazione di un farmaco, come i geni suicidi (e.g. HSV-tk e la Caspasi 9 inducibile) o antigeni troncati riconosciuti da anticorpi monoclonali approvati per la clinica (e.g. EGFR/cetuximab e il CD20/rituximab). Purtroppo, ogni approccio che preveda l'ablazione delle CAR-T porta con sé il rischio di aumentare la probabilità di recidiva. In questo contesto, l'utilizzo del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche come consolidamento dopo terapia CAR-T può essere un'opzione vantaggiosa per preservarne l'effetto terapeutico. Un'applicazione più estrema di questo concetto prevede che le stesse CAR-T siano utilizzate come regime di condizionamento prima del trapianto allogenico [54]. Un altro approccio recentemente descritto molto elegante, benché tecnologicamente complesso, è quello di associare la terapia CAR-T al trapianto di cellule staminali ematopoietiche in cui l'antigene bersaglio sia stato deleto a livello genetico, così da generare artificialmente antigeni leucemia-specifici. Questa strategia è stata recentemente applicata al CD33 [55]. Infine, è possibile sfruttare innovative piattaforme CAR che permettano di inibire l'attivazione in risposta ad un antigene espresso solo dal tessuto sano (i.e. CAR inibitori), attivare pienamente la cellula CAR-T solo in risposta a cellule che co-esprimono due antigeni bersaglio (i.e. split-CAR in cui il CD3ζ e il co-stimolo vengono separati in due diversi costrutti), o ancora regolare finemente l'attivazione tramite somministrazione di un farmaco che permetta di decidere dove, quanto e per quanto tempo attivare la risposta CAR-T [56].

Purtroppo, anche l'efficacia della terapia CAR-T può essere limitante nella LMA a causa dell'eterogeneità intrinseca di quest'ultima, la sua capacità di evadere la risposta immunitaria e la presenza di un microambiente altamente immunosoppressivo. Molteplici sono ad esempio i meccanismi alla base delle recidive di LMA post-trapianto allogenico, tra cui l'up-regolazione di ligandi inibitori [45], che si associa all'esaurimento funzionale dei linfociti T [47], e la *down*-modulazione degli HLA di classe prima [44] e seconda [45,46], che ricordano la perdita del CD19 in seguito alla terapia con CD19-CAR-T. Una strategia volta a superare l'eterogeneità e la perdita dell'antigene è quella di colpire più bersagli contemporaneamente. Recentemente, è stata descritta nel contesto della LMA una strategia di targeting combinatorio in grado di soddisfare stringenti criteri di efficacia e tossicità [50]. Per ovviare all'immunosoppressione, la combinazione con *checkpoint inhibitors*, già testata in diversi tipi tumorali, sembra un'opzione percorribile anche per la LMA. Tuttavia, i meccanismi immunosoppressivi messi in atto dalla LMA sono molteplici e una migliore comprensione dell'asse LMA-linfociti T-microambiente rappresenterà un grande passo in avanti verso l'obiettivo di sviluppare terapie CAR-T efficaci per la LMA.

Poco si sa dello sviluppo di tossicità CAR-relate nel contesto della LMA. Tuttavia, il riconoscimento della componente mieloide come attore chiave nello sviluppo della CRS e della neurotossicità pone quesiti interessanti su una malattia oncologica che coinvolge proprio il compartimento mieloide. Infine, sia per gli studi di efficacia sia di tossicità, un aspetto positivo della LMA rispetto ad altri tipi tumorali è la capacità di attecchire in animali immunodeficienti, permettendo lo sviluppo di una modellistica *in vivo* altamente sofisticata e predittiva perché capace di ricapitolare in modo più fedele rispetto ad altri tumori la malattia originale.

