

UNIVERSITÀ DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



**L'aggiunta di Gemtuzumab Ozogamicin ad
una terapia di induzione basata su
fludarabina e alte dosi di citarabina migliora
significativamente la sopravvivenza nei
pazienti affetti da Leucemia Acuta Mieloide
citogeneticamente normale e positiva per
FLT3-ITD**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Roberto Massimo Lemoli

Candidato:

Luca Barbera

Correlatore:

Prof. Fabio Guolo

Anno accademico 2020-2021

INDICE

1.	Introduzione	4
2.	Epidemiologia	4
3.	Eziologia e Patogenesi	5
4.	Citogenetica e Biologia molecolare	9
5.	Classificazione.....	13
6.	Presentazione clinica e diagnosi.....	16
7.	Fattori prognostici e stratificazione del rischio	19
8.	Trattamento e valutazione della risposta	21
9.	Background e scopo del lavoro.....	27
10.	Metodi	29
11.	Valutazione della risposta e analisi statistica.....	32
12.	Risultati.....	33
13.	Discussione	40
14.	Bibliografia.....	42
15.	Ringraziamenti	50

Abstract

Introduzione: l'aggiunta dell'anticorpo monoclonale anti-CD33 Gemtuzumab Ozogamicin (GO) ad una terapia di induzione e consolidamento basata su antracicline e citosina arabinoside (schema "3+7") ha dimostrato di migliorare significativamente la sopravvivenza nei pazienti affetti da Leucemia Acuta Mieloide a rischio basso o intermedio.

Pazienti e Metodi: in questo studio retrospettivo abbiamo osservato i dati relativi a pazienti trattati in tre centri ematologici fra il 2008 e il 2018. Per tutti i pazienti è stata eseguita la ricerca di mutazioni di NPM1 e FLT3. A tutti i pazienti è stata somministrata una terapia di induzione secondo lo schema FLAI (Fludarabina, Citarabina e Idarubicina) con o senza l'aggiunta del GO.

Risultati: Sono stati inclusi nell'analisi 148 pazienti, dopo un ciclo di induzione, 126 pazienti hanno raggiunto la RC (85%) senza alcuna differenza tra i pazienti che hanno ricevuto o meno il GO. Dopo un follow-up mediano di 70 mesi, la sopravvivenza globale a 3 anni (OS) era del 59,5%. La durata della OS è stata significativamente più lunga nei pazienti con mutazione NPM1 rispetto ai pazienti FLT3-ITD. L'aggiunta di GO non ha migliorato significativamente l'esito nell'intera coorte, ma tra i pazienti FLT3-ITD ha mostrato un effetto positivo sulla sopravvivenza rispetto a coloro che non lo hanno ricevuto.

Discussione: Nonostante il potenziale bias dovuto alla natura retrospettiva dell'analisi i nostri dati sembrano indicare che il GO, aggiunto ad un'induzione intensiva a base di fludarabina/citarabina ad alte dosi, fornisce un significativo

1. Introduzione

La leucemia mieloide acuta (LAM) è una proliferazione clonale di cellule staminali ematopoietiche, caratterizzata da una differenziazione severamente compromessa e un progressivo accumulo di cellule patologiche (blasti) in vario stadio di maturazione nel midollo osseo, nel sangue e i tessuti periferici.

2. Epidemiologia

La LAM è la leucemia acuta più frequente in età adulta. In Europa, il tasso di incidenza di LAM è stimato in 3.62 casi per 100000 abitanti¹ ed è maggiore nei soggetti di sesso maschile. L'età mediana di diagnosi è circa 67 anni e il tasso di incidenza negli over 70 supera i 15 casi per 100000 abitanti (figura 1). In Italia, prendendo come riferimento i dati incidenti europei, si possono stimare circa 2200 nuovi casi di LAM ogni anno. Dati di registro europei evidenziano una sopravvivenza relativa, a 5 anni dalla diagnosi di LAM, pari al 17%. Tuttavia, ci sono grandi differenze nelle varie età: il 47% dei pazienti con età compresa fra 15 e 49 anni sopravvive almeno 5 anni dopo la diagnosi, per i pazienti con più di 70 anni la percentuale scende al 2,7%²



FIGURA 1: TASSO DI INCIDENZA DI LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE NELLA POPOLAZIONE ITALIANA IN RAPPORTO ALL'ETÀ. RIPRODOTTO DA: "I TUMORI IN ITALIA - RAPPORTO 2006", EPIDEMIOLOGIA E PREVENZIONE

3. Etiologia e Patogenesi

La cellula di origine

Nel nostro midollo osseo sono presenti le cellule staminali ematopoietiche (CSE) che hanno il compito di produrre delle cellule progenitrici le quali differenziandosi danno origine alle varie popolazioni cellulari che poi occuperanno il sangue periferico di un individuo sano. Questo processo è di fondamentale importanza ed è mantenuto per tutta la vita dalla capacità di autorinnovamento delle CSE in modo tale che ci sia sempre un numero sufficiente di cellule mature nel sangue. L'ematopoiesi quindi è organizzata in modo gerarchico con le CSE al suo apice.³ In un individuo sano, le capacità illimitate di auto-rinnovamento nel midollo osseo sono esclusive delle CSE e vengono perse dallo stadio di progenitore in poi. Questo assicura un livello costante di cellule progenitrici e impedisce che queste cellule si moltiplichino fuori controllo. La LAM insorge quando si verificano mutazioni somatiche a carico di geni responsabili del programma differenziativo cellulare, generando così un pool di cellule staminali leucemiche (CSL) responsabili della progressione della malattia.

Quindi, le CSL devono avere una capacità di auto-rinnovamento e un potenziale proliferativo più elevato rispetto alle cellule non maligne. Ipoteticamente ci sono due modi affinché possa nascere una CSL da una cellula normale: 1) una CSE acquisisce un potenziale proliferativo, 2) un progenitore impegnato acquisisce capacità di auto-rinnovamento. (Queste due opzioni sono mostrate nella Figura 2). L'opzione 1 mostra come una CSE in seguito ad una mutazione (Mut 1a, Figura 2) dia origine ad una CSL con un elevato potenziale proliferativo. L'opzione 2 invece illustra come una cellula progenitrice multipotente guadagna la capacità di auto-rinnovamento attraverso una diversa mutazione (Mut1b nella Figura 2). La Mut 1a può essere una qualsiasi delle numerose mutazioni che portano alla trasformazione di una CSE, per esempio, una mutazione che aumenta la proliferazione e/o che porta a un blocco della differenziazione, mentre la Mut 1b dovrebbe essere una mutazione che ripristina la capacità di auto-rinnovamento.⁴

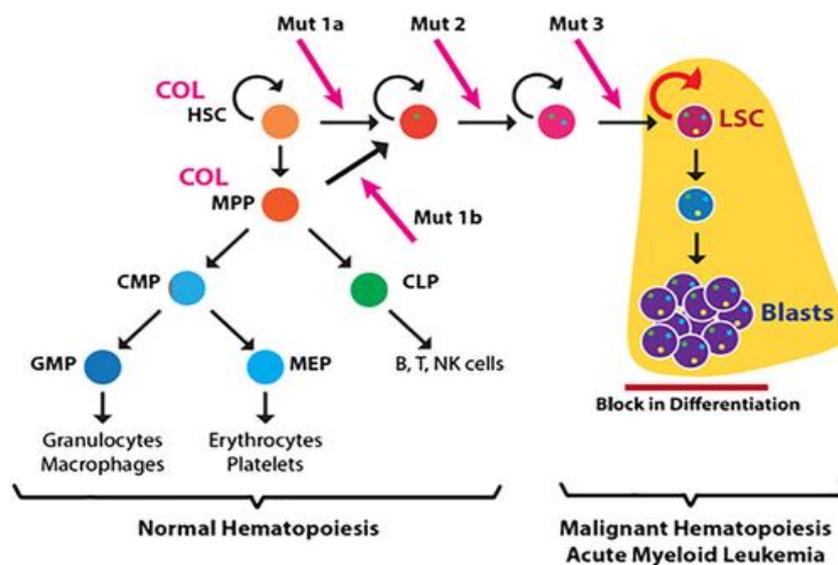


Figura 2: Confronto tra l'ematopoiesi normale e l'ematopoiesi maligna. Riprodotto da: Chopra, M. & Bohlander, S. K. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia.

La causa d'insorgenza di LAM è stata associata a numerosi fattori di rischio in particolare all'esposizione a radiazioni ionizzanti e ad agenti chimici che danneggiano il DNA (Tabella 1), tuttavia una chiara storia di contatto con una sostanza cancerogena riconosciuta non è frequente nei pazienti con LAM.⁵

Disordini genetici
Sindrome di Down
Sindrome di Klinefelter
Sindrome di Patau
Sindrome di shwachman
Atassia telangectasia
Sindrome di Kostman
Neurofibromatosi
Anemia di Fanconi
Sindrome di Li-Fraumeni
Esposizione ad agenti fisici o chimici
Benzene
Pesticidi
Fumo di sigaretta
Conservanti
Erbicidi
Radiazioni ionizzanti
Chemioterapia
Alchilanti
Inibitori di Topoisomerasi 2
Antracicline
Taxani

Tabella 1: Fattori di rischio associati allo sviluppo di Leucemia Mieloide acuta.

Riprodotta da: "Ematologiainprogress.it"

Fattori Genetici

Tra i bambini i disordini genetici sono importanti fattori di rischio associati allo sviluppo di LAM, in particolare i bambini affetti da Sindrome di Down hanno un rischio di 10-20 volte maggiore di sviluppare una Leucemia Acuta. Altre patologie congenite associate alla LAM sono la Sindrome di Klinefelter, la Sindrome di Li Fraumeni⁶ la Sindrome di Fanconi e la Neurofibromatosi⁷.

Ciò nonostante le anomalie genetiche acquisite sono riscontrate nel 50% - 80% dei casi di LAM, soprattutto in pazienti con Leucemia secondaria o di età più avanzata. Disordini genetici di frequente riscontro sono la perdita o la delezione

del cromosoma 5, 7, Y e 9, traslocazioni cromosomiche come la t(8;21)(q22;q22), o t(15;17)(q22;q11) e altre anomalie che coinvolgono i cromosomi 16, 9 e 11.