Studi clinici

Il primo studio clinico che ha dimostrato la fattibilità e la potenziale attività di cellule CAR-T dirette verso antigeni mieloidi in pazienti affetti da LMA è stato condotto nel 2013 [57]. In questo studio, linfociti autologhi sono stati ingegnerizzati per esprimere una CAR-T di seconda generazione, diretta verso l'antigene Lewis Y delle cellule leucemiche e con un segnale di costimolo del tipo CD28-ζ. Sebbene si sia osservata una efficacia clinica limitata, si è però dimostrata la fattibilità di dirigere cellule CAR-T verso antigeni espressi dalle LMA, in assenza di una rilevante tossicità ematopoietica. Dopo questo primo lavoro sono stati riportati numerosi altri casi di pazienti con LMA che hanno ricevuto terapia con CAR-T. Tra i principali antigeni verso cui sono state sviluppate CAR-T in corso di valutazione clinica nelle LMA ricordiamo:

- **CD33**: una proteina con funzione di recettore trans-membrana che promuove l'adesione cellulare acido sialico-dipendente. Essa è espressa dalla maggior parte delle cellule mieloidi a valle del precursore mieloide comune ed è già sfruttata sia nella diagnostica che nella terapia delle LMA come bersaglio di un anticorpo monoclonale immuno-coniugato [58]. Sebbene manchino dati adeguati a valutare l'efficacia clinica di questo approccio, la prima dimostrazione circa la possibilità di ottenere risposte nell'uomo con l'impiego di CAR-T dirette contro CD33 è stata ottenuta nel 2015 in un paziente di 41 anni affetto da LMA M2, con mutazione del gene della nucleofosmina, ricaduta dopo chemioterapia con alte dosi di citarabina [59]. Questo paziente ha ricevuto una infusione per un totale di $1x10^9$ CAR-T anti CD33 e ha ottenuto una transitoria risposta di malattia dopo aver sviluppato una sintomatologia riferibile alla CRS. Data l'ampia distribuzione del CD33 sulle cellule mieloidi anche sane, l'utilizzo di una CAR-T rivolta verso questo antigene è d'altra parte potenzialmente associato ad una permanente mielo-ablazione e quindi ad una inaccettabile tossicità. È per questo che alcuni gruppi hanno messo a punto strategie che sfruttano l'*editing* genetico con CRISPR/Cas9 al fine di generare precursori emopoietici allogenici la cui progenie non esprime il CD33 (CD33-/-) ed è quindi resistente alla attività del CAR-T diretto contro il CD33 [55]. Tale approccio che combina il trapianto di precursori ematopoietici allogenici CD33-/- all'infusione di cellule CAR-T anti CD33 è attualmente in valutazione nel contesto di un trial clinico presso l'Università della Pennsylvania [60]. Altri gruppi stanno invece sviluppando strategie modulari con recettori sulle cellule T che vengono attivati in risposta ad anticorpi bispecifici, capaci quindi di riconoscere da un lato l'antigene desiderato sulle cellule tumorali e dall'altro di attivare il linfocita T che viene trasdotto a sua volta con uno specifico recettore per la porzione del bispecifico non diretta contro il tumore. Questa strategia ha il vantaggio di una elevata adattabilità a

bersagli diversi e di una altrettanto alta possibilità di modulazione in caso di eventuali effetti collaterali [61].