L'ipotesi "two hit":

Le mutazioni genetiche riscontrabili nelle cellule leucemiche sono state distinte in due classi: I) mutazioni di classe I, responsabili del vantaggio proliferativo; II) mutazioni di classe II, responsabili del blocco differenziativo. L'ipotesi two-hit, prevede infatti che la LAM si sviluppi in seguito all'insorgere di almeno una mutazione per classe. Esempi di mutazioni di classe I includono quelle a carico di *FLT3* e *c-KIT*. La mutazione biallelica di *CEBPA* invece è un esempio di mutazione di classe II⁸. L'attendibilità di questa ipotesi è avvalorata da diversi studi che dimostrano come la presenza del trascritto chimerico *RUNX1/RUNX1T1*, una mutazione di classe I, non è da sola sufficiente a causare l'insorgenza di LAM^{9 10}.

Fattori Chimici e Fisici

Un vasto numero di esposizioni ambientali e chimiche sembrano essere associate ad un rischio variabile di sviluppare una LAM negli adulti, tra queste l'esposizione alle radiazioni ionizzanti ha un ruolo significativo¹¹. E' ampiamente riconosciuto che anche i farmaci chemioterapici possono aumentare il rischio di LAM, in particolare la classe degli agenti alchilanti e gli inibitori della Topoisomerasi II¹².

Le Leucemie Mieloidi Acute secondarie

Comunemente si intende per leucemia mieloide acuta secondaria (s-LAM) quelle LAM che insorgono dopo una malattia del sangue precedentemente diagnosticata, spesso una sindrome mielodisplastica (MDS), meno

frequentemente una malattia mieloproliferativa come la Leucemie Mieloide Cronica, la Trombocitemia Essenziale, la Policitemia Vera e la Mielofibrosi Primaria; ed infine ricordiamo anche le LAM diagnosticate in pazienti che per antecedenti neoplasie hanno ricevuto un trattamento chemio e/o radioterapico. Più del 90% delle Leucemie secondarie sono di origine mieloide, solitamente caratterizzate da una scarsa prognosi, avendo una bassa percentuale di pazienti che ottengono una remissione completa e una durata della sopravvivenza inferiore rispetto ai pazienti con una LAM de novo.^{13 14}

4. Citogenetica e Biologia molecolare

Negli ultimi anni le indagini citogenetiche e di biologia molecolare hanno acquisito molta importanza, non solo da un punto di vista diagnostico, ma anche prognostico. In maniera classificativa possiamo considerare: alterazioni cromosomiche e mutazioni di singoli geni.

Alterazioni Cromosomiche

Le più comuni aberrazioni cromosomiche riscontrabili in pazienti affetti da LAM includono traslocazioni e inversioni, delezioni, monosomie e trisomie, e sono riscontrabili nel cariotipo di circa il 60% dei soggetti¹⁵. Una tra le principali anomali cromosomiche è la $t(8,21)(q22;22)$, si trova nel 5-10% delle LAM, prevalentemente in individui giovani con età mediana di 30 anni¹⁶. Nella $t(8,21)(q22;22)$ viene coinvolto il gene *RUNX1* situato su 21q22 e il gene *RUNX1T1* situato su 8q22, generando il trascritto di fusione *RUNX1-RUNX1T1*¹⁷, che agisce attraverso l'inibizione dell'apoptosi mediante l'up-regolazione del gene

anti-apoptotico BCL2.¹⁸ Generalmente le LAM associate a questo tipo di traslocazione hanno una prognosi favorevole.¹⁹ La Leucemia promielocitica acuta (LPA) invece è conosciuta per la t(15;17)(q22;q21) e comprende circa il 5-10% dei casi di LAM²⁰. Un'importante caratteristica distintiva della LPA è la frequente associazione con la coagulazione intravascolare disseminata (CID) che porta ad un alto tasso di mortalità e morbilità. La t(15;17) genera un trascritto di fusione (PML-RAR α) tra il gene PML situato su 15q22 e il gene RAR α situato su 17q12-q21. La LPA è stata considerata fatale e maligna fin dalla sua prima descrizione nel 1957, ma l'introduzione della terapia a base di all-trans acido retinoico (ATRA) e triossido di arsenico (ATO) è stata una svolta nel trattamento, con un tasso di remissione completa superiore al 90% e un tasso di sopravvivenza libera da malattia a 5 anni (>90%). La terapia ATRA/ATO che mira alla proteina di fusione PML-RARA è infatti un eccellente modello di terapia molecolare mirata. Un'altra alterazione cromosomica di frequente riscontro è l'inv(16)/t(16;16), da questa inversione si origina il trascritto CBF β -MYH11, che si riscontra il circa il 15-20% dei pazienti affetti da LAM de novo ed in particolare nel sottogruppo FAB M4²¹, questa alterazione che è stata inserita nella classificazione europea LeukemiaNet nel gruppo genetico a prognosi favorevole²² è associata ad una buona risposta alla terapia di induzione ottenendo una remissione completa nell'80-90% dei casi²³.

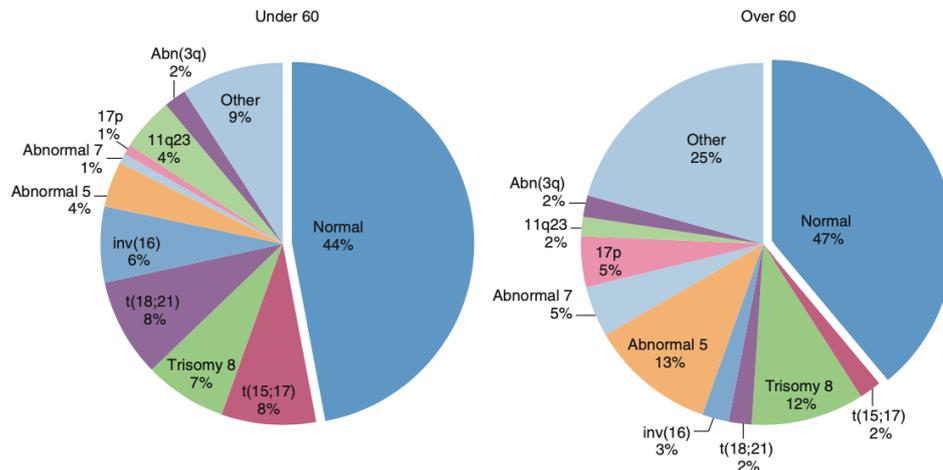


FIGURA 3: FREQUENZA ALLA DIAGNOSI DELLE ABERRAZIONI CROMOSOMICHE COMUNEMENTE IDENTIFICABILI IN PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA. RIPRODOTTO DA R. HOFFMAN "HEMATOLOGY – BASIC PRINCIPLES AND PRACTICE, 7E" - ELSEVIER

Mutazioni di singoli geni

Uno studio di sequenziamento genico, con tecniche di whole-genome sequencing, whole-exome sequencing e analisi di metilazione del DNA, ha evidenziato che il materiale genetico delle cellule LAM presenta in media 13 mutazioni. Tutti i campioni studiati presentavano mutazioni in almeno una di nove categorie di geni sicuramente implicati nella leucemogenesi. Le categorie di geni, e le rispettive frequenze di mutazione nel campione studiato, sono le seguenti: fusioni di fattori di trascrizione (18% dei casi), il gene che codifica nucleofosmina (NPM1) (27%), geni oncosoppressori (16%), geni correlati alla metilazione del DNA (44%), geni coinvolti nel signaling (59%), geni che modificano la cromatina (30%), geni per fattori di trascrizione mieloidi (22%), geni per la coesina (13%) e geni coinvolti nello splicing (14%).²⁴ La Nucleofosmina, codificata dal gene NPM1, è una proteina di trasporto ("shuttle protein") che ha un ruolo cardine nella biogenesi dei ribosomi, nel mantenimento della stabilità genomica e nel controllo della riparazione del DNA. Secondariamente alla mutazione di NPM1,

la Nucleofosmina rimane delocalizzata nel citoplasma e non rientra nel nucleo, favorendo il processo di leucemogenesi.²⁵ Le alterazioni molecolari di questo gene sono presenti in circa il 25 e 53% dei pazienti con LAM soprattutto in quelli con cariotipo normale, inoltre la maggior parte degli studi dimostra che la mutazione di NPM1 si associa ad una prognosi favorevole.²⁶ Al contrario numerosi studi hanno dimostrato l'impatto prognostico negativo della mutazione del gene FLT3, esso appartiene alla famiglia delle tirosin-chinasi recettoriali di classe III, è un recettore di membrana, con un dominio tirosin-chinasico intrinseco, espresso nelle cellule progenitrici ematopoietiche, che regola il differenziamento e la proliferazione di queste cellule.²⁷ La mutazione più frequente ritrovata in questo gene è una Internal Tandem Duplication (FLT3-ITD) mentre più raramente si osservano mutazioni puntiformi del dominio tirosin-chinasico (FLT3-TKD), entrambe le mutazioni rendono la proteina costitutivamente attiva.²⁸ FLT3-ITD si osserva in circa il 30-40% dei pazienti con AML e diversi studi hanno documentato che le mutazioni di FLT3 sono fortemente associate a una prognosi sfavorevole.²⁹ Un'altra alterazione genetica frequente è quella che riguarda il gene CEBPA, questo codifica per un fattore di trascrizione che inibisce la proliferazione cellulare, quindi può essere considerato come un gene oncosoppressore, viene espresso esclusivamente nelle cellule monocitarie e gioca un ruolo decisivo nella differenziazione dei neutrofili. Le mutazioni che riguardano questo gene si riscontrano nel 7-11% dei pazienti affetti da LAM, e sono associate ad una buona prognosi.³⁰

5. Classificazione

Il sistema classificativo storico della LAM è noto come FAB (Franco-Americano-Britannico). Questa classificazione identifica otto sottotipi di LAM, da M0 a M7, basandosi sulle caratteristiche morfologiche e cito-chimiche delle cellule leucemiche.

LAM-M0: Leucemia acuta mieloide scarsamente differenziata

Questo sottotipo si presenta con blasti a morfologia indifferenziata, il corredo immunofenotipico è rappresentato dalla positività per CD13, CD33, CD117 e per la mieloperossidasi citoplasmatica (MPO).

LAM-M1: Leucemia acuta mieloide senza maturazione

In questo caso i blasti presentano un minimo grado di maturazione, mentre sul piano immunofenotipico le cellule presentano una positività per CD13, CD33, MPO e per CD34

LAM-M2: Leucemia acuta mieloide con maturazione

È una Leucemia mieloblastica con un certo grado di maturazione e maggior complessità strutturale. C'è reattività per MPO, CD13, CD33, CD117 e HLA-DR; questo sottotipo è frequentemente associato con la traslocazione t(8;21).

LAM-M3: Leucemia acuta mieloide promielocitica

Questo citotipo mieloide è caratterizzato dai promielociti, cellule dotate di nucleo ovalare o bilobato e citoplasma ricco di granulazioni, organizzate in bastoncelli di Auer. Presenta l'espressione di CD13, CD15, CD33, MPO e la negatività per HLA-

DR. Questa forma di leucemia mieloide è associata alla traslocazione t(15;17) che da origine al gene di fusione PML-RAR α .

LAM-M4 Leucemia acuta mieloide mielomonocitica

Questo sottotipo è rappresentato da elementi che presentano, sul piano immunofenotipico, marcatori appartenenti alla linea granulocitaria (CD15) e monocitaria (CD14). Questo tipo di LAM spesso si associa all'inversione del cromosoma 16.

LAM-M5 Leucemia acuta monocitica

Le LAM appartenenti a questo gruppo sono caratterizzate da una prevalenza di blasti appartenenti alla linea monocitaria il cui marcatore più rappresentativo è il CD33; anche la elevata reattività per CD64, CD4 e CD11b rappresenta un evento comune.

LAM-M6 Leucemia acuta eritroblastica

In questo sottotipo è tipica la presenza di elementi maturi eritroidi positivi per la glicoforina A, il CD71 e il CD36.

LAM-M7 Leucemia acuta mieloide megacarioblastica

In questa forma la maggior parte dei blasti ha un assetto immunofenotipico caratteristico dei megacariociti, con positività per CD41, CD61 e CD36.

Storicamente, quindi, la LAM veniva classificata secondo il gruppo cooperativo FAB in base alla morfologia e l'immunofenotipo delle cellule, attualmente invece

i criteri WHO incorporano ed integrano la morfologia, la citogenetica e la biologia molecolare nel tentativo di elaborare una classificazione che sia universalmente applicabile e prognosticamente valida.³¹

Categoria WHO	Sottotipo/Definizione
LAM con aberrazioni citogenetiche ricorrenti	<p>t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX171</i></p> <p>inv(16)(p13.1q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>t(16;16)(p13.1q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i></p> <p>t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i></p> <p>t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>inv(3)(q21q26.2); <i>RPN1-EVI1</i></p> <p>t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i></p> <p>t(1;22)(p13q13); <i>RBM15-MKL1</i></p> <p>LAM con <i>BCR-ABL1</i></p> <p>LAM con mutazione <i>NPM1</i></p> <p>LAM con mutazione biallelica <i>CEBPA</i></p> <p>LAM con mutazione <i>RUNX1</i></p>
LAM con alterazioni correlate a MDS	<p>Caratteristiche morfologiche di MDS o, precedente anamnestico di MDS/MPN o, Cariotipo correlato a MDS e, Nessuna delle aberrazioni citogenetiche riportate sopra</p>
Neoplasie mieloidi correlate a terapia	<p>Complicazioni tardive di chemioterapia citotossica e/o radioterapia ionizzante</p>
LAM non altrimenti specificata	<p>LAM con minima differenziazione</p> <p>LAM senza maturazione</p> <p>LAM con maturazione</p> <p>Leucemia acuta mielomonocitica</p> <p>Leucemia acuta monocitica</p> <p>Leucemia eitroide pure</p> <p>Leucemia acuta megacarioblastica</p> <p>Leucemia acuta basofila</p> <p>Panmielosi acuta con mielofibrosi</p>

Sarcoma Mieloide	
Proliferazioni mieloidi correlate a sindrome di down	

Tabella 2: Classificazione delle neoplasie mieloidi e Leucemie acute. Adattata da Arber et al. ³²

I casi che non rispettano i criteri di classificazione previsti nelle prime tre sezioni (i.e., aberrazioni ricorrenti, correlazione a MDS, terapia citotossica) vengono classificati come LAM non altrimenti specificate. I sottogruppi contenuti in questa sezione sono divisi in base a caratteristiche morfologiche mutuare dalla classificazione Franco-Americano-Britannica (FAB).³³ Ad oggi, l'utilizzo di questa classificazione non fornisce alcuna informazione in merito alla prognosi.³⁴

6. Presentazione clinica e diagnosi

Inizialmente i sintomi della LAM sono aspecifici e dipendono dalla liberazione in circolo di mediatori chimici dell'infiammazione, quindi compaiono: febbre, dolori ossei e muscolari, calo ponderale e sudorazioni profuse; tuttavia nel tempo iniziano a prevalere segni e sintomi dovuti all'insufficienza midollare a causa della continua espansione del clone leucemico nel midollo osseo. Pertanto a causa dell'insufficiente produzione di eritrociti compaiono i sintomi dell'anemia: pallore, astenia, affaticabilità, cardiopalmo e dispnea dopo sforzi lievi, l'inappropriata produzione di piastrine si concretizza in manifestazioni emorragiche: petecchie, ecchimosi, epistassi, gengivorragie, emorragie dal tubo digerente, ipermenorrea e metrorragie. Per la carenza di granulociti invece c'è una predisposizione maggiore alle infezioni, soprattutto batteriche, localizzate all'apparato respiratorio, l'orofaringe, il cavo orale e la cute. All'esame obiettivo si rilevano le manifestazioni emorragiche, i segni dell'anemia e di eventuali

infezioni, meno frequentemente si ha il riscontro di epatomegalia, splenomegalia e linfadenomegalie. Il 10% circa dei pazienti all'esordio possono avere una iperleucocitosi (leucociti > 30000/ μ l) e presentare segni e sintomi di leucostasi, questi includono: sintomi neurologici (cefalea, visione offuscata, convulsioni) sintomi respiratori (dispnea, cianosi ed emorragia polmonare) e trombosi mono o pluri-distrettuali.

La diagnosi di LAM si esegue su criteri morfologici, immunofenotipici, citogenetici e di genetica molecolare; secondo le ultime linee guida della European Leukemia Network (ELN)³⁵ è necessario provvedere ad una serie di esami di laboratori e strumentali per una corretta diagnosi e stratificazione del rischio. (vedi tabella 3)

Test Diagnostici	Emocromo e formula leucocitaria Aspirato midollare Immunofenotipo tramite citofluorimetria
Genetica	Cariotipo Screening mutazionale per NPM1, CEBPA, RUNX1, FLT3, TP53, Screening per riarrangiamenti cromosomici fra cui PML-RARa, CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1
Test addizionali	Performance status (ECOG/WHO) Biochimica, coagulazione ed esame urine Tipizzazione HLA e status CMV Ricerca HAV, HBV, HCV, HIV Rx torace, ECG, ecocardiogramma

Tabella 3: test diagnostici raccomandati dalle linee guida ELN

Morfologia

Per la diagnosi devono essere contati almeno 200 leucociti sullo striscio di sangue periferico e 500 cellule nucleate sullo striscio di aspirato midollare. E' richiesta una conta di blasti $\geq 20\%$ nel sangue periferico e nel midollo osseo, eccetto per le LAM con t(15;17), t(8;21), inv(16), o t(16;16).

Immunofenotipo

La caratterizzazione immunofenotipica avviene mediante citofluorimetria a flusso multiparametrica che consente di evidenziare diversi antigeni di membrana e citoplasmatici appartenenti ad un particolare citotipo leucemico. Nella tabella sottostante sono riportati i principali marcatori di superficie ed intracellulari per la diagnosi di LAM.

Precursori	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Markers granulocitici	CD65, MPO citoplasmatica
Markers monocitici	CD14, CD36, CD64
Markers megacariocitici	CD41, CD61
Markers eritroidi	CD235a, CD36

Tabella 4: principali markers immunofenotipici delle LAM³⁶

Citogenetica e biologia molecolare

L'analisi citogenetica delle cellule in metafase è una componente molto importante nella diagnostica della LAM, permette di riconoscere le aberrazioni ricorrenti previste dalla classificazione WHO, e di definire il cariotipo, questo si definisce complesso quando sono presenti tre o più alterazioni cromosomiche numeriche e/o strutturali. È inoltre raccomandata la ricerca, tramite tecniche di genetica molecolare, di mutazioni a carico di NPM1, CEBPA, RUNX1, FLT3 e

TP53. In particolare, l'analisi di FLT3 dovrebbe includere la ricerca di mutazioni sia del tipo FLT3-ITD, in associazione al rapporto allelico mutante-wildtype, sia del tipo FLT3-TKD.

7. Fattori prognostici e stratificazione del rischio

La prognosi della LAM dipende da numerosi fattori, clinici e biologici, che vengono valutati al momento della diagnosi.

Fattori prognostici clinici: Sicuramente uno dei primi fattori da prendere in considerazione è l'età del paziente, generalmente sopra i 60 anni i pazienti hanno una LAM con fattori biologici sfavorevoli, tollerano peggio la chemioterapia e spesso non possono ricevere una terapia ad alte dosi a causa delle comorbilità che essi presentano. Inoltre un altro elemento prognostico importante è il mancato ottenimento di una risposta completa dopo l'induzione, così come i pazienti con LAM secondaria, che hanno una difficoltà maggiore nell'ottenere una remissione completa ai regimi chemioterapici convenzionali.³⁵

Fattori prognostici biologici: Sulla base dell'analisi citogenetica e della presenza o meno delle principali mutazioni, le LAM secondo la classificazione dell'ELN possono essere classificate in tre categorie di rischio genetico (favorevole, intermedio, e sfavorevole) (Tabella 5) Per esempio i pazienti con LAM definita "core binding factor" ovvero coloro che presentano alterazioni come t(8;21), inv(16) e t(16;16) hanno dimostrato di rispondere molto bene alla terapia di associazione con antracicline-ARA-C, con una probabilità di guarigione di circa il 60% senza necessità di trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (TCSE).³⁷ Invece, alcune traslocazioni bilanciate, quali la t(6;9), t(v;11q23.3), t(9;22) le anomalie del cromosoma 3 ed il cariotipo complesso sono associati a

prognosi negativa per inferiori possibilità di ottenimento di remissione completa (RC) ed elevata probabilità di recidiva.³⁸ Il cariotipo monosomico si associa ad un outcome sfavorevole ed è definito quando si individua almeno una monosomia (esclusa la perdita di X o Y) assieme ad un'ulteriore monosomia o altra aberrazione cromosomica, escluse quelle che definiscono le LAM CBF. La presenza di un cariotipo monosomico si associa a pazienti più anziani e comporta una minore sopravvivenza, anche rispetto ad altre anomalie inserite nel rischio sfavorevole.³⁹