- **CLL1**: per il suo elevato livello di espressione sulle cellule di LMA, è un altro antigene, sempre della famiglia delle lectine, verso cui si sono generate CAR-T in corso di valutazione clinica. Sono stati recentemente riportati dati preliminari incoraggianti con CAR-T dirette contro CLL1, impiegati in una popolazione pediatrica di LMA R/R: su 3 pazienti trattati, 2 hanno ottenuto una risposta molecolare e hanno consolidato con trapianto allogenico. Tutti i pazienti hanno presentato pancitopenia dopo l'infusione di CAR-T [62]. Oltre a CAR-T di seconda generazione dirette contro il CLL1 sono stati prodotti e attualmente in corso di studio nell'uomo dual CAR-T con riconoscimento sia di CD33 che di CLL1 e dual CAR-T con riconoscimento sia di CLL1 che di CD123, un altro antigene espresso dalle cellule mieloidi immature. Le *dual* CAR-T dirette simultaneamente contro il CD33 e CLL1 sono state anche esse utilizzate come terapia a ponte in previsione di un trapianto allogenico. Sono riportati 2 pazienti con LMA in fase attiva che sono stati trattati con questo prodotto (infuso dopo la classica linfodeplezione) e che a seguire hanno ricevuto un trapianto allogenico, nuovamente T-depleto, anche allo scopo di eliminare le CAR-T per lasciare spazio alle cellule emopoietiche del donatore. Anche in questo caso è riportato che entrambi i pazienti hanno negativizzato la malattia a livello molecolare prima del trapianto e hanno successivamente avuto un attecchimento delle cellule allogeniche trapiantate [63].
- **CD123**: la catena alfa del recettore della interleuchina 3 è un altro antigene espresso dalle cellule mieloidi verso cui diversi gruppi hanno diretto delle cellule CAR-T che sono state impiegate nell'uomo. Anche l'espressione di questo antigene però non è esclusiva delle cellule leucemiche. Esso è infatti espresso anche dai precursori ematopoietici mieloidi non mutati e da alcune sotto-popolazioni di cellule endoteliali. Diversi studi clinici (e.g. NCT02159495, NCT02623582, NCT04230265, NCT03190278) stanno valutando CAR-T dirette contro questo antigene. I dati preliminari del primo di questi studi suggeriscono la fattibilità di questo approccio e la possibilità di condurre alcuni pazienti R/R al trapianto di midollo osseo allogenico dopo il ri-ottenimento della remissione completa grazie all'infusione di cellule modificate con CAR-T anti CD123 [64]. Non vi sono però ancora dati conclusivi in merito. Anche nel caso delle terapie dirette contro il CD123 si stanno impiegando strategie diverse che vanno dalla CAR-T di origine allogenica per abbreviare i tempi tra l'identificazione del paziente e l'infusione del prodotto (NCT03190278), all'impiego di prodotti universali perché rapidamente convertibili come bersaglio ed inattivabili con facilità in caso di effetti collaterali severi [65].
- **CAR-T** dirette contro altri antigeni sono in valutazione nell'ambito di studi aperti all'arruolamento rivolti a pazienti con LMA. Tra queste menzioniamo: • CD44v6, una proteina transmembrana coinvolta in numerosi processi biologici e prevalentemente espressa dai monociti e dalle forme più mature di LMA{Casucci:2013cy}; • FLT3, tirosina chinasi 3, molecola frequentemente mutata nelle LMA. NKG2D e suoi ligandi, CD7, CD38 e CD19 - nelle forme di LMA con traslocazione (8:21) con aberrante espressione - sono altri potenziali bersagli in valutazione nell'ambito di studi clinici (Tabella 3).

Bersaglio	Numero NCT	Titolo	Condizione	Intervento	Sede
CD123	NCT04678336	CD123 Redirected T Cells for AML in Pediatric Subjects	AML R/R (pediatrica)	CD123 CAR-T	- Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, United States
	NCT03190278	Study Evaluating Safety and Efficacy of UCART123 in Patients With Relapsed/ Refractory Acute Myeloid Leukemia	AML R/R	UCART123v1.2	- Sylvester Comprehensive Cancer Center, Miami, Florida, United States - H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, Tampa, Florida, United States - Northwestern University, Chicago, Illinois, United States - Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, United States - Weill Medical College of Cornell University, New York, New York, United States - MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, United States
	NCT04230265	Dose-escalating Trial With UniCAR02-T Cells and CD123 Target Module (TM123) in Patients With Hematologic and Lymphatic Malignancies	AML R/R, B-ALL, BPDCN	CD123 CAR-T (Universale)	- Universitätsklinikum Ulm, Ulm, Baden-Württemberg, Germany - Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg, Bayern, Germany - Philipps-Universität Marburg, Marburg, Hessen, Germany

Bersaglio	Numero NCT	Titolo	Condizione	Intervento	Sede
CD123	NCT02159495	Genetically Modified T-cell Immunotherapy in Treating Patients With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia and Persistent/Recurrent Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm	AML, B-ALL, Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN)	CD123 CAR-T (allogenico)	- City of Hope Medical Center Duarte, United States
	NCT03796390	Study Evaluating Safety and Efficacy of CAR-T Cells Targeting CD123 in Patients With Acute Myelocytic Leukemia	AML R/R	CD123 CAR-T	- Hebei Yanda, Ludaopei Hospital, Langfang, Hebei, China
	NCT04318678	CD123-Directed Autologous T-Cell Therapy for Acute Myelogenous Leukemia (CATCHAML)	AMLR/R	CD123 CAR T	- St. Jude Children's Hospital, Memphis, Tennessee, United States
	NCT04014881	Safety and Efficacy of Anti-CD123 CAR-T Therapy in Patients With Refractory/ Relapsed CD123+ Acute Myeloid Leukemia	CD123+ AML	CD123 CAR-T	- Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China
	NCT04272125	Safety and Efficacy of CD123-Targeted CAR-T Therapy for Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia	AML R/R	CD123 CAR-T	- Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing, Chongqing, China
CD33	NCT03971799	Study of Anti-CD33 Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells (CD33CART) in Children and Young Adults With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia	AML R/R	CD33 CAR-T	- Children's Hospital of Los Angeles, Los Angeles, California, United States - National Cancer Institute - NIH, Bethesda, Maryland, United States - The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, United States
	NCT03885076	Gamma Delta T cells in AML	AML R/R	CD33 Gamma Delta CAR-T	- The Royal Marsden NHS Foundation Trust, Sutton, United Kingdom