Per una corretta stratificazione del rischio l'ELN raccomanda fortemente la valutazione dello stato mutazionale di FLT3 e NPM1. La presenza della mutazione NPM1 riduce l'impatto prognostico negativo di FLT3-ITD, che è anche modulato dal rapporto allelico FLT3-ITD/wild-type.⁴⁰ Benchè la maggior parte delle informazioni sull'impatto prognostico delle mutazioni NPM1 e/o FLT3 proviene da studi con induzione di daunorubicina e citarabina ("3+7").⁴¹ I pazienti caratterizzati da FLT3-ITD^{high} (i.e., rapporto allelico > 0.5) sono classificati nella classe di rischio sfavorevole se presentano NPM1^{wt}, mentre l'associazione a mutazioni di NPM1 viene classificata come rischio intermedio. Le mutazioni FLT3-ITD^{low}, e l'assenza di mutazioni di FLT3, si associano a rischio intermedio in assenza di mutazioni di NPM1, e a rischio favorevole quando anche NPM1 risulta mutato. Il ruolo delle mutazioni FLT3-TKD non è chiaro dal punto di vista prognostico.²⁸ Le mutazioni di CEBPA sono associate ad una migliore sopravvivenza libera da malattia,⁴² mentre al contrario mutazioni di *RUNX1*, *TP53* e *ASXL1* si associano a prognosi infausta. In particolare, le mutazioni di *TP53* sono frequentemente associate a cariotipo complesso o monosomico.⁴³

Categoria di rischio	Anomalie riscontrate
Favorevole	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22); CFBF-MYH11 t(16;16)(p13.1;q22); CFBF-MYH11 NPM1 ^{mut} e FLT3 ^{wt} o FLT3-ITD ^{low} CEBPA ^{mut} biallelico
Intermedio	NPM1 ^{mut} e FLT3-ITD ^{high} NPM1 ^{wt} e FLT3 ^{wt} o FLT3-ITD ^{low} (senza aberrazioni cromosomiche sfavorevoli) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Anomalie citogenetiche non altrimenti classificate
Sfavorevole	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3) o t(3;3) -5 o del(5q); -7; -17/abn(17p) Cariotipo complesso o monosomico NPM1 ^{wt} e FLT3-ITD ^{high} RUNX1 ^{mut} ASXL1 ^{mut} TP53 ^{mut}

TABELLA 1: STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO, BASATA SULL'ANALISI GENETICA, DEI PAZIENTI AFFETTI DA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA. ADATTATA DA DÖHNER ET AL³⁵

8. Trattamento e valutazione della risposta

La terapia della LAM viene definita sulla base dell'età del paziente, della sua categoria di rischio citogenetico-molecolare, e delle sue comorbilità. Tutti i pazienti giovani al di sotto dei 65 anni, in assenza di comorbilità che ne controindichino l'utilizzo, vengono avviati ad un programma di polichemioterapia con la finalità di ridurre al minimo e, possibilmente, eradicare la popolazione leucemica, consentendo alle cellule staminali normali di

ripopolare il midollo osseo. Quindi il trattamento convenzionale della LAM prevede due fasi: l'induzione e il consolidamento. La terapia di induzione mira all'ottenimento della remissione completa (RC), quella di consolidamento all'eliminazione delle cellule leucemiche residue che persistono nel paziente dopo l'induzione. Per tutti quei pazienti il cui scopo della terapia è curativo e sono considerati "fit" abbastanza da tollerare la chemioterapia, viene applicato lo schema 3+7, esso si basa sulla somministrazione quotidiana per i primi tre giorni di un'antraciclina, di solito la daunorubicina, con l'ARA-C in infusione continua per sette giorni. Questa terapia di induzione, ha dimostrato il raggiungimento di una risposta completa alla malattia fino all'80% dei pazienti con malattia ad alto rischio e il 50-60% di risposta completa in quelli con malattia a rischio intermedio.⁴⁴ Negli ultimi anni i risultati in termini di RC sono migliorati anche grazie all'aggiunta di vari farmaci appartenenti alla famiglia della "target therapy". Tra questi il Gemtuzumab ozogamicin (GO) è un anticorpo monoclonale contro il CD-33 (una proteina espressa nelle cellule della leucemia mieloide). L'aggiunta di GO alla chemioterapia standard nei pazienti con malattia a rischio favorevole e intermedio diminuisce il rischio di recidiva e in alcuni studi migliora la sopravvivenza globale (OS); sebbene l'entità del beneficio è maggiore nella malattia a rischio favorevole piuttosto che nella malattia a rischio intermedio.⁴⁵ Un altro farmaco di attuale interesse è la midostaurina, ovvero un farmaco inibitore delle tirosin-chinasi impiegato nei pazienti con una mutazione di FLT3. Un trial randomizzato di fase 3 ha evidenziato che l'aggiunta di questa molecola non fornisce un vantaggio significativo in termini di remissioni complete.⁴⁶ Seppure negli ultimi anni si sono raggiunti buoni risultati nella cura della LAM, tuttavia nella malattia a rischio sfavorevole, con il classico regime 3+7 i tassi di RC sono circa il 40% con una mediana di sopravvivenza complessiva tra

i 12 e i 18 mesi. Recentemente due terapie, CPX351 ed il venetoclax associato ad un agente ipometilante, hanno mostrato risultati migliori rispetto alla terapia standard in pazienti con malattia a rischio sfavorevole. CPX 351 è una formulazione liposomiale di citarabina e daunorubicina ad un rapporto molare fisso di 5:1. Questo farmaco ha dimostrato di indurre una remissione di buona qualità con una tossicità accettabile nella maggior parte dei pazienti, aumentando i risultati del TCSE , attraverso una riduzione della mortalità legata al trapianto e del tasso di ricaduta post-trapianto.⁴⁷ Un'altra molecola d'interesse è il venetoclax, un inibitore di BCL-2, questo farmaco spesso viene associato ad un agente ipometilante (decitabina o azacitidina) e in particolare l'associazione venetoclax più azacitidina nei pazienti precedentemente non trattati che non erano idonei alla chemioterapia intensiva, ha dimostrato che la sopravvivenza complessiva era più lunga e l'incidenza della remissione era più alta nei i pazienti che hanno ricevuto azacitidina più venetoclax rispetto a quelli che hanno ricevuto solo azacitidina.⁴⁸ Mentre l'obiettivo della terapia di induzione era quello di raggiungere la RC, quello della terapia di consolidamento è il mantenimento della RC; le due strategie che vengono comunemente impiegate sono ulteriori cicli di chemioterapia oppure il TCSE. La scelta su una di queste due strategie si basa su un'attenta valutazione dei loro rischi e benefici, il trapianto allogenico per esempio assicura un rischio di ricadute minore, a fronte però di un maggior rischio di complicanze anche mortali derivanti dalla graft versus host disease, o le infezioni opportunistiche causate dall'immunosoppressione; quindi la scelta del trapianto spesso ricade per quei pazienti che hanno una malattia a rischio sfavorevole o intermedio, mentre i pazienti con malattia a basso rischio riescono a rimanere liberi dal rischio di ricadute con la sola chemioterapia e pertanto i rischio del trapianto allogenico non sarebbero giustificati,⁴⁹ quindi nel gruppo a

rischio favorevole la terapia di consolidamento si basa sull'utilizzo di ARA-C a dose più alta rispetto che alla terapia di induzione.⁵⁰ Invece i pazienti che non conseguono una RC in seguito al trattamento di induzione, e quelli che presentano una ricaduta dopo una prima RC, sono candidati ad una terapia di salvataggio. Un regime frequentemente impiegato in questo contesto è basato sulla somministrazione di mitoxantrone, etoposide e citarabina (MEC). I pazienti che ottengono una RC in seguito alla terapia di salvataggio sono, quando possibile, sottoposti a TCSE.⁵¹ Nella grande maggioranza dei casi la LAM dell'anziano ha una prognosi insoddisfacente; la terapia di induzione convenzionale determina percentuali di RC pari al 45-55%, e meno del 10% dei pazienti trattati con terapia aggressiva sono vivi a 5 anni;⁵² Questi risultati negativi dipendono da diversi fattori tra cui le concomitanti comorbidità, che peggiorano la tossicità della chemioterapia e del trapianto o ne controindicano il loro utilizzo, e la maggiore incidenza di caratteristiche biologiche negative come la citogenetica sfavorevole o la secondarietà della LAM a precedenti malattie emopoietiche, soprattutto le mielodisplasie.

Valutazione della risposta alla terapia

Il trattamento di induzione ha come scopo il conseguimento della RC della malattia. Secondo le linee guida ELN, la RC è definita da una conta di blasti midollari inferiore al 5% delle cellule totali, con recupero completo della funzione midollare (i.e., granulociti neutrofilici >1000/ μ l, piastrine >100000/ μ l). Questo criterio si basa unicamente su una valutazione morfologica e tende a sottostimare il reale carico di malattia. Per ovviare a questo inconveniente, sono state sviluppate tecniche di valutazione basate su analisi citofluorimetrica e di biologia

molecolare. Queste permettono di valutare la malattia residua misurabile (MRD) e quindi personalizzare il trattamento per i singoli pazienti, oltre che individuare precocemente l'avvento delle ricadute di malattia. La MRD può essere valutata molto precocemente, per esempio, dopo la terapia di induzione e di consolidamento per valutare lo stato di remissione e determinare la cinetica della risposta alla malattia, inoltre anche dopo il consolidamento al fine di rilevare un eventuale ricaduta morfologica. Lo stato di remissione valutato dalla citofluorimetria (che è informativo nel ~90% dei pazienti AML) è predittore più affidabile dell'esito rispetto alla valutazione convenzionale della RC basata sulla morfologia.⁵³ Le tecniche di biologia molecolare invece prevedono l'utilizzo della real-time PCR (rtPCR), il suo utilizzo nella valutazione della MRD è giustificato quando il paziente con LAM è portatore di un gene di fusione formatosi da una trascrizione bilanciata tra due cromosomi, per esempio PML-RARA/t(15;17), RUNX1-RUNX1T1/t(8;21), CBFβ-MYH11/(inv(16)/t(16;16), DEK-CAN(NUP214)/t(6;9), fusioni t(11q23)/MLL, mutazioni t(5;11)/NUP98-NSD1 o NPM1, che coprono collettivamente ~60% delle AML che si presentano nei bambini e nei giovani adulti. Un'altra metodica che negli ultimi anni è sempre più utilizzata è la Next Generation Sequencing (NGS); essa sta diventando uno strumento importante per lo studio molecolare della LAM al momento della diagnosi iniziale, soprattutto nella LAM citogeneticamente normale, che è caratterizzata da un'elevata eterogeneità clonale⁵⁴. Infatti, diversi cloni, caratterizzati da mutazioni specifiche o dalle loro combinazioni, possono mostrare una sensibilità variabile alla terapia e una distinta tendenza alla ricaduta. Le principali tecnologie NGS includono: (a) Whole Genome Sequencing (WGS), (b) Whole-Exome Sequencing (WES), e (c) Targeted-gene sequencing. Tuttavia nonostante la NGS è potenzialmente applicabile a tutti i pazienti

leucemici, l'interpretazione dei risultati richiede approcci bioinformatici altamente specializzati.

L'aggiunta di Gemtuzumab Ozogamicin ad una terapia di induzione basata su fludarabina e alte dosi di citarabina migliora significativamente la sopravvivenza nei pazienti affetti da Leucemia Acuta Mieloide citogeneticamente normale e positiva per FLT3-ITD

9. Background e scopo del lavoro

Gemtuzumab Ozogamicin:

Il Gemtuzumab Ozogamicin (GO) è un anticorpo umanizzato di tipo immunoglobulina di classe G sottotipo 4 (IgG4) che riconosce specificamente il CD33 umano. Il CD33 è una glicoproteina di membrana, con una porzione intracellulare contenente un dominio tirosin-chinasico la cui fosforilazione dà l'avvio ad un signaling a valle. Tuttavia gli effetti fisiologici della sua attivazione non sono ancora ben chiari, ma si sospetta che abbia un ruolo importante nel processo di modulazione della produzione di citochine e la soppressione della risposta immunitaria ed infiammatoria.⁵⁵ Nelle persone sane, il CD33 è espresso soprattutto sulla superficie delle cellule precursori mieloidi multi-potenti, sulle cellule formanti colonie mieloidi uni-potenti e sui monociti in maturazione.⁵⁶ Tutte queste informazioni quindi concordano che il CD33 sia un antigene di differenziazione mieloide. Mentre nei pazienti affetti da LAM in circa il 25% è

presente il CD33 su meno del 40% dei blasti leucemici, il 25% dei pazienti ha CD33 sul 40-75% dei loro blasti leucemici e la metà dei pazienti ha CD33 su >75% dei blasti.⁵⁷ Il Gemtuzumab per esercitare il suo effetto citotossico è legato covalentemente a N-acetil-gamma-calicheamicina un antibiotico chemioterapico. Dati preclinici suggeriscono che l'attività antitumorale di gemtuzumab ozogamicin sia dovuta al legame con le cellule cancerose che esprimono il CD33, seguito dall'internalizzazione del complesso Anticorpo-CD33 e dal rilascio intracellulare di N-acetil-gamma-calicheamicina tramite scissione idrolitica del linker. L'attivazione di N-acetil-gamma-calicheamicina determina rotture nel DNA a doppio filamento, inducendo successivamente l'arresto del ciclo cellulare e la morte cellulare per apoptosi.⁵⁸

L'aggiunta dell'anticorpo anti-CD33 Gemtuzumab Ozogamicin (GO) all'induzione convenzionale "3+7" ha dimostrato di migliorare il risultato dei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML) senza alterazioni citogenetiche avverse.⁵⁹ I primi studi suggerivano che il GO era particolarmente efficace tra i pazienti a basso rischio, come la AML con fattore di legame core, in particolare se incluso in una terapia di induzione a base di citarabina ad alte dosi. Il ruolo del GO per i pazienti a rischio intermedio sembra essere meno chiaro. I pazienti a rischio intermedio definito citogeneticamente possono essere ulteriormente stratificati considerando due frequenti aberrazioni molecolari: La mutazione FLT3 "internal tandem duplication" (FLT3-ITD), associata a prognosi sfavorevole e la mutazione NPM1 (NPM1-mut), associata a una buona prognosi. La presenza concomitante di NPM1-mut supera in parte l'impatto prognostico negativo di FLT3-ITD, che è anche modulato dal rapporto allelico FLT3-ITD/wild type. La valutazione dello stato mutazionale di NPM1 e FLT3 è fortemente

raccomandata per la stratificazione del rischio alla diagnosi dalle ultime linee guida ELN 2017.

L'Obiettivo di questo studio è valutare l'efficacia di GO in aggiunta ad un regime di induzione intensivo a base di fludarabina, citarabina ad alte dosi e idarubicina (FLAI) come trattamento di prima linea per pazienti AML più giovani (<65 anni), citogeneticamente normali, secondo lo stato mutazionale NPM1 e FLT3-ITD.

10. Metodi

Pazienti:

Il presente studio consiste in una valutazione retrospettiva non controllata dell'outcome relativa ai pazienti affetti da LAM trattati con chemioterapia e GO in relazione allo stato mutazionale di NPM1 e FLT3. Tutti i pazienti inclusi sono stati trattati in uno di tre centri ematologici italiani (Genova, Udine, Siena) fra il 2008 e il 2018. Tutti i pazienti hanno firmato un modulo di consenso scritto e i dati analizzati nello studio sono stati raccolti dalla documentazione clinica. I criteri di inclusione nello studio comprendono una diagnosi di leucemia mieloide acuta, escluse le forme secondarie e la leucemia acuta promielocitica, e l'assenza di un precedente trattamento chemioterapico, esclusa la terapia di supporto per citoriduzione nei casi di iperleucocitosi. I criteri di esclusione sono la presenza di una grave compromissione cardiaca, polmonare, renale o epatica, non correlabili alla leucemia, e l'incapacità di tollerare un regime chemioterapico intensivo in base alla decisione dell'equipe ematologica. La diagnosi di leucemia acuta

mieloide è stata eseguita su campioni di sangue midollare in base ai criteri diagnostici proposti da ELN. Il lineage mieloide dei blasti midollari è stato confermato dall'analisi citofluorimetrica, eseguita sui campioni di sangue midollare prelevati alla diagnosi. Tramite l'utilizzo di una combinazione di anticorpi monoclonali specifici per marker di membrana sono stati identificati gli immunofenotipi associati a blasti leucemici per il successivo controllo di MRD. L'analisi del cariotipo è stata eseguita su campioni di sangue midollare, prelevati alla diagnosi, secondo la tecnica del bandeggio con quinacrina e la valutazione di almeno 20 metafasi. Il significato prognostico dell'analisi cariotipica è stato definito in due classi, intermedio e sfavorevole, in base alla classificazione proposta da uno studio prognostico del Medical Research Council¹⁵. L'assenza di pazienti caratterizzati da cariotipo favorevole è dovuta alla natura mutualmente esclusiva della mutazione di *NPM1* rispetto alle aberrazioni cromosomiche t(8;21) e inv(16).

I campioni di sangue midollare di tutti i pazienti sono stati analizzati con tecniche di biologia molecolare tramite realtime-PCR per la ricerca di mutazioni di *NPM1* e per la ricerca della mutazione *FLT3-ITD*. Le mutazioni di *NPM1* sono state ricercate tramite piattaforma Mutant Quant Standard di Ipsogen (Marsiglia, Francia). La ricerca della positività di *FLT3-ITD* è stata effettuata tramite piattaforma PCR e successiva separazione degli ampliconi in gel di agarosio ad alta risoluzione⁶⁰.

Combinando i dati provenienti dall'analisi del cariotipo e dalle analisi di biologia molecolare, tutti i pazienti sono stati stratificati in classi di rischio mutate dalle linee guida ELN per il trattamento di leucemia acuta mieloide. I pazienti che presentavano mutazione di *NPM1* e *FLT3^{wt}* o *FLT3-ITD^{low}* sono stati classificati

nel gruppo di rischio favorevole, quelli che presentavano *NPM1^{wt}* e *FLT3-ITD^{high}*, invece, sono stati classificati nel gruppo di rischio sfavorevole.

Terapia di induzione e consolidamento:

Il primo ciclo di chemioterapia per induzione della remissione consisteva nella somministrazione secondo lo schema poli-chemioterapico FLAI di fludarabina 30 mg/mq e ARA-C 2g/mq nei giorni 1-5 più idarubicina 10 mg/mq nei giorni 1-3-5), con o senza l'aggiunta di GO a basso dosaggio 3 mg/mq, il quale è stato somministrato a 42 pazienti arruolati nello studio, seguita da una seconda induzione senza fludarabina e con idarubicina alla dose aumentata di 12 mg/mq.

I pazienti che dimostravano un'evidenza di remissione completa morfologica in seguito al primo ciclo di chemioterapia sono stati avviati a un secondo ciclo di chemioterapia di induzione senza fludarabina e con idarubicina alla dose aumentata di 12 mg/mq.

La terapia di consolidamento prevedeva il trapianto di cellule staminali emopoietiche o un ulteriore ciclo a base di chemioterapia. Il trapianto è stato effettuato nei pazienti a rischio alto secondo la stratificazione ELN. Quindi prima del 2017 i pazienti con mutazione *FLT3-ITD* isolata erano programmati per il trapianto allogenico di cellule staminali, se era disponibile un donatore fratello compatibile HLA, mentre dopo il 2017 solo i pazienti con mutazione *FLT3-ITD* isolata ad alto carico allelico hanno ricevuto HSCT nella prima RC. I pazienti stratificati a rischio basso, quelli per cui non è stato possibile individuare un donatore, e quelli per cui non è stata posta indicazione al trapianto, sono stati trattati con chemioterapia di consolidamento a base di citarabina ad alte dosi per un totale di 3 cicli.

11. Valutazione della risposta e analisi statistica

La remissione completa della malattia è stata definita in base alla presenza di un recupero ematologico completo (i.e., granulociti neutrofilici $>1000/\mu\text{l}$, piastrine $>100000/\mu\text{l}$) in associazione a una conta di blasti midollari $< 5\%$ all'analisi morfologica. In assenza di queste condizioni, i pazienti sono stati definiti come non-responder (NR). I pazienti che sono deceduti entro i primi 60 giorni dall'inizio del trattamento sono stati classificati come morti precoci (ED).

La ricaduta di malattia è stata definita in base al riscontro di una conta di blasti midollari $> 5\%$ all'analisi morfologica. I casi di ricaduta extra-midollare sono stati confermati con analisi patologica su biopsia.

Le variabili continue sono state analizzate usando il test *t* di Student o, quando necessario, il test dei ranghi di Wilcoxon. Le variabili dicotomiche sono state analizzate usando il test del chi quadro o, se necessario, il test esatto di Fisher.

L'analisi multivariata dei tassi di RC è stata eseguita secondo un modello di regressione logistica, includendo solo le variabili che nella precedente analisi univariata hanno dimostrato una significatività con $p < 0,1$.

La sopravvivenza complessiva (OS) è stata calcolata dalla data della diagnosi alla morte per qualsiasi causa.