Bersaglio	Numero NCT	Titolo	Condizione	Intervento	Sede
CLL1	NCT04219163	Chimeric Antigen Receptor T-cells for The Treatment of AML Expressing CLL-1 Antigen	AML R/R	CLL-1 CAR-T	- Texas Children's Hospital, Houston, Texas, United States
	NCT04789408	Study Evaluating the Safety of KITE-222 in Participants With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia	AML R/R	CLL-1 CAR-T	
BERSAGLI MULTIPLI	NCT03631576	CD123/CLL1 CAR-T Cells for R/R AML	AML R/R	CD123/CLL1 CAR-T	- Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou, China
	NCT04010877	Multiple CAR-T Cell Therapy Targeting AML	AML R/R	CLL-1, CD33 and/or CD123-CAR-T	- Shenzhen Geno-immune Medical Institute, Shenzhen, Guangdong, China
ALTRI	NCT04351022	CD38-targeted Chimeric Antigen Receptor T Cell (CART) in Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia	AML	CD38 CAR-T	- Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, China
	NCT04803929	ILT3 CAR-T for AM	AML (M4/M5)	anti-ILT3 CAR-T	- Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang, China
	NCT04097301	Study of CD44v6 CAR T-cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia and Multiple Myeloma	R/R AML e R/R Mieloma Multiplo	MLM-CAR44.1 CAR-T	- IRCCS San Raffaele, Milan, Italy
	NCT04033302	Multi-CAR T Cell Therapy Targeting CD7-positive Malignancies	T-ALL AML NK Cell Linfoma	CD7 CAR-T	- Shenzhen Geno-immune Medical Institute, Shenzhen, Guangdong, China
	NCT03904069	Study Evaluating the Safety, Tolerability, and Efficacy of FLT3 CAR-T AMG 553 in FLT3-positive Relapsed/Refractory AML	AML R/R	FLT3 CAR-T AMG 553	- City of Hope National Medical Center, Duarte, California, United States - Stanford University, Palo Alto, California, United States - MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, United States

AML: leucemia mieloide acuta; **R/R**: ricaduta/refrattaria; **B-ALL**: Leucemia Linfoblastica Acuta a cellule B; **BPCDN**: Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm
CAR-T: cellule T con recettore dell'antigene chimerico.

Tabella 3 *- Principali studi clinici con cellule CAR-T nella leucemia mieloide acuta. Fonte https://clinicaltrials.gov termini della ricerca CAR-T e AML.*

Conclusioni e prospettive future

In sintesi, attualmente l'impiego clinico delle CAR-T nella LMA è ancora limitato agli studi clinici di fase precoce e deve infatti dimostrare sicurezza ed efficacia riproducibili e durature. Strategie combinate che si avvalgono delle metodiche di editing genetico più avanzate sono in via di sviluppo e vicine all'impiego clinico per consentire di dirigere le CAR-T verso bersagli potenzialmente espressi anche dalla emopoiesi normale e portare così ad una eradicazione il più possibile completa della leucemia, possibilmente andando a colpire la cellula staminale leucemica, che purtroppo nelle forme acute mieloidi non presenta sulla sua superficie bersagli specifici e stabili ed è spesso capace di selezionare meccanismi di *immune escape*. Tali metodiche innovative dovrebbero inoltre superare il limite della tossicità ematologica di cellule CAR-T indirizzate verso antigeni mieloidi.