Le curve di sopravvivenza sono state create in base al metodo Kaplan-Meier e il test di ipotesi scelto è stato il test dei ranghi logaritmici.

Per valutare l'impatto del trapianto allogenico sulla sopravvivenza è stato costruito un modello di analisi landmark, includendo unicamente i pazienti vivi ed in remissione al giorno 90 post-HSCT.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite sulla piattaforma software IBM® SPSS.

12. Risultati

Sono stati inclusi nell'analisi centoquarantotto pazienti AML, trattati in tre centri ematologici italiani tra il 2008 e il 2018, di cui 70 nel centro di Genova, 47 nel centro di Udine, 31 nel centro di Siena e portatori di almeno un'alterazione molecolare tra *NPM1*-mut e *FLT3*-ITD. L'analisi genetica per mutazioni di *NPM1* e *FLT3* è stata eseguita su tutti i pazienti inclusi nello studio. Di questi, 65 (43,9%) presentavano *NPM1^{mut}/FLT3^{wt}*, 50 (33,7%) presentavano *NPM1^{mut}/FLT3-ITD* e 33 (22,2%) presentavano *NPM1^{wt}/FLT3-ITD*. L'età mediana era di 50 anni (range: 18-65). Per la valutazione finale dell'effetto del GO in aggiunta allo schema FLAI sono stati considerati solo i pazienti per i quali fosse nota la dose totale ricevuta. In tabella 5 sono riportate le caratteristiche alla diagnosi dei pazienti inclusi nello studio.

TABELLA 5: TABELLA 2: CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI ALLA DIAGNOSI DI LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE

Caratteristiche dei pazienti (N=149)		Num (%)
Età	<45 anni	52 (34,9%)
	>45 anni	97 (65,1%)
Sesso	Maschi	84 (56,4%)
	Femmine	65 (43,6%)
Globuli bianchi	<30000/ μ l	64 (43%)
	>30000/ μ l	85 (57%)
NPM1	Mutato	120 (80,5%)
	Wild-type	29 (19,5%)
FLT3-ITD	Positivo	88 (59,1%)
	Negativo	61 (40,9%)
NPM1/FLT3-ITD	NPM1 ^{mt} /FLT3 ^{wt}	61 (40,9%)
	NPM1 ^{mt} /FLT3-ITD	59 (39,6%)
	NPM1 ^{wt} /FLT3-ITD	29 (19,5%)
Cariotipo	Intermedio	133 (89,3%)
	Sfavorevole	16 (10,7%)
Stratificazione rischio ELN	Rischio basso	56 (37,6%)
	Rischio intermedio	51 (34,2%)
	Rischio alto	42 (28,2%)

Complessivamente, la mortalità a 60 giorni è stata del 3% e non è stata significativamente influenzata dal ricevere o meno il GO durante l'induzione. Dopo un ciclo di induzione, 126 pazienti hanno raggiunto la RC (85%) senza alcuna differenza tra i pazienti che hanno ricevuto o meno il GO. Dopo un follow-up mediano di 70 mesi, la sopravvivenza globale a 3 anni (OS) era del 59,5% (mediana non raggiunta). La durata della OS era significativamente più lunga nei pazienti mutati NPM1 ($p < 0,05$). I pazienti con mutazione isolata FLT3-ITD avevano una prognosi significativamente peggiore (OS a 3 anni 38,3%, $p < 0,05$). I dati generati dall'analisi delle variabili correlate alla probabilità di ottenere una RC sono visibili in tabella 6.

TABELLA 3: ANALISI DELLE VARIABILI ASSOCIATE A REMISSIONE COMPLETA

		Num pz	Num RC (%)	P univ	P multiv
Età	<45 anni	52	47 (90,4%)	0.318	-
	>45 anni	97	82 (84,5%)		
Sesso	Maschi	84	73 (86,9%)	1.000	-
	Femmine	65	56 (86,2%)		
Globuli bianchi	<30000/ μ l	64	58 (90,6%)	0.209	-
	>30000/ μ l	85	71 (83,5%)		
<i>NPM1</i>	Mutato	120	108 (90%)	0.019	0.012
	Wild-type	29	21 (72,4%)		
<i>FLT3-ITD</i>	Positivo	88	72 (81,8%)	0.051	0.255
	Negativo	61	57 (93,4%)		
<i>NPM1/FLT3-ITD</i>	<i>NPM1^{mt}/FLT3^{wt}</i>	61	57 (93,4%)	0.024	-
	<i>NPM1^{mt}/FLT3-ITD</i>	59	51 (86,4%)		
	<i>NPM1^{wt}/FLT3-ITD</i>	29	21 (72,4%)		
Cariotipo	Intermedio	133	115 (86,5%)	1.000	-
	Sfavorevole	16	14 (84,5%)		
Stratificazione rischio ELN	Basso	56	53 (94,6%)	0.059	0.545
	Intermedio	51	43 (84,3%)		
	Alto	42	33 (78,6%)		
TOTALE		149	129 (86,6%)		

TABELLA 4: ANALISI DELLE VARIABILI ASSOCIATE A RICADUTA DI MALATTIA

		Num pz	Ricadute (%)	P univ	P multiv
Età	<45 anni	47	9 (19,1%)	1.000	-
	>45 anni	82	23 (28,0%)		
Sesso	Maschi	73	22 (30,1%)	0.109	-
	Femmine	56	10 (17,9%)		
Globuli bianchi	<30000/ μ l	58	14 (24,1%)	0.296	-
	>30000/ μ l	71	18 (25,4%)		
<i>NPM1</i>	Mutato	108	23 (21,3%)	0.009	0.03
	Wild-type	21	9 (42,9%)		
<i>FLT3-ITD</i>	Positivo	72	22 (30,6%)	0.104	-
	Negativo	57	10 (17,5%)		
<i>NPM1/FLT3-ITD</i>	<i>NPM1^{mt}/FLT3^{wt}</i>	57	10 (17,5%)	0.071	-
	<i>NPM1^{mt}/FLT3-ITD</i>	51	13 (25,5%)		
	<i>NPM1^{wt}/FLT3-ITD</i>	21	9 (42,9%)		

Cariotipo	Intermedio	115	27 (23,5%)	0.317	-
	Sfavorevole	14	5 (35,7%)		
Stratificazione rischio ELN	Basso	53	7 (13,2%)	0.01	0.494
	Intermedio	43	9 (20,9%)		
	Alto	33	16 (48,5%)		
TOTALE		129	32 (24,8%)		

TABELLA 5: ANALISI DELLA SOPRAVVIVENZA COMPLESSIVA E DELLE VARIABILI ASSOCIATE

		Deceduti	3y-OS	P univ	P multiv
Età	<45 anni	17 (32,7%)	65,4%	0.086	-
	>45 anni	46 (47,4%)	55,2%		
Sesso	Maschi	41 (48,8%)	53,8%	0.108	-
	Femmine	22 (33,8%)	65%		
WBC	<30000/ μ l	22 (34,4%)	73,2%	0.034	0.569
	>30000/ μ l	44 (48,2%)	47,5%		
<i>NPM1</i>	Mutato	43 (35,8%)	63,5%	0.002	0.034
	Wild-type	20 (69,0%)	40%		
<i>FLT3-ITD</i>	Positivo	45 (51,1%)	48,2%	0.006	0.178
	Negativo	18 (29,5%)	73,4%		
<i>NPM1/FLT3</i>	<i>NPM1^{mt}/FLT3^{wt}</i>	18 (29,5%)	73,4%	0.002	-
	<i>NPM1^{mt}/FLT3-ITD</i>	25 (42,4%)	52,7%		
	<i>NPM1^{wt}/FLT3-ITD</i>	20 (69,0%)	40%		
Cariotipo	Intermedio	54 (40,6%)	59,1%	0.550	-
	Sfavorevole	9 (56,2%)	55,6%		
Rischio ELN	Basso	14 (25,0%)	77%	0.000	0.048
	Intermedio	19 (37,3%)	58,5%		
	Alto	30 (71,4%)	35,2%		
TOTALE		63 (42,3%)	58,6%		

L'aggiunta di MY non ha migliorato significativamente l'esito nell'intera coorte, ma ha mostrato un significativo miglioramento sulla sopravvivenza tra i pazienti FLT3-ITD (OS a 3 anni 66,7% vs 46,6% per i pazienti FLT3-ITD che ricevevano o non ricevevano GO, rispettivamente, $p < 0,03$, Fig. 1). Questo effetto è stato più evidente tra i 33 pazienti *NPM1^{wt}/FLT3-ITD*: in questo sottogruppo, i pazienti che hanno ricevuto il GO hanno avuto un esito complessivamente buono, simile

ai pazienti con doppia mutazione che hanno ricevuto la stessa terapia (OS mediana non raggiunta in entrambi i gruppi, $p=n.s.$). Al contrario, tra i pazienti che non hanno ricevuto il GO, i pazienti NPM1 negativi/FLT3-ITD positivi hanno avuto uno scarso risultato, significativamente inferiore ai pazienti con doppia mutazione positiva che hanno ricevuto lo stesso regime (OS a 3 anni 39,8% e 57,3%, rispettivamente, $p<0,05$). L'effetto favorevole del GO tra i pazienti FLT3-ITD non è stato influenzato dal carico allelico di FLT3-ITD. Da notare che la proporzione di pazienti che ricevono un trapianto autologo nella prima RC, come previsto, era più alta tra i pazienti con mutazione FLT3-ITD isolata, sebbene non ci fosse una differenza significativa tra i pazienti che ricevevano o non ricevevano il GO.

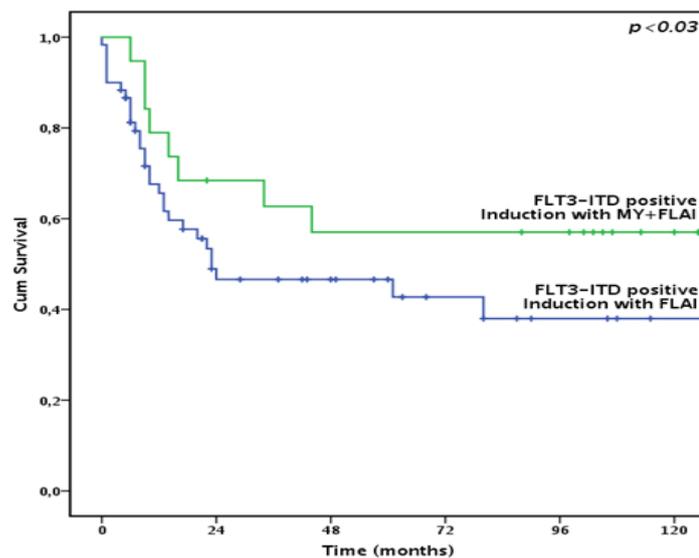


FIGURA 2: CONFRONTO DELLA SOPRUVVIVENZA GLOBALE TRA I PAZIENTI FLT3-ITD CHE HANNO RICEVUTO O MENO IL GO

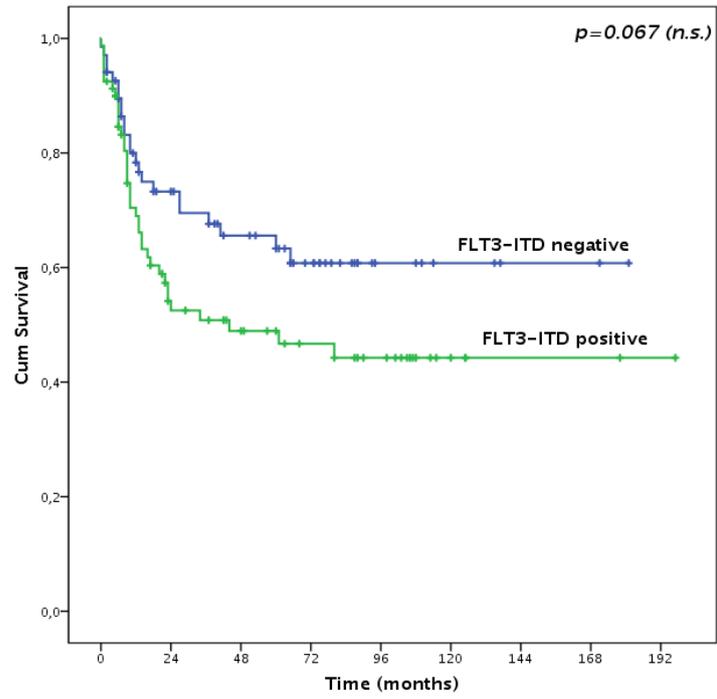


FIGURA 3: CONFRONTO DELLA SOPRAVVIVENZA GLOBALE TRA PAZIENTI FLT3-ITD POSITIVI E NEGATIVI

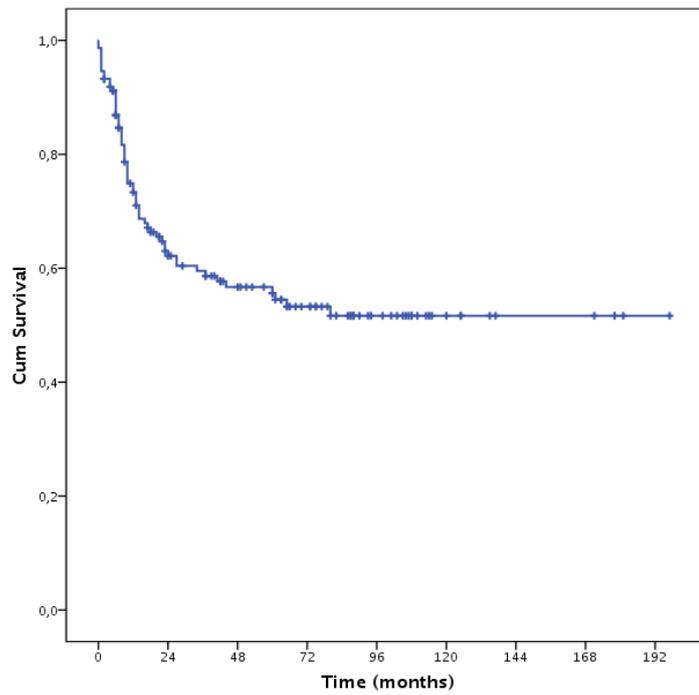


FIGURA 4: SOPRAVVIVENZA GLOBALE NELL'INTERA COORTE: 57,4% A 5 ANNI.

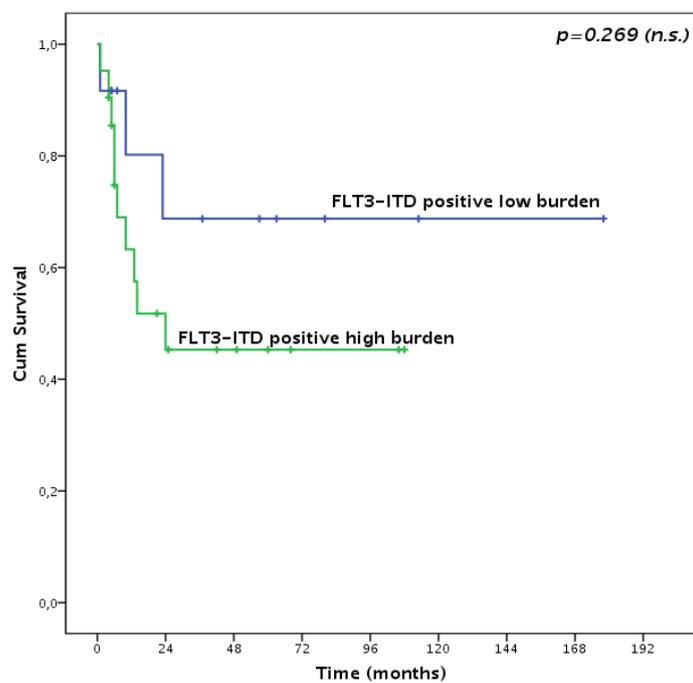


FIGURA 5: CONFRONTO DELLA SOPRAVVIVENZA GLOBALE NEI PAZIENTI FLT3-ITD IN RELAZIONE AL BURDEN ALLELICO

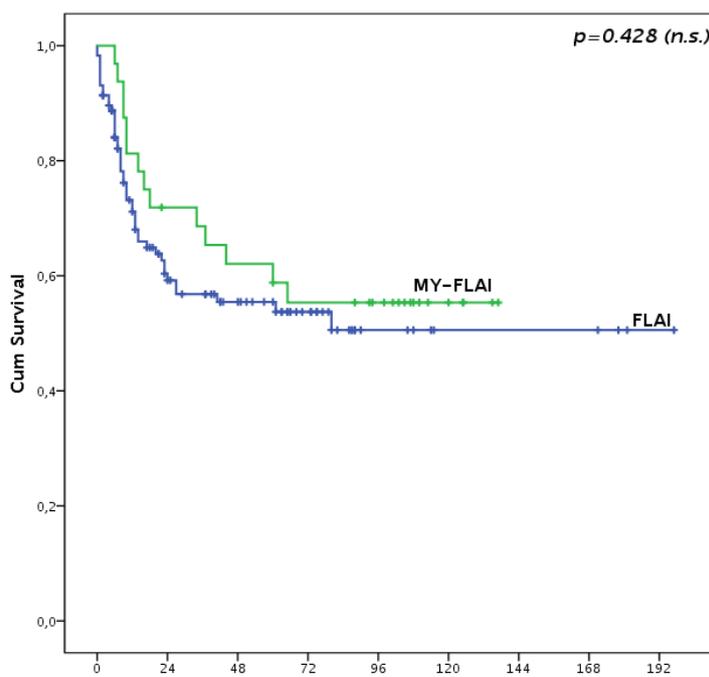


FIGURA 6: CONFRONTO DELLA SOPRAVVIVENZA GLOBALE NELL'INTERA COORTE TRA CHI È STATO TRATTO CON LO SCHEMA FLAI E FLAI + GO

13. Discussione

Negli ultimi due decenni sono stati approvati diversi farmaci per il trattamento della LAM (Gemtuzumab-Ozogamicin, decitabina, azacitidina, midostaurina), il cui approccio terapeutico si basa ancora sulla somministrazione di chemioterapia convenzionale (regimi "3 + 7" come induzione, seguiti da cicli di consolidamento a base di citarabina) seguiti o meno da trapianto allogenico in base alla stratificazione del rischio citogenetico e molecolare.⁶¹ Tra i farmaci innovativi, il GO è stata la prima terapia basata sull'utilizzo di anticorpi monoclonali ad essere stata sviluppata ed approvata, mostrando risultati promettenti nei pazienti affetti da LAM, sia nel setting dei pazienti anziani recidivati o refrattari, sia nella popolazione giovane (<65). In particolare, quattro studi prospettici europei, in cui sono stati randomizzati 2744 pazienti (studi MRC/NCRI AML15 e AML16, studio GOELAMS AML2006 IR, studio ALFA-0701), hanno dimostrato che l'aggiunta di GO alla chemioterapia di induzione ha migliorato la DFS e la OS soprattutto in un sottogruppo di pazienti giovani con AML di nuova diagnosi.⁴⁵ Complessivamente, nella maggior parte degli studi che hanno utilizzato la combinazione di una bassa dose di GO (3-6 mg/mq) con la chemioterapia di induzione intensiva, sia nei pazienti AML pediatrici che in quelli giovani, è stato osservato un beneficio di sopravvivenza soprattutto nei sottogruppi di pazienti con rischio citogenetico-molecolare favorevole e intermedio.⁶² L'obiettivo di questo studio retrospettivo multicentrico è stato quello di valutare l'outcome relativo ai pazienti affetti da LAM trattati con chemioterapia e GO in relazione allo stato mutazionale di NPM1 e FLT3. L'analisi dei dati raccolti ha permesso di

evidenziare che l'aggiunta del gemtuzumab ozogamicin non ha portato ad un significativo miglioramento nell'intera coorte, tuttavia nel sottogruppo di pazienti affetti da LAM, con *NPM1^{wt}/FLT3-ITD* l'aggiunta del GO ha permesso di ottenere dei buoni risultati in termini di OS (a 3 anni 66,7% vs 46,6% per i pazienti FLT3-ITD che ricevevano o non ricevevano GO). I pazienti arruolati nel nostro studio hanno ricevuto una terapia d'induzione secondo lo schema FLAI che comprende: fludarabina 30 mg/mq e ARA-C 2g/mq nei giorni 1-5 più idarubicina 10 mg/mq nei giorni 1-3-5) seguita da una seconda induzione senza fludarabina e con idarubicina alla dose aumentata di 12 mg/mq. Il razionale per le combinazioni di fludarabina e citarabina è che la fludarabina, aumenta la citotossicità della citarabina aumentando la concentrazione cellulare di Ara-C 5-trifosfato. Inoltre, la fludarabina è tossica contro le cellule blastiche resistenti a più farmaci, in particolare contro le cellule leucemiche PGP-positive.⁶³ Recentemente, Walter et al. hanno documentato che le cellule blastiche dei pazienti che rispondono al GO hanno un'attività della PGP significativamente inferiore e un'espressione di CD33 superiore rispetto ai casi che non rispondono.⁶⁴ Tuttavia, nella maggior parte degli studi pubblicati, i pazienti non sono stati selezionati in base allo stato di espressione di CD33 e l'espressione di CD33 non sembra avere un valore predittivo per la sopravvivenza.⁶⁵ Nonostante ciò, van der Velden et al. hanno scoperto che un alto carico di antigene CD33 nel sangue periferico limita l'efficacia di GO nei blasti del midollo osseo.⁶⁶ Nella pratica clinica quotidiana, questo suggerisce che GO potrebbe avere un'efficacia maggiore nei blasti del midollo osseo se somministrato dopo la riduzione delle cellule blastiche CD33 positive nel sangue periferico con la chemioterapia standard.⁶⁷