Bibliografia

1. Chabannon C, Kuball J, Bondanza A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. Sci Transl Med. 2018;10(436):eaap9630.
2. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. Bone Marrow Transplant. 2021. doi:10.1038/s41409-021-01227-8
3. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. N Engl J Med. 2007;357(15):1472-5.
4. Eshhar Z, Waks T, Gross G, et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(2):720-4.
5. van der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. Nat Rev Drug Discov 2015;14(7):499-509.
6. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. Immunity 2016;44(2):380-90.
7. Long AH, Haso WM, Shern JF, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. Nat Med. 2015;21(6):581-90.
8. Majzner RG, Rietberg SP, Sotillo E, et al. Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. Cancer Discov. 2020;10(5):702-23.
9. Hamieh M, Dobrin A, Cabriolu A, et al. CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. Nature. 2019;568(7750):112-6.
10. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. Expert Opin Biol Ther. 2015;15(8):1145-54.
11. Hudecek M, Izsvák Z, Johnen S, et al. Going non-viral: the Sleeping Beauty transposon system breaks on through to the clinical side. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2017;52(4):355-80.
12. Feucht J, Sun J, Eyquem J, et al. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. Nat Med. 2019;25(1):82-8.
13. Provasi E, Genovese P, Lombardo A, et al. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. Nat Med. 2012;18(5):807-15.
14. Mastaglio S, Genovese P, Magnani Z, et al. NY-ESO-1 TCR single edited stem and central memory T cells to treat multiple myeloma without graft-versus-host disease. Blood 2017;130(5):606-18.
15. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, et al. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2020;19(3):185-99.
16. Liu E, Marin D, Banerjee P, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. N Engl J Med. 2020;382(6):545-53.
17. Ren J, Liu X, Fang C, et al. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. Clin Cancer Res. 2017;23(9):2255-66.
18. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. Blood. 2010;116(20):4099-102.
19. Kalos M, Levine BL, Porter DL, 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.
20. Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. N Engl J Med. 2011;365(8):725-33.
21. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2013;5(177):177ra38.
22. Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. J Clin Invest. 2016;126(6):2123-8.
23. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2019;16(6):372-85.
24. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15(1):47-62.
25. Hay KA, Hanafi L-A, Li D, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. Blood 2017;130(21):2295-306.
26. Gust J, Hay KA, Hanafi L-A, et al. Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. Cancer Discov. 2017;7(12):1404-19.
27. Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Discov. 2016;6(6):664-79.
28. Santomasso BD, Park JH, Salloum D, et al. Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Discov. 2018;8(8):958-71.
29. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. Nat Med. 2018;24(6):739-48.
30. Giavridis T, van der Stegen SJC, Eyquem J, et al. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. Nat Med. 2018;24(6):731-8.
31. Parker KR, Migliorini D, Perkey E, et al. Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies. Cell. 2020;183(1):126-142.e17.
32. García-Guerrero E, Sierro-Martínez B, Pérez-Simón JA. Overcoming Chimeric Antigen Receptor (CAR) Modified T-Cell Therapy Limitations in Multiple My-

eloma. Front Immunol. 2020;11:1128.
33. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2018;378(5):439-48.
34. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 2017;377(26):2531-44.
35. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 2019;380(1):45-56.
36. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. Lancet. 2020;396(10254):839-52.
37. Wang M, Munoz J, Goy A, et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 2020;382(14):1331-42.
38. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. Biol Blood Marrow Transplant. 2019;25(4):625-38.
39. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. N Engl J Med. 2013;368(16):1509-18.
40. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2014;6(224):224ra25.
41. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2021 update on risk-stratification and management. Am J Hematol. 2020;95(11):1368-98.
42. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424-47.
43. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood. 1990;76(12):2462-65.
44. Vago L, Perna SK, Zanussi M, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. N Engl J Med. 2009;361(5):478-88.
45. Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. Nat Med. 2019;25(4):603-11.
46. Christopher MJ, Petti AA, Rettig MP, et al. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. N Engl J Med. 2018;379(24):2330-41.
47. Noviello M, Manfredi F, Ruggiero E, et al. Bone marrow central memory and memory stem T-cell exhaustion in AML patients relapsing after HSCT. Nat Commun. 2019;10(1):1065.
48. Vago L, Gojo I. Immune escape and immunotherapy of acute myeloid leukemia. J Clin Invest. 2020;130(4):1552-64.
49. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. N Engl J Med. 2014;371(16):1507-17.
50. Perna F, Berman SH, Soni RK, et al. Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen Receptor Therapy of AML. Cancer Cell. 2017;32(4):506-519.e5.
51. MacKay M, Afshinnekoo E, Rub J, et al. The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors. Nature Biotechnol. 2020;38(2):233-44.
52. Casucci M, Nicolis di Robilant B, Falcone L, et al. CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. Blood. 2013;122(20):3461-72.
53. Arcangeli S, Rotiroti MC. Bardelli M, et al. Balance of Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor Binding Affinity and Density for the Targeting of Acute Myeloid Leukemia. Mol Ther. 2017;5(8):1933-45.
54. Gill SI. How close are we to CAR T-cell therapy for AML? Best Pract Res Clin Haematol. 2019;32(4):101104.
55. Kim MY, Yu KR, Kenderian SS, et al. Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. Cell. 2018;173(6):1439-53.e19.
56. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2020;17(3):147-67.
57. Ritchie DS, Neeson PJ, Khot A, et al. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. Mol Ther. 2013;1(11):2122-9.
58. Ali S, Dunmore HM, Karres D, et al. The EMA Review of Mylotarg (Gemtuzumab Ozogamicin) for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. Oncologist. 2019;24(5):e171-e179.
59. Wang Q-S, Wang Y, Lv H-Y, et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. Mol Ther. 2015;23(1):184-91.
60. Mardiana S, Gill S. CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions. Front Oncol. 2020;10:697.
61. Benmebarek M-R, Cadilha BL, Herrmann M, et al. A modular and controllable T cell therapy platform for acute myeloid leukemia. Leukemia. 2021;1-15. doi:10.1038/s41375-020-01109-w.
62. Bu C, Peng Z, Luo M, et al. Phase I Clinical Trial of Autologous CLL1 CAR-T Therapy for Pediatric Patients with Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia [abstract]. Blood. 2020;136(Suppl. 1):13.
63. Liu F, Cao Y, Pinz K. First-in-Human CLL1-CD33 Compound CAR T Cell Therapy Induces Complete Remission in Patients with Refractory Acute Myeloid Leukemia: Update on Phase 1 Clinical Trial [abstract]. Blood. 2018;132(Suppl. 1):901.
64. Budde L, Song JY, Kim Y, et al. Remissions of acute myeloid leukemia and blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm following treatment with CD123-specific CAR T cells: a first-in-human clinical trial [abstract]. Blood. 2017;130(Suppl 1):811.
65. Loff S, Dietrich J, Meyer J-E, et al. Rapidly Switchable Universal CAR-T Cells for Treatment of CD123-Positive Leukemia. Mol Ther Oncolytics. 2020;17:408-20.
66. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). Haematologica. 2020;105(2):297-31.

Parole Chiave

Cellule CAR-T, terapia cellulare, leucemia mieloide acuta

Indirizzi per la corrispondenza

Prof. ***Chiara Bonini***
University Vita-Salute San Raffaele
Ospedale San Raffaele Scientific Institute
Experimental Hematology Unit, Head
Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases,
Deputy Director, Milano, Italy
e-mail: bonini.chiara@hsr.it

Ematologia Oncologica

Titoli pubblicati e disponibili

2014
Sindromi mielodisplastiche
Emergenze in ematologia
Diagnosi difficili e rare

2015
Il mieloma multiplo nell'era dei nuovi farmaci
Farmaci bersaglio (I)
Linfoma follicolare

2016
Farmaci bersaglio (II)
Trapianto Allogenico
Terapia di supporto in oncoematologia

2017
Sindromi rare
Lesioni genetiche ed evoluzione clonale
Nuove strategie di immunoterapia

2018
Linfomi a grandi cellule
Mielofibrosi
Controversie nel Mieloma Multiplo

2019
Anemie: recenti acquisizioni
Malattia Minima Residua nelle Leucemie
Disordini linfoplasmacellulari

2020
Neoplasie dell'anziano
Dalla morfologia alla classificazione molecolare
La trombosi nelle neoplasie ematologiche

La rivista è scaricabile dai siti web:

Ematologia oncologica
www.ematologiaoncologica.it

Fondazione Matarelli
www.fondazionematarelli.it

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini
www.beat-leukemia.com

Nel prossimo numero: Anno 8 - Numero 2 - 2021

Infezioni in oncoematologia

Epidemiologia nell'era dei nuovi farmaci
Predisposizione e fattori di rischio
Profilassi antibatterica nell'era della multiresistenza
HIV e neoplasie ematologiche
Infezione da SARS-CoV-2

Con il supporto non condizionante di

Celgene | Bristol Myers Squibb™ Company