14. Bibliografia

1. Sant, M., Allemani, C. & Tereanu, C. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: Results of the HAEMACARE project (*Blood* (2010) 116, 19 (3724-3734)). *Blood* **117**, 3477 (2011).
2. Maynadie', M. *et al.* Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: A HAEMACARE study. *Haematologica* **98**, 230–238 (2013).
3. Eaves, C. J. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* **125**, 2605–2613 (2015).
4. Chopra, M. & Bohlander, S. K. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosom. Cancer* **58**, 850–858 (2019).
5. Deschler, B. & Lübbert, M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer* **107**, 2099–2107 (2006).
6. Pötzsch, C., Voigtländer, T. & Lübbert, M. p53 germline mutation in a patient with Li-Fraumeni Syndrome and three metachronous malignancies. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **128**, 456–460 (2002).
7. Creutzig, U., Kutny, M. & Schlenk, R. F. Acute Myelogenous Leukemia. *Pediatr. Oncol.* 135–149 (2017). doi:10.1007/978-3-319-33679-4_6
8. Reilly, J. T. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): A paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br. J. Haematol.* **128**, 18–34 (2005).
9. Nishida, S. *et al.* AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood*

- 107**, 3303–3312 (2006).
10. Nucifora, G., Larson, R. A. & Rowley, J. D. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. *Blood* **82**, 712–715 (1993).
 11. Preston, D. L. *et al.* Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat. Res.* **137**, S68-97 (1994).
 12. Pui, C. H. *et al.* Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1682–1687 (1991).
 13. Neugut, A. I., Robinson, E., Nieves, J., Murray, T. & Tsai, W. Y. Poor survival of treatment-related acute nonlymphocytic leukemia. *JAMA* **264**, 1006–1008 (1990).
 14. Kantarjian, H. M. & Keating, M. J. Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome. *Semin. Oncol.* **14**, 435–443 (1987).
 15. Grimwade, D. *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116**, 354–365 (2010).
 16. Harrison, C. J. *et al.* Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 2674–2681 (2010).
 17. Miyoshi, H. *et al.* The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J.* **12**, 2715–2721 (1993).
 18. Ohki, M. Molecular basis of the t(8;21) translocation in acute myeloid leukaemia. *Semin. Cancer Biol.* **4**, 369–375 (1993).

19. Kim, H.-J. *et al.* KIT D816 mutation associates with adverse outcomes in core binding factor acute myeloid leukemia, especially in the subgroup with RUNX1/RUNX1T1 rearrangement. *Ann. Hematol.* **92**, 163–171 (2013).
20. Warrell, R. P. J., de Thé, H., Wang, Z. Y. & Degos, L. Acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **329**, 177–189 (1993).
21. Duployez, N., Willekens, C., Marceau-Renaut, A., Boudry-Labis, E. & Preudhomme, C. Prognosis and monitoring of core-binding factor acute myeloid leukemia: Current and emerging factors. *Expert Rev. Hematol.* **8**, 43–56 (2015).
22. Ustun, C. & Marcucci, G. Emerging diagnostic and therapeutic approaches in core binding factor acute myeloid leukaemia. *Curr. Opin. Hematol.* **22**, 85–91 (2015).
23. Byrd, J. C. *et al.* Repetitive cycles of high-dose cytarabine benefit patients with acute myeloid leukemia and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22): results from CALGB 8461. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 1087–1094 (2004).
24. Manuscript, A. & Leukemia, M. Schröder2005_Article_DiapauseInMonogonontRotifers.pdf. **368**, 2059–2074 (2013).
25. Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. & Pandolfi, P. P. Nucleophosmin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 493–505 (2006).
26. Thiede, C. *et al.* Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* **107**, 4011–4020 (2006).
27. Filip, A. A., Libura, M., Giebel, S. & Haus, O. Genetic Mechanisms and Molecular Markers of Neoplastic Transformation in Acute Myeloid Leukemia. 29–53 (2012). doi:10.1007/978-3-642-29467-9_2
28. Daver, N., Schlenk, R. F., Russell, N. H. & Levis, M. J. Targeting

- FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* **33**, 299–312 (2019).
29. Kiyoi, H. *et al.* Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* **93**, 3074–3080 (1999).
 30. Fröhling, S. *et al.* CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 624–633 (2004).
 31. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937–951 (2009).
 32. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
 33. Bennett, J. M. *et al.* Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann. Intern. Med.* **103**, 620–625 (1985).
 34. Walter, R. B. *et al.* Significance of FAB subclassification of ‘acute myeloid leukemia, NOS’ in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood* **121**, 2424–2431 (2013).
 35. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
 36. Béné, M. C. *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* **25**, 567–574 (2011).
 37. Bloomfield, C. D. *et al.* Core binding factor acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B (CALGB) Study 8461. *Ann.*

- Hematol.* **83 Suppl 1**, S84-5 (2004).
38. Slovak, M. L. *et al.* A retrospective study of 69 patients with t(6;9)(p23;q34) AML emphasizes the need for a prospective, multicenter initiative for rare ‘poor prognosis’ myeloid malignancies. *Leukemia* **20**, 1295–1297 (2006).
 39. Kayser, S. *et al.* Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatment strategies. *Blood* **119**, 551–558 (2012).
 40. Gale, R. E. *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* **111**, 2776–2784 (2008).
 41. Fröhling, S. *et al.* Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* **100**, 4372–4380 (2002).
 42. Wouters, B. J. *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* **113**, 3088–3091 (2009).
 43. Rücker, F. G. *et al.* TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood* **119**, 2114–2121 (2012).
 44. Fernandez, H. F. *et al.* Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1249–1259 (2009).
 45. Castaigne, S. *et al.* Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)*

- 379**, 1508–1516 (2012).
46. Stone, R. M. *et al.* Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 454–464 (2017).
 47. Guolo, F. *et al.* CPX-351 treatment in secondary acute myeloblastic leukemia is effective and improves the feasibility of allogeneic stem cell transplantation: results of the Italian compassionate use program. *Blood Cancer J.* **10**, 96 (2020).
 48. DiNardo, C. D. *et al.* Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **383**, 617–629 (2020).
 49. Suci, S. *et al.* Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. *Blood* **102**, 1232–1240 (2003).
 50. Bloomfield, C. D. *et al.* Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res.* **58**, 4173–4179 (1998).
 51. Amadori, S. *et al.* Mitoxantrone, etoposide, and intermediate-dose cytarabine: an effective and tolerable regimen for the treatment of refractory acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **9**, 1210–1214 (1991).
 52. Burnett, A. K. The Challenge of AML in Older Patients. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **5**, e2013038 (2013).
 53. Terwijn, M. *et al.* High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 3889–3897 (2013).

54. Ley, T. J. *et al.* DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* **456**, 66–72 (2008).
55. Maccauley, M. S., Crocker, P. R. & Paulson, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 653–666 (2014).
56. Laszlo, G. S. *et al.* Expression and functional characterization of CD33 transcript variants in human acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **7**, 43281–43294 (2016).
57. Khan, N. *et al.* Expression of CD33 is a predictive factor for effect of gemtuzumab ozogamicin at different doses in adult acute myeloid leukaemia. *Leukemia* **31**, 1059–1068 (2017).
58. Linenberger, M. L. CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia* **19**, 176–182 (2005).
59. Hills, R. K. *et al.* Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet. Oncol.* **15**, 986–996 (2014).
60. Kiyoi, H. *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* **12**, 1333–1337 (1998).
61. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
62. Gamis, A. S. *et al.* Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: results from the randomized phase III Children’s Oncology Group trial AAML0531. *J. Clin.*

- Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 3021–3032 (2014).
63. Malagola, M. *et al.* Case-control study of multidrug resistance phenotype and response to induction treatment including or not fludarabine in newly diagnosed acute myeloid leukaemia patients. *Br. J. Haematol.* **136**, 87–95 (2007).
64. Walter, R. B. *et al.* CD33 expression and P-glycoprotein-mediated drug efflux inversely correlate and predict clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia treated with gemtuzumab ozogamicin monotherapy. *Blood* **109**, 4168–4170 (2007).
65. Jedema, I. *et al.* Internalization and cell cycle-dependent killing of leukemic cells by Gemtuzumab Ozogamicin: rationale for efficacy in CD33-negative malignancies with endocytic capacity. *Leukemia* **18**, 316–325 (2004).
66. van der Velden, V. H. J. *et al.* High CD33-antigen loads in peripheral blood limit the efficacy of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) treatment in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* **18**, 983–988 (2004).
67. Godwin, C. D., Gale, R. P. & Walter, R. B. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **31**, 1855–1868 (2017).

15. Ringraziamenti

Alla fine di questo lungo percorso voglio ringraziare per primi la mia mamma e il mio papà che mi hanno sempre sostenuto anche nei momenti più difficili, senza di loro non sarei mai riuscito a compiere la mia scalata così bene, con il loro amore mi hanno dato la forza di vincere ogni sfida; non avrei potuto desiderare dei genitori migliori.

Ringrazio la mia fantastica ragazza Martina, il cui sostegno è stato irrinunciabile, entrando nella mia vita ha portato un'ondata di felicità, sei stata e sarai la miglior compagna di studi, di viaggi e di vita.

Ringrazio il relatore di questa tesi: il Professor Lemoli, per la disponibilità dimostrata durante la stesura di questo lavoro e per tutto ciò che ho imparato con grande piacere in ogni sua lezione; infine ringrazio anche il Professor Guolo, ha saputo risolvere ogni mio dubbio durante l'elaborazione della tesi, sin dal primo giorno in reparto mi ha fatto sempre sentire a casa e mi ha permesso di scoprire una materia affascinante, sarò orgoglioso di continuare parte del mio percorso con lui.

Papà.. il tuo sciu megu ce l'ha fatta